

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra genetiky a šlechtění**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

**Alergeny ve slupce jablek kódované genovou rodinou  
Mal d 1 a vliv „house keeping“ genů na stanovení jejich  
relativní exprese**

**Bakalářská práce**

**Lucie Lamačová**

**ATZR-KS**

**Vedoucí práce doc. Dr. Ing. Pavel Vejl**

**© 2020 ČZU v Praze**



### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci „Alergeny ve slupce jablek kódované genovou rodinou Mal d 1 a vliv „house keeping“ genů na stanovení jejich relativní exprese“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 17.7.2020

---



**Poděkování**

Děkuji doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi za zasvěcení do tajů základů genetiky a za trpělivost při vedení této práce a také všem dalším, kteří mě během psaní podporovali.

# Alergeny ve slupce jablek kódované genovou rodinou Mal d 1 a vliv „house keeping“ genů na stanovení jejich relativní exprese

Potravinovou alergií trpí celosvětově až 10 % populace a její prevalence v posledních dekádách vzrůstá. Tento trend stále nebyl uspokojivě vysvětlen, ale studie naznačují, že se jedná se o komplexní souhru v zásadě nezměněných genetických predispozic a naopak velmi proměnlivých environmentálních faktorů působících na imunitní systém jedince ale také na samotné alergeny. Primární odpovědi imunitního systému na neškodné antigeny je navození orální tolerance. V případě alergie dochází k jejímu prolomení a indukci Th2 odpovědi určené proti mnohobuněčným parazitům a produkci IgE protilátek. Tyto mechanismy a způsoby, jakým je možné navodit toleranci *de novo*, jsou předmětem intenzivního výzkumu.

Typickým alergenem je protein, který jako každý jiný genový produkt tohoto druhu plní ve zdrojovém organismu určitou funkci, k níž je předurčen svou konformací a která spočívá především ve vazbě různých ligandů. Při porušení orální tolerance je téměř jisté, že široký repertoár protilátek najde na jeho povrchu odpovídající epitop.

Alergie na jablko postihuje pouze 2% potravinových alergiků, ale v oblasti s výskytem březového pylu (severní, západní a střední Evropa) hraje významnou roli, neboť jí trpí velké procento všech alergiků na břízu. To je důsledkem zkřížené reaktivity mezi strukturálními homology Bet v 1 a Mal d 1, nejvýznamnějším alergenem jablka ze skupiny PR-10 proteinů. Jeho exprese je indukována biotickými a abiotickými stresy. Je patrný vliv ročníku i způsobu kultivace, nicméně určité hranice jsou nastaveny genotypem. Mezi nejvíce exprimované izoformy patří Mal d 1.01 a 1.02. Exprese jednotlivých izoform vykazuje odrůdovou specifitu. Šlechtění hypoalergenních odrůd musí předcházet důkladné poznání těchto alergenů. Po stanovení základních parametrů proteinu nastává obvykle fáze porovnávání alergenicity mezi jednotlivými kultivary. Výzkumníci si kladou otázky, jestli se odrůdy navzájem liší v expresním profilu, v celkovém množství proteinu, v zastoupení či vůbec přítomnosti jednotlivých izoform, ve vazbě IgE protilátek či ve schopnosti vyvolat reakci při orální provokaci.

Jednou z běžně používaných metod měření genové exprese je kvantitativní PCR. Metoda je spojením reverzní transkripce, klasické PCR reakce a detekce na bázi značených sond. Metoda spočívá v kvantitativním měření narůstající intenzity fluorescence, zapříčiněné zdvojnásobením množství produktu v každém cyklu, jež je zobrazována v grafu v reálném čase. Principem relativní kvantifikace je normalizace hodnot k referenčnímu genu, a proto musí tento gen vykazovat stabilní expresi napříč zkoumanými vzorky.

V experimentální části této práce byla provedena validace tří referenčních genů (ACT7, UBC, GAPDH). K těmto genům byla normalizována exprese izoform Mal d 1.01 a 1.02 a následně vyhodnocovány difference mezi dvěma biologickými replikáty. Kruskal-Wallisův test prokázal statisticky významné rozdíly mezi ACT7 a GAPDH. Z výsledků vyplývá, že GAPDH není jako referenční gen pro jablečnou slupku vyhovující.

**Klíčová slova:** jablko, *Malus × domestica*, izoalergeny, Mal d 1, exprese, house keeping geny, qRT-PCR



# Allergens in the apple peel encoded by the Mal d 1 gene family and the effect of house keeping genes on determining their relative expression

Up to 10 % of the world's population suffer from food allergies and their prevalence has been increasing in recent decades. The cause of this increase has still not been sufficiently explained. However, the studies suggest that the individual's immune system is affected by a complex interplay between the essentially unchanged genetic predispositions and highly variable environmental factors, which are also affecting the allergens themselves.

The primary immune response to harmless antigens is oral tolerance induction. In the case of allergy, this tolerance is broken and pathogen-like response is established by Th2 cells induction and IgE antibody release. These mechanisms and processes of *de novo* tolerance induction are subjects of intensive research.

In the vast majority of cases, allergen has a protein nature. Like any other gene products it has a characteristic 3D structure determining its physicochemical properties and functional role in organism, especially in ligand binding. When the oral tolerance is disrupted, it is almost certain that a wide repertoire of antibodies will find a corresponding binding site on its surface.

Globally, there is only 2 % of food allergy patients suffering from the apple allergy. However, it is relatively common among birch pollen sensitised patients in the birch pollen area (North, Western and Central Europe). The reason is the cross reactivity of the structural homologues Bet v 1 and Mal d 1, the main apple allergen from the PR-10 protein group. Mal d 1 expression is induced by the biotic and abiotic stresses. Harvesting year and cultivation method have apparent influence on the expression. However, the genotype seems to play the main role, because the expression rate of isoallergens and isoforms is cultivar dependent. The most expressed isoforms are Mal d 1.01 and 1.02. Hypoallergenic cultivars breeding is highly dependent on the knowledge about the allergens. Protein characterisation itself is followed by the comparison amongst cultivars in terms of allergenicity, whole protein or particular isoform quantification, IgE sera binding or allergic response inductibility by oral provocation.

RT-PCR is the most common and widely used method for gene expression studies, consisting of three consecutive steps: reverse transcription, PCR and labeled probes detection. It is based on quantitative measurement of increasing fluorescence intensity triggered by doubling the amount of the product in each cycle, which allows real-time visualisation by an amplification plot. The relative quantification principle is the normalization of the acquired values of the gene of interest to the reference gene values. Therefore, the reference gene must show a stable expression across all samples measured.

In the experimental part of this work, the validation of the three reference genes (ACT7, GAPDH, UBC) was performed. Expression of Mal d 1.01 and 1.02 isoforms has been normalised to these genes and then differences between two biological replicates has been evaluated. The Kruskal-Wallis test showed statistically significant differences between ACT7 and GAPDH. The GAPDH appeared to be not suitable to be used as a reference gene for the apple peel.

**Keywords:** apple, *Malus × domestica*, isoallergens, Mal d 1, expression, house keeping genes, qRT-PCR





# Obsah

<b>1. Úvod</b>	<b>13</b>
<b>2. Cíl práce</b>	<b>14</b>
<b>3. Literární rešerše</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Potravinové alergie</b>	<b>15</b>
<b>3.1.1 Prevalence</b>	<b>15</b>
3.1.1.1 Alergie na ovoce a zeleninu	16
3.1.1.2 Pollen-food syndrom	17
3.1.1.3 Hygienická hypotéza	17
<b>3.1.2 Obrannoschopnost organismu</b>	<b>18</b>
3.1.2.1 Hlavní zbraně imunitního systému	19
3.1.2.2 Přirozená imunita a podstata zánětu	20
3.1.2.3 Adaptivní imunita	21
3.1.2.4 Lymfatický systém	22
3.1.2.5 Vývoj T a B lymfocytů	23
<b>3.1.3 Průběh infekce</b>	<b>24</b>
3.1.3.1 Typy Th lymfocytů	25
3.1.3.2 Pohlčení antigenu B buňkou	25
3.1.3.3 Produkce protilátek	26
3.1.3.4 IgE reakce	26
<b>3.1.4 Imunopatologické reakce</b>	<b>27</b>
<b>3.1.5 Slizniční imunita</b>	<b>28</b>
3.1.5.1 Gut-associated lymphatic tissue	28
3.1.5.2 O-MALT: Oral mucosa-associated lymphatic tissue	29
<b>3.1.6 Indukce slizniční tolerance</b>	<b>29</b>
<b>3.1.7 Alergická reakce</b>	<b>30</b>
3.1.7.1 Příznaky alergie	31
3.1.7.2 Původ alergie	31
3.1.7.3 Vliv mikrobiomu	33
<b>3.2 Alergeny</b>	<b>34</b>
<b>3.2.1 Epitop</b>	<b>35</b>
<b>3.2.2 Názvosloví alergenů</b>	<b>36</b>
<b>3.2.3 Klasifikace alergenů</b>	<b>36</b>
<b>3.2.4 Alergenicitá</b>	<b>39</b>
3.2.4.1 Imunogenicita (T-cell reaktivita)	39
3.2.4.2 Přemostění	39
3.2.4.3 Stabilita	41
3.2.4.4 Alergeny a prostředí	42
3.2.4.5 Regulace genové exprese	44
<b>3.3 Metody diagnostiky</b>	<b>44</b>

3.3.1 Diagnostika alergie	45
3.3.2 Epidemiologické studie alergie	46
3.3.3 Diagnostika alergenicity	47
3.4 Jablko ( <i>Malus × domestica</i> ) a jeho alergeny	48
3.4.1 Produkce	49
3.4.2 Původ a biologie	49
3.4.3 Odrůdy	50
3.4.4 Genetika	50
3.4.5 Šlechtění	51
3.4.6 Jablečné alergeny	52
3.4.6.1 Genová rodina Mal d 1	53
3.4.6.2 Sekvence Mal d 1	53
3.4.6.3 Protein Mal d 1	54
3.4.6.4 Genová exprese Mal d 1	55
3.4.7 Alergenicita kultivarů	57
3.5 Měření genové exprese pomocí kvantitativní PCR	57
3.5.1 Izolace nukleových kyselin	58
3.5.1.1 Buněčná lýze	59
3.5.1.2 Separace	60
3.5.1.3 Měření koncentrace a kvality	62
3.5.2 Detekce nukleových kyselin a polymerázová řetězová reakce	62
3.5.2.1. Detekce mRNA	64
3.5.2.2 Northern blotting	64
3.5.2.3 Reverzní transkripce	64
3.5.2.4 RT-PCR	65
3.5.3 Kvantitativní PCR	66
3.5.3.1 Reportérová barviva a detekce signálu	66
3.5.3.2 Amplifikační křivka	67
3.5.3.3 Absolutní a relativní kvantifikace	68
3.5.3.4 Klasický qPCR experiment	69
3.5.3.5. Stanovení relativní exprese	70
3.5.3.6. Statistické vyhodnocení dat	71
4. Materiál a metody	72
4.1 Příprava cDNA	72
4.2 qPCR	72
4.3 Stanovení relativní exprese	73
4.4 Statistická analýza	74
5. Výsledky	74
5.1 Relativní exprese	74
5.2 Statistická analýza	76

<b>6. Diskuse</b>	<b>79</b>
<b>7. Závěr</b>	<b>81</b>
<b>8. Seznam literatury</b>	<b>83</b>

# 1. Úvod

V posledních několika dekádách se světová populace potýká s nárůstem alergie na potraviny (Prescott & Allen 2011). Nejčastějšími spouštěči těchto alergií jsou zejména mléko, sója a obiloviny, ale významnou měrou do sbírky alergenních potravin přispívá také ovoce (Carlson & Coop 2019). Různé formy alergie na jablko pak tvoří 2 % z celkového počtu potravinových alergiků (Fernández-Rivas et al. 2006). Příčinnými alergeny jsou čtyři proteiny označované jako Mal d 1-4 (Gao et al. 2008). Jablko obsahuje velké množství zdraví prospěšných látek (Boyer & Liu 2004) a je nejrozšířenějším ovocem pěstovaným v mírném pásmu z hlediska přepočtu na vyprodukované tuny i průměrné spotřeby na obyvatele (FAO 2014). Pro specifické alergiky se však jedná o „zakázané ovoce“, což je pro mnoho z nich limitující jak ze zdravotního tak ze sociokulturního hlediska (Van der Velde et al. 2012). Jedním z pěstitelských a šlechtitelských cílů je proto nabídnout alergikům alternativu v podobě hypoalergenních odrůd. Ty je možné vyhledávat z nepřeberného množství starých krajových odrůd nebo na tuto vlastnost cíleně šlechtit, případně použít metody genového inženýrství (Gilissen et al. 2005).

Tvorba hypoalergenních odrůd klade velké nároky na znalosti o jednotlivých alergenech a jejich působení na organismus, stejně jako vyžaduje dobré porozumění molekulární struktury alergenů, mechanismu protilátkové odpovědi a obecně vlastnostem imunitního systému.

V neposlední řadě je pak diagnostika alergenicity. Ta je standardně prováděna sledováním reakcí pacientů nebo pomocí kvantifikace daného alergenu, ideálně obojím (Vegro et al. 2016). Poměrně jednoduchou a široce rozšířenou metodou je stanovení míry genové exprese pomocí RT-PCR (Pagliarani et al. 2013). Množství transkriptu je poté srovnáno s referenčním genem, který vykazuje stabilní expresi (Gutierrez et al. 2008). Volba správného referenčního genu se odvíjí právě od této stability exprese napříč zkoumanými vzorky a vhodnost různých genů by měla být experimentálně potvrzena pro každý organismus, kultivar i jednotlivé tkáně. Ve studiích genové exprese alergenů u jablek se většinou používá aktin (Pagliarani et al. 2013). Ověření vhodnosti tohoto house-keepingového genu a dvou dalších (UBC, GAPDH) bude tématem experimentální části práce.

## **2. Cíl práce**

### **Vědecké hypotézy**

Izoformy Mal d 1.01 a Mal d 1.02 patří mezi nejvíce exprimované alergeny ve slupce jablek napříč různými odrūdami. Vhodný „house keeping“ gen vykazuje stabilní expresi u různých odrūd a v různém typu biologického materiálu. Rozdíly v relativní expresi mezi biologickými replikáty by při použití vhodného „house keeping“ genu měly být minimální.

### **Vlastní cíl práce**

Cílem práce je zpracování ucelené literární rešerše na téma orální alergie člověka na alergeny v jablečné slupce. Experimentální část práce bude vyhodnocovat expresi 2 nejvýznamnějších izoform rodiny Mal d 1 u 4 odrūd jabloní. Vhodnost 3 „house keeping“ genů bude vyhodnocena na základě relativní exprese ve 2 biologických replikátech.

### 3. Literární rešerše

Následující literární rešerše byla napsána s cílem podat ucelený přehled o stavu současného porozumění potravinové alergii. V první části jsem se zaměřila na imunitní systém a jeho reakci při kontaktu s antigenem za fyziologických i imunopatologických podmínek. Druhá část se zabývá vlastnostmi alergenů, jejich molekulární strukturou a klasifikací. Ve třetí části jsem se zabývala jablkem a jeho alergeny, zejména charakteristikou hlavního alergenu Mal d 1. Poslední, čtvrtá část, je věnována metodám stanovení genové exprese se zaměřením na kvantitativní PCR. Imunologická část obsahuje z větší části informace, které jsem nepokládala za nutné citovat, protože se jedná o dlouho známá fakta uvedená v každé učebnici imunologie a jsou součástí základních přednáškových kurzů. Z důvodu požadavků vycházejících z předpisu FAPPZ pro psaní bakalářských prací jsem tyto obecně známé informace na konci každého odstavce opatřila citacemi z těchto knih: Základy imunologie (Hořejší et al. 2017), Janeway's Immunobiology (Murphy & Weaver 2016), Cellular and molecular immunology (Abbas et al. 2015) a Molecular biology of the cell (Alberts et al. 2017).

#### 3.1 Potravinové alergie

Vzestup potravinových alergií v posledních dekádách je často označován jako tzv. druhá alergická vlna (Prescott & Allen 2011) v kontrastu s epidemií zvýšené citlivosti k prachu, roztočům a pylovým částicím v druhé polovině 20. století, vedoucí k rozvoji respiračních potíží a astmatu. Potravinová alergie je imunopatologická reakce namířená proti obvykle tolerovaným molekulám z rozmělněné potravy. Ty jsou chybně rozpoznány jako nežádoucí elementy, což v závislosti na vlastnostech alergenu a síle imunitní odpovědi vede k různým formám zánětlivé reakce, která v některých případech může vést až k ohrožení pacientova života navozením těžké systémové reakce známé jako anafylaxe. Z dotazníkového šetření vyplývá, že je respondenty napříč věkem a pohlavími obecně vnímána jako velmi omezující a zhoršující kvalitu života (Van der Velde et al. 2012).

##### 3.1.1 Prevalence

Fuchs et al. (2016) na základě srovnání různých epidemiologických studií uvádí, že některou formou potravinové alergie trpí 6-10 % euroamerické populace. Vysoká prevalence (procentuální vyjádření počtu alergických jedinců oproti celé populaci) byla zaznamenána také v Asii a ostatních částech světa a to nejen ve vyspělých, ale i v rozvojových zemích s výrazným ekonomickým růstem (Leung et al. 2018).

Vyjádření samotné míry nárůstu počtu potravinových alergiků se nicméně ukazuje jako poněkud obtížné. Loh & Tang (2018) ve své práci upozorňují na nejednotnou metodiku používanou v testech napříč jednotlivými zeměmi i časovými obdobími. Údaje z různých studií jsou tak mezi sebou obtížně porovnatelné, což znemožňuje provedení rozsáhlejších metastudií a kvantitativní zhodnocení. Problematické pak jsou zejména tzv. self-reported studie, založené na dotazníkovém šetření, které se opírají o subjektivní pocity pacienta nebo druhé osoby a které ukazují mnohonásobně vyšší prevalenci, protože pacienti mají tendenci své obtíže nadhodnocovat. Až 25 % rodičů se domnívá, že oni nebo jejich děti trpí touto formou alergie,

nicméně na základě expozičních testů byl prokázána pouze u 5-8 % dětí a 1-2 % dospělých (Yun & Katelaris 2009).

Vyšší počet klinických záznamů o hospitalizacích pacientů s těžkou anafylaxí nicméně vypovídá o nárůstu počtu alergiků s těžkým průběhem reakce (Prescott et al. 2013).

Codex alimentarius uvádí jako nejrozšířenější spouštěče potravinových alergií ve světě tyto potraviny: mléko, vejce, ořechy, pšenice, sója, ryby a mořské plody (WHO & FAO 2018). Mléko a vejce převládají u dětí mladších 4 let. V pozdějším věku často dochází ke spontánnímu nárůstu tolerance a tak ve skupině školních dětí a dospělých najdeme již vyšší procento alergiků na ostatní zmíněné produkty. Studie na náhodném vzorku českých školních dětí (9-17 let) ukazuje, že každé třetí dítě má nějakou formu alergie. Každý jedenáctý z těchto alergiků trpí alergií na potraviny, přičemž největší podíl připadá na ovoce (jablko, jahody, citrusy a kiwi) (Fuchs et al. 2016).

Zastoupení jednotlivých potravin a jejich alergenů v celkové prevalenci jakož i závažnost imunitní reakce se může lišit v závislosti na zeměpisné poloze, pohlaví a jak dokládají četné migrační studie, důležitou roli hraje i etnicita (Barness & Cathleen 2010).

Smrt z anafylaktických příčin po požití potraviny nejčastěji způsobují semena podzemnice olejné (62%), mléko (17%) a vejce (7%) (Kopelentová et al. 2016).

Existují alergie typické pouze pro určitou zemi, specificky vázané na stravovací návyky obyvatel, jako např. alergie na mák v ČR nebo poněkud kuriózní případ alergie na ptačí hnízda v Singapuru (Goh et al. 2000). Právě studie ze Singapuru se staly dokladem změny rozložení alergií v populaci vlivem globalizace. Např. alergie na semena podzemnice olejné byla mezi Singapurskými dětmi velmi vzácná a počet hospitalizací se začal prudce zvyšovat až během posledních dvaceti let společně s širším přijetím západního životního stylu (Liew et al. 2013).

### 3.1.1.1 Alergie na ovoce a zeleninu

Na evropském kontinentu je významná alergie na ovoce a zeleninu. Tato tzv. „plant food allergy“ je nejběžnější evropskou alergií mezi staršími dětmi a dospělými (McClainn et al. 2014). Prevalence se na základě expozičních testů pohybuje mezi 0,1 – 1,8 % v případě zeleniny (rajče, celer, mrkev) a 0,1 – 4,3 % v případě ovoce, kde je nejčastěji spojena s plody čeledi *Rosaceae* (jablko, broskev, jahody) a *Betulaceae* (lískový ořech) (McClainn et al. 2014).

Významným zdrojem alergenů je jablko, jehož konzumace způsobuje problémy cca 2 % evropanů (Fernández-Rivas et al. 2006) a to i přesto, že jeho alergeny většinou vyvolají reakci pouze u jedinců alergických na strukturně podobný alergen jiného druhu, jelikož samy nejsou schopny tzv. primární senzibilizace.

V závažnosti reakcí jsou patrné určité rozdíly mezi obyvateli Středomoří a severnější části Evropy. V Itálii a zejména ve Španělsku převažují závažné systémové projevy, jejichž spouštěčem je zejména zkřížená reaktivita s broskví, zatímco ve střední a západní Evropě souvisí tyto alergie především s tzv. „pollen-food syndromem“ (PFS), kdy senzibilizace trávovými a stromovými pyly inhalační cestou vyvolá po pozření potravinového alergenu lehkou imunitní reakci v ústní dutině, tzv. „orální alergický syndrom“ (OAS) (Fernández-Rivas et al. 2006). Mezi jeho nejčastější příznaky patří nepříjemné pocity v krku, brnění jazyka, otok a svědění rtů.



### 3.1.1.2 Pollen-food syndrom

Carlson & Coop (2019) ve snaze shrnout všechny dostupné studie o prevalenci PFS konstatuje, že mezi nimi panují velké rozdíly. Vzhledem k tomu, že pylová alergie sužuje 20 – 50 % populace a u 47 až 70 % polinotiků se zároveň rozvine PFS, je možné učinit velmi hrubý odhad, že tímto syndromem trpí 9,4 – 35 % populace.

V severní a střední Evropě jsou nejrozšířenějším spouštěčem pylové senné rýmy různé druhy bříz (Biedermann et al. 2019). Březový pyl zaujímá dominantní postavení (80 %) také jako původce PFS, zejména alergeny Bet v 1 a Bet v 2. Odhaduje se, že 50 až 90 % těchto polinotiků trpí zároveň zkříženou reaktivitou na některé ovoce nebo zeleninu, zejména jablka, hrušky, broskve, mrkev, vlašské a lískové ořechy (Carlson & Coop 2019).

I některé další stromy, náležející společně s břízou do řádu *Fagales*, mohou účinně suplovat její roli - bylo prokázáno, že po přidání k extraktu zkřížených alergenů dosahují séra pacientů alergických na tyto příbuzné pyly 78% aktivity sér alergiků na břízu (Canis et al. 2011).

Biederman et al. (2019) nicméně uvádí, že vzhledem k absenci větších březových porostů ve Středomoří nepřichází místní obyvatelé do kontaktu s tímto pylem, čímž vysvětluje velmi nízký výskyt PFS v těchto zemích.

Strukturní rozdíly mezi stromovými Bet v 1 homology a jejich potravinovými příbuznými jsou tedy pravděpodobně již natolik velké, že zkříženou reaktivitu způsobují pouze omezeně.

Je zajímavé, že senzibilizace Bet v 1 slouží jako ochrana proti senzibilizaci jinými alergeny, např. broskvovým Pru p 3, který v trávicím traktu nepodléhá degradaci tak rychle jako alergeny zkřížené z Bet v 1 a způsobuje tak závažné systémové reakce, což odpovídá jejich vyššímu výskytu ve Středomoří (Biederman et al. 2019).

Mezi další případy asociované s PFS patří zkřížená reaktivita s některými trávovými pyly, např. syndrom pelyněk/celer/koření, ambrózie/meloun nebo na molekulární úrovni teprve nedávno objasněný syndrom cypřišek/citrusy/broskev (Sénéchal et al. 2018).

### 3.1.1.3 Hygienická hypotéza

Ačkoli je rozvoj alergie podmíněn z velké části geneticky a stále jsou identifikovány nové kandidátní geny, je velmi nepravděpodobné až téměř nemožné, že by v uplynulých 50 letech došlo k tak významnému selekčnímu tlaku na rozšíření příslušných mutací v populaci. Bez zahrnutí exogenních spouštěčů není možné nárůst počtu alergiků vysvětlit. V 80. letech byla vyslovena tzv. hygienická hypotéza, která tvrdí, že zvýšený výskyt potravinové alergie souvisí do značné míry se zvyšováním životní úrovně obyvatel (Strachan et al. 1989). Změna způsobu života po hmotné, sociální i kulturní stránce vede k ustavení jiných stravovacích návyků, vyšším hygienickým standardům v domácnostech atd. což se promítá do mnoha faktorů (expozice jiným druhům alergenů, omezený kontakt s patogeny spojený s nižší stimulací imunitního systému), které interagují s genetickou predispozicí jedince a společně vytvářejí podhoubí pro rozvoj nežádoucí imunitní reakce (Cochrane et al. 2009).

V současné době dochází k jisté revizi původního konceptu. Kritika se netýká výše zmíněných sociálních vlivů, ale skládá čím dál více důkazů, že klíčovou rolí v rozvoji alergie nehraje ani tak snížená expozice patogenům, jako spíše narušení vztahů se symbiotickou

mikrobiotou (Bloomfield et al. 2016). Kuo et al. (2013) v tomto kontextu poukazují na nepříznivý vliv časného podávání antibiotik na rozvoj alergií. Nové poznatky na pomezí buněčné biologie a imunologie svědčí o křehké rovnováze mikroprostředí sliznic závislé na intenzivní mezibuněčné komunikaci a povyšují epitel z role pasivní bariéry na významného aktéra udržování tolerance (Goleva et al. 2019).

Není možné opomenout také vliv životního prostředí, a to zejména u potravinových alergií zkřížených s pylem. Pylová sezona břízy začíná brzy v březnu a trvá až do půli května. Mezi lety 1969 - 2006 došlo ve Švédsku k uspišení nástupu tohoto období o 1 až 5 dní (Frei & Gassner 2008). To v důsledku může, společně se stoupající oblibou břízy jako dekorativní rostliny, nejen přidělat více starostí polinotikům, ale také se podílet na zvyšování pravděpodobnosti senzibilizace vedoucí k PFS.

Rizikovými faktory pro vznik alergií jsou klimatické změny, změny v koncentraci ozonu nebo průmyslové znečištění (D'Amato et al. 2010), stejně jako např. průmyslová úprava jídla (Smith et al. 2017). Všechny tyto vlivy mohou nejen přímo či nepřímo působit na imunitu alergenům vystaveného jedince, ale také měnit dostupnost nebo imunogenní potenciál samotného alergenu. Alergie je tak *do jisté míry* civilizační chorobou.

V následujícím oddílu se zaměřuji nejprve na shrnutí funkce imunitního systému, dále se věnuji faktorům ovlivňujícím vznik alergií a poté uvádím informace o typech alergických reakcí.

### 3.1.2 Obranyschopnost organismu

Základním poznávacím znamením každého buněčného organismu je udržování vlastní komplexity oproti neuspořádanému okolí, navzdory snaze přirozených sil dosáhnout zpět rovnovážného stavu. Jedná se o aktivní proces závislý na udržování složitých reakčních kaskád, na jejichž pohon musí organismus odebírat energii z okolí. Neustálá syntéza, výstavba a proces rozmnožování vedou k nutnosti odebírat materiál zvenčí. V tomto termodynamicky otevřeném systému probíhá výměna energie především prostřednictvím příjmu metabolicky využitelných látek, výdeje odpadních produktů a tepelných ztrát. Právě tato otevřenost zároveň znamená vyšší náchylnost k exogennímu poškození, které může vést k závažnému narušení homeostázy, nedostatku využitelné energie až smrti organismu a rozkladu systému. Tomu se organismus za všech okolností snaží zabránit.

Vnitřní prostředí těl mnohobuněčných organismů je od vnějšího odděleno bariérou specializovaných buněk krycího epitelu. Povrch těla je možné s jistými ústupky mechanicky vyztužit, nicméně vnějším prostředím je i lumen gastrointestinálního traktu. Bariéru střeva tvoří sliznice, skrze kterou je potřeba vstřebávat živiny z pozřené potravy. S potravou se však do těla dostává i nálož antigenního materiálu. Stejně tak i dýchací ústrojí, poševní sliznice, exokrinní žlázy a další otvory zejí do světa, který je především světem mikroorganismů. Člověk je s nimi celý svůj život v úzkém kontaktu.

Komenzální druhy osidlující kůži, sliznice a další oblasti tvoří cca 1 kg váhy průměrného člověka (Sender et al. 2016) a ukazuje se, že hrají často velmi významnou roli v udržování naší vlastní homeostázy. Narušením integrity slizničních bariér se může z prospěšného kmenu stát škodlivý (Hořejší et al. 2017). Existují mikroorganismy vysoce patogenní, které by v případě neexistující vnitřní obrany znemožnily hostitelskému druhu úspěšně přežít. I přes pokročilou

medicinu zemře dle tiskové zprávy WHO (2020) ročně na infekční choroby více než 17 milionů lidí.

Nebezpečí číhá i uvnitř vlastního těla v podobě buněk poškozených či vymknutých se kontrole.

Efektivní ochrana tak musí být založena na inteligentním rozlišování mezi částicí potenciálně nebezpečnou a tou, který může být tolerována. Jedná se vždy o dosažení kompromisu mezi dvěma extrémy - přehnanou reaktivitou nebo přílišnou benevolencí, přičemž obojí dláždí cestu k rozsáhlým poškozením organismu, šokovým stavům a smrti. Je důležité si uvědomit, že válka s patogenem probíhá na domácím území a váha bojů dopadá i na bedra místní buněčné populace, takže nesmyslné vyhlášení války každému kolemjdoucímu antigenu by bylo velmi vyčerpávající.

### 3.1.2.1 Hlavní zbraně imunitního systému

Cílem obranné reakce je zabránit šíření patogenu z napadené tkáně do krve a jeho likvidace. Miliony let evoluce učinily mikroorganismy značně rezistentními a jejich zničení tak vyžaduje velmi agresivní metody zahrnující např. působení volných radikálů a nízkého pH, což je toxické i pro okolní buňky. V případě menších objektů je velmi efektivním řešením fagocytóza, díky které dojde k izolaci nejen od okolního zranitelného prostředí, ale také od cytoplazmy fagocytující buňky a to díky uzavření patogenu do odděleného kompartmentu - fagozomu. Dalšími zbraněmi jsou pak např. apoptotické signály, perforace membrán, produkce hlenu nebo vyvrhování toxických granul do prostředí (Alberts et al. 2017). Hojně využívaná je také produkce proteinů schopných tvořit s cizorodou částicí imunokomplexy a tím ji neutralizovat nebo zvýšit její atraktivitu pro fagocytující buňky, čehož si již na konci 19. století povšiml německý imunolog Almroth Wright. Nazval tento proces opsonizací, z řeckého „opsono“ („připravuji si jídlo“) a tyto faktory proteinové povahy jako opsoniny (Colebrook 1953).

Imunitní systém dělíme na dvě navzájem více či méně provázané složky – přirozenou (nespecifickou) a adaptivní (specifickou).

Hlavními aktéry jsou v obou případech bílé krvinky (leukocyty), odvozené z hematopoetických kmenových buněk kostní dřeně, které dále diferencují na leukocyty myeloidní nebo lymfoidní řady. Každá řada se dále specializuje do mnoha populací se specifickou genovou expresí lišících se tvarem, velikostí, cytoplazmatickým uspořádáním a efektorovou funkcí (Hořejší et al. 2017). Díky single-cell analýzám nicméně v posledních letech dochází k identifikaci stále nových buněčných subtypů, často na pomezí obou dříve jasně ohraničených kategorií (Villani et al. 2017).

Vzájemná komunikace buněk imunitního systému je zprostředkována prostřednictvím sekrece **cytokinů**. Jedná se o malé signální proteiny vyskytující se ve velmi nízkých koncentracích, většinou s lokální a časově omezenou působností. Charakteristická je pleiotropie (různé typy buněk mohou produkovat stejný cytokin a stejný cytokin může působit odlišně v různých typech buněk), redundance (částečná nahraditelnost jedním za druhý) a schopnost synergie/antagonismu (Alberts et al. 2017). Vazba na receptor spouští různé signální

kaskády vedoucí při dostatečné síle signálu např. k diferenciaci buňky určitým směrem prostřednictvím změn v genové expresi, k indukci buněčného dělení, chemotaxi nebo navození apoptózy. Důležitými skupinami jsou interleukiny (IL), interferony (INF), tumor nekrotizující faktory (TNF), transformující růstové faktory (TGF), chemokiny a stresové proteiny (Abbas et al. 2015)

### 3.1.2.2 Přirozená imunita a podstata zánětu

Evolučně starší je imunita přirozená. Mechanismus jejího působení spočívá zejména v rozeznání molekulárních vzorů (PAMPs) na povrchu běžných patogenů pomocí PRR(pathogen-related) receptorů specializovaných bílých krvinek. Ty se váží zejména na liposacharidové struktury membrán bakterií a kvasinek (Akira et al. 2006). Poškozené, nekrotizující buňky jsou rozeznávány díky povrchové expresi signálů - alarminů známých jako DAMPs (Seong & Matzinger 2004). Populace **makrofágů** disponuje schopností rozpoznat částici fagocytovat a zničit ji navozením toxického prostředí ve fagozomech. I další buňky myeloidní řady se účastní boje s patogeny, buď přímými zásahy nebo vylučováním cytokinů a dalších molekul. **Neutrofilní granulocyty** jsou také účinnými fagocyty a mohou též vyvrhovat do okolí svou vlastní jadernou DNA jako lepkavou síť. Další granulocyty (mastocyty, **bazofily**, **žírné buňky**) po příslušné stimulaci sekretují do prostředí granula s prozánětlivými mediátory a chemokiny, po jejichž koncentračním gradientu migrují z krevního oběhu do místa napadení další imunokompetentní buňky. Dochází k **zánětlivé reakci**. Cytokiny působí na výstelku krevních cév, které reagují zvýšenou expresí adhezivních molekul. Buňky cévního endotelu zároveň rozšíří své buněčné spoje, což umožní lepší prostupnost pro další leukocyty z krve do postiženého místa. Z krevní plazmy tak může proudit i větší množství proteinů komplementu. Zároveň s tím dochází k vazodilataci – díky pomalejšímu toku krve rozšířenými cévami se leukocyty snadněji zachytí na stěnách (Hořejší et al. 2017).

Mezi hlavní příznaky lokálního zánětu patří tato čtveřice, popsána již starověkými lékaři:

*Rubor* - zarudnutí způsobené zvýšeným průtokem krve v důsledku vazodilatace

*Calor* - vyšší teplota, taktéž kvůli zvýšenému průtoku krve

*Tumor* - otok zapříčiněný zvýšením permeability cév – do tkáně se dostává více vody

*Dolor* - výše popsané morfologické změny mohou tlačit na místní nervová zakončení a některé cytokiny působí přímo jako stimulanty akčního potenciálu.

Po zlikvidování infekčního agens těmito mechanismy musí dojít k ukončení zánětu. Ukazuje se, že se jedná o aktivní proces zahrnující přesmyk syntetických drah na tvorbu protizánětlivých faktorů (lipoxiny, resolviny, protektiny) a sekreci proteáz, které štěpí původní, prozánětlivé molekuly. Makrofágy následně vyčistí místo zánětu od zbytků mrtvých buněk a hnisu z odumřelých neutrofilů. Je prokázáno, že fagocytóza apoptotických buněk má imunosupresivní účinky. Významným aktérem je protein TGF- $\beta$ , který zároveň stimuluje hojivé procesy působením na fibroblasty (Abbas et al. 2015).

Výše zmíněná lokální odpověď může přerůst v odpověď systémovou. Je-li produkce cytokinů vysoká, mohou se z místa zánětu dostávat do krevního oběhu a rozváděny po celém těle

předávat signál o hrozícím nebezpečí dalším buňkám. Buňky reagují na vysokou hladinu cytokinů sekrecí produktů působících na termoregulační centrum v hypotalamu (což následně vede k horečce), produkcí sérových proteinů akutní fáze (např. zvýšené hodnoty CRP) a dalších cytokinů, které umožňují mobilizaci zásob leukocytů v kostní dřeni, zejména monocytů a granulocytů (Hořejší et al. 2017).

Účelem systémové odpovědi je zvýšit intenzitu a účinnost likvidace patogena a zamezit jeho dalšímu šíření do dalších tkání a krevního oběhu. Tato mobilizace je však pro organismus velmi vyčerpávající nejen z hlediska energetického, ale i z důvodu ničivého efektu na vlastní buňky. Závažnou komplikací systémové reakce je tzv. „syndrom cytokinové bouře“: u některých jedinců, pravděpodobně predisponovaných geneticky, se může i u obvykle nezávažných infekcí vyvinout hyperzánět, kdy cytokiny vybičovaná imunitní odpověď dosáhne tak dramatického rázu, že se tělo chová jako při závažné sepsi, kdy organismus nezvládl zabránit včas množení mikroorganismů v krevním oběhu. Rovnováha mezi účinností a toxicitou imunitního systému je porušena a dochází k septickému šoku: od ucpávání cév, plicního edému, hromadění metabolických produktů, přes sníženou oxygenaci a hypotenzi až k multiorgánovému selhání a smrti (Chousterman et al. 2017).

Humorální složkou přirozené imunity je také tzv. komplement. Jedná se o soustavu několika desítek proteinů kolujících v krevním séru. Po navázání na mikrobiální struktury spolu kaskádovitě reagují třemi různými drahami, z nichž jedna je aktivována díky interakci s adaptivní imunitou (navázání protilátek). Výsledkem všech tří je štěpení posledního proteinu (C3), což vede k tvorbě prozánětlivých mediátorů a jeho C3b fragment dále působí jako opsonin (Hořejší et al. 2017).

Součástí přirozené imunity jsou také tzv. **přirozené lymfoidní buňky (ILC)**. Ty se účastní boje v časně fázi infekce především prostřednictvím vylučování cytokinů v odpovědi na stresovou signalizaci. Dělíme je na ILC-1 (potlačování intracelulárních infekcí, aktivace makrofágů, produkce kyslíkových radikálů), ILC-2 (role při infekci mnohobuněčnými parazity, rozvoj alergií) a ILC-3 (indukce zánětlivého prostředí a role v rozvoji nádorů). K této skupině pocházející z lymfoidní řady jsou nově řazeny také NK buňky („natural killer“), které kolují v krevním oběhu a svou cytotoxickou aktivitou zabíjí buňky nádorové či napadené virem. ILC jsou tak jistým předobrazem pro T-lymfocyty adaptivní imunity (Artis & Spits 2015).

### 3.1.2.3 Adaptivní imunita

Evolučním vylepšením výše popsaných základních mechanismů pro boj s patogeny je imunita adaptivní, která pracuje v souhře s imunitou buněčnou. Je založena na produkci velkého, až plýtvavého množství buněk lymfoidní řady (lymfocytů), které na svém povrchu exprimují vysoce specifické receptory namířené proti konkrétnímu antigenu. Aktivovaný lymfocyt se po setkání s antigenem klonálně množí. Po zvládnutí infekce zůstávají v těle v nízkých koncentracích jeho paměťové buňky, jejichž odpověď má při reinfekci stejným patogenem podstatně rychlejší náběh.

Dle místa vzniku a efektorových funkcí rozlišujeme populace B a T-lymfocytů. Každá z nich se dále dělí do subpopulací, vzájemně odlišitelných pomocí charakteristických povrchových markerů a exprese různých transkripčních faktorů.

Dle mechanismu působení rozlišujeme v rámci adaptivní imunity složku **buněčnou a humorální**. Složka **buněčná**, představovaná **cytotoxickými CD8+ Tc lymfocyty**, jde cestou rozpoznání cílového antigenu za účelem jeho přímé likvidace. Plní podobnou úlohu jako NK buňky.

V buňkách zprostředkujících **humorální imunitu (B-lymfocyty)** je po setkání receptoru s antigenem nastartována produkce velkého množství těchto receptorů v rozpustné, nemembránové formě. Tyto tzv. protilátky jsou sekretovány do prostředí, kde se mohou vázat na příslušné antigeny a tímto je neutralizovat. Zároveň působí jako opsoniny a usnadňují tak likvidaci patogenu buňkami přirozené imunity (Abbas et al. 2015; Alberts et al. 2017; Hořejší et al. 2017). Mohou se také vázat na Fc receptory **granulózních buněk** a po navázání antigenu je stimulovat k degranulaci (Ramasamy et al. 1974), což hraje zásadní roli v rozvoji zánětu a alergické reakce popsané v následujících kapitolách.

Další důležitou populací jsou pomocné **CD4+ Th lymfocyty**, které B-lymfocyty potřebují pro svou vlastní aktivaci a které modulují typ imunitní odpovědi prostřednictvím produkce cytokinů.

Posledním důležitým aktérem jsou **T-regulační lymfocyty** schopné potlačovat aktivitu jiných T-lymfocytů a navozovat tak toleranci vůči neškodným antigenům. Regulační lymfocyty namířené proti vlastním antigenům se diferencují v brzlíku. Na sliznicích pak dochází ke vzniku tzv. **indukovaných regulačních lymfocytů (i-Treg)**s protizánětlivým účinkem tlumícím reakce na neškodné cizí antigeny a komenzální bakterie (Beres et al. 2012).

První kontakt s antigenem zprostředkovávají lymfocytům zejména buňky přirozené imunity, nejčastěji **dendritické buňky**, které se v hojně míře vyskytují v místech největšího kontaktu s cizími antigeny (např. na povrchu sliznic). Dendritická buňka antigen pohltí, lyzuje a fragmenty peptidů poté vystaví (prezentuje) na receptorovém komplexu MHC II. Buňkou prezentující antigen (APC) však za určitých okolností mohou být i B-lymfocyty. Kromě toho má každá buňka lidského těla, je-li napadena intracelulárním patogenem či jinak vnitřně narušena, možnost poprosit o asistovanou sebevraždu cytotoxické T-lymfocyty prostřednictvím vystavení příslušných peptidů na receptorový komplex typu MHC I (Hořejší et al. 2017). Dendritické buňky jsou často zobrazovány jako jeden buněčný typ, ačkoli se ve skutečnosti jedná o několik specializovaných subtypů (Collin & Bigley 2018).

### 3.1.2.4 Lymfatický systém

Sídlem imunity je především lymfatický systém, tedy soustava lymfatických orgánů, které jsou propojeny sítí lymfatických cév. Strukturně se jedná o tkáň složenou zejména z imunitních, pojivových a epiteliálních buněk.

Mezi primární lymfatické orgány patří kostní dřeň a brzlík, jako sekundární označujeme lymfatické uzliny, slezinu a lymfoidní tkáň asociovanou se sliznicemi (MALT) (Montilla et al.

2004). Tělo je protkáno sítí lymfatických cév slepě zakončených ve tkáních, jejichž primárním úkolem je odvádět z nich přebytečné množství tekutiny prosakující z krevního oběhu, tzv. tkáňového moku (lymfy). Nejedná se tedy o uzavřený systém jako v případě cévní soustavy. Tekutina díky svalovým stahům a podtlaku proudí dále skrze lymfatické uzliny, které jsou cévami navzájem propojeny do řetízkových útvarů. V uzlinách se shromažďují imunitní buňky do dobře pozorovatelných útvarů. Drobné cévy se posléze sbíhají do dvou větších kmenů a tekutina z nich je absorbována zpět do krevního oběhu v místě nejnižšího tlaku v podklíčkové žíle, blízko vstupu žíly do srdce. Buňky lymfatických cév na sebe nedoléhají příliš těsně, což umožňuje průchod větších částic a do lymfatických uzlin jsou tak z tkání vyplavovány také patogeny (Čihák et al. 2016).

Lymfatická uzlina je fazolovitý útvar krytý kolagenním pouzdrzem. Uvnitř uzliny se nachází řídké síťovité vazivo, mezi kterým se pohybují volné buňky. Lymfocyty jsou zde pomocí chemokinové signalizace rozděleny do výrazně odlišitelných zón. Niternou částí je parakortex, kde se usidlují především T-lymfocyty, které vnikají do těchto prostor z krevního oběhu extravazací skrze vysoký endotel postkapilárních venul stejně jako ostatní druhy bílých krvinek. V kortexu, kolem T-buněčné zóny, jsou soustředěny útvary zvané lymfoidní folikuly (B-buněčná zóna). Mezi svrchní kapsulou a kortikální částí se nachází dutina (subkapsulární sinus) vyplněná lymfou, kam ústí aferentní lymfatická céva. Lymfa proudí částečně tímto prostorem, částečně skrze folikuly a T-zónu a odtéká eferentní lymfatickou cévou (Abbas et al. 2015; Murphy & Weaver 2016)

### 3.1.2.5 Vývoj T a B lymfocytů

Všechny bílé krvinky mají původ v hematopoetických kmenových buňkách v kostní dřeni. Tyto dále diferencují na různé populace. Jedna z nich, lymfoidní prekurzory, dává vzniknout buňkám lymfoidní řady – B-lymfocytům, T-lymfocytům, NK buňkám a pravděpodobně dalším typům, které v posledních letech odhalují metody single cell analýzy (Villani et al. 2017).

T-lymfocyty během prenatálního vývoje migrují do **brzlíku** - malého orgánu v hrudním koši, kde se podrobují procesu přísné klonální selekce. Negativní selekce spočívá v navození apoptické smrti těch T-lymfocytů, které svými receptory rozpoznají antigen tělu *vlastní*, prezentovaný místními APC na MHC komplexu. Pozitivní selekce je procesem eliminace T-lymfocytů, které vykazují ke komplexu s peptidem afinitu tak nízkou, že jejich receptor (TCR) je považován za nefunkční. Tím se tělo zbavuje jak autoreaktivních, tak vazby neschopných buněk. Nechtěné selekci klonů s afinitou k *cizímu* antigenu zabraňuje hematohymická bariéra, která izoluje místo vývoje od krevního oběhu (Murphy & Weaver 2016). Pro zajištění prostředí, ve kterém se T-lymfocyty budou moci setkat i s antigeny netypickými pro brzlík, je nutno u některých buněk odblokovat přísně regulovanou expresi typickou pro tkáňově diferencovanou buňku. Toto se děje v medulárních epiteliálních buňkách prostřednictvím proteinu AIRE (Gardner et al. 2009).

T-lymfocyt exprimuje na svém povrchu různé kostimulační receptory a povrchové znaky. Bude-li se buňka vyvíjet dále směrem k cytotoxickým lymfocytům závisí na tom, setká-li se v thymu s antigenem vystaveným na MHC I nebo ne. Pokud ano, zachová si povrchový znak CD8,

zatímco neaktivovaný z povrchu zmizí a buňka mající pouze CD4+ se stane prekurzorem Th lymfocytů (Hořejší et al. 2017).

V thymu vznikají také tzv. T-regulační lymfocyty (T-reg). Jedná se o autoreaktivní klony, které se vyznačují expresí transkripčního faktoru Foxp3 a působí ve tkáních jako supresory - kompetují s potenciálně autoreaktivními buňkami a produkují tlumivé cytokiny jako TGF beta a IL-10 (Murphy & Weaver 2016).

Uvádí se, že až 98 % buněk fázi klonální selekce neprojde a je v thymu degradováno (Hořejší et al. 2017). I přesto, že zbylá část lymfocytů pokračující do krevního oběhu představuje jen zlomek z původního množství, je variabilita těchto T receptorů obrovská. Tyto tzv. **naivní T-lymfocyty** volně cirkulují krevním oběhem, sekundární lymfatickou tkání a lymfatickými cévami a čekají na svůj antigen. Řada z nich se do žádné imunitní reakce nikdy nezapojí (Abbas et al. 2015).

Vývoj B-lymfocytů probíhá v kostní dřeni, kde dochází k rekombinaci a skládání těžkých a lehkých řetězců do membránového receptoru prvopočátečního typu IgM. Nezralé B-lymfocyty zde podléhají selekci, v níž jsou eliminovány buňky autoreaktivní či s nefunkčními receptory, ale na rozdíl od T-ly mohou být před apoptózou zachráněny několika novými pokusy o přeskupení genů pro lehký řetězec (tzv. receptorový editing). Z kostní dřene putují buňky do krve a dostávají se do lymfatických uzlin stejnou cestou jako T-lymfocyty, odkud mohou dále kolovat mezi uzlinami, lymfou a krevním oběhem (Murphy & Weaver 2016).

### 3.1.3 Průběh infekce

Mikroorganismy a cizí částice, které se do těla dostávají většinou skrze sliznice nebo drobné kožní oděrky, jsou co nejrychleji likvidovány prostředky přirozené imunity, zejména fagocytózou. Pokud do jisté míry nadřazené mechanismy přirozené imunity selhávají, nastupuje adaptivní protilátková odpověď. Poté, co nezralá dendritická buňka pohltí antigenní částici a vystaví její peptid na svých MHC II receptorech, za postupného zrání migruje z periferie do některé z lymfatických uzlin. Zde se dostává do kontaktu s naivními pomocnými T-lymfocyty (CD4+) a indukuje jejich přeměnu na efektorové Th lymfocyty, které dále proliferují (Hořejší et al. 2017). Dendritická buňka (DC) může či nemusí projít aktivací. Aktivovaná DC pak stimuluje Th lymfocyty směrem k typům způsobujícím zánětlivou odpověď, zatímco nezralá DC indukuje tvorbu Th s tlumivými a regulačními funkcemi (Dalod et al. 2014). Chování DC je ovlivněno okolním cytokinovým prostředím, které je směsí stimulačních, inhibičních, podpůrných a jiných druhů signálů, vylučovaných okolními buňkami - epitelem, makrofágy, granulocyty a dalšími imunitními buňkami. Tato signalizace je klíčovým momentem rozvoje správné imunitní reakce - systém stojí na pomyslné křižovatce a směr, kterým se vydá, může být ovlivněn nejen skutečným patogenním poškozením, ale také genetickými predispozicemi, či přidáním různých adjuvans (Lozano-Ojalvo et al. 2019). Aby v T-buňkách došlo k nahromadění dostatečného impulsu pro spuštění signálních kaskád vedoucích k diferenciaci do některého z Th subtypů, je zapotřebí nejen kontaktu komplexu MHC II - peptid a T-receptoru, ale také mnoha dalších



koreceptorů a membránových ligandů na obou buňkách, jejichž spojení se souhrnně říká imunologická synapse (Murphy & Weaver 2016).

### 3.1.3.1 Typy Th lymfocytů

Vznik **Th1**, indukovaný zejména přítomností IL-12, je odpovědí na intracelulární parazity. Th1 lymfocyty produkují např. IFN- $\gamma$ , čímž aktivují makrofágy a podporují diferenciaci cytotoxických lymfocytů (Carli et al. 1994). Aktivované makrofágy spouští signální kaskádu STAT1 a stimuluje lokální zánět rekrutací neutrofilů a NK buněk. Tyto makrofágy pak také dokáží účinněji bojovat proti parazitům přežívajících ve fagozomech (Abbas et al. 2015).

**Th2** diferencují za přítomnosti IL-4 za účelem obrany proti větším, extracelulárním parazitům (Carli et al. 1994). Exprimují faktor GATA3, který aktivuje produkci IL4 a IL13 prohlubující spolupráci s makrofágy, bazofily, eozinofily a makrofágy. Tento typ je spojen s alergickou reakcí, protože IL-4 vyvolává v B-buňkách přesmyk k produkci protilátek typu IgE (Finkelman et al. 1988).

**iT-reg**, čili indukované T-regulační lymfocyty, tvoří velmi důležitý buněčný podtyp, jehož regulační funkce spočívá v aktivním navozování orální tolerance při setkání s neškodnými antigeny (Beres et al. 2012). Vývoj do tohoto subtypu je podmíněn příznivým cytokinovým prostředím (zejména TGF- $\beta$ ), bez alarmujících zpráv okolních buněk o příchodím nebezpečí (Yang et al. 2016). Více o iT-reg pojednává kapitola 3.1.6 Indukce slizniční tolerance.

**Th17** vznikají díky IL-6 a TGF- $\beta$ . Sekretují IL-17, velmi prozánětlivý cytokin podporující migraci neutrofilů. Je účinný v boji proti extracelulárním parazitům a plísním. Zajímavé je, že TGF- $\beta$  indukuje expresi jak Foxp3, tak receptoru kyseliny retinové ROR- $\gamma$ -t, který je také transkripčním faktorem iTreg. Bude-li z Foxp3 + ROR- $\gamma$ -t + buňky Th17 nebo iTreg závisí na množství TGF- $\beta$ . (Yang et al. 2016).

**Tfh** jsou buňky poskytující pomocné signály B-lymfocytům.

Poměrně nedávno objevenou populací je **Th9**. V mnoha ohledech se podobá Th2, ale produkuje IL-9, jehož přítomnost se zdá být jedním z markerů přítomných u alergiků (Soroosh et al. 2009).

### 3.1.3.2 Pohlcení antigenu B buňkou

Paralelně s výše uvedeným procesem se s antigenem zároveň setkává i B-buňka. Antigen, často již opsonizovaný, se společně s lymfou dostává do subkapsulárního sinu uzlin a na hranici s folikulem je zachycen speciální populací SDS makrofágů (Abbas et al. 2015). Zdá se, že tyto makrofágy antigen nefagocytují, ale váží jej přes své komplementové receptory a předávají dovnitř folikulu na FDC (folikulární dendritické buňky), které opět slouží pouze jako dlouhodobější povrchové skladiště udržující antigen v nativním stavu na povrchu buňky. Touto fixací antigenu ve folikulu je získán čas pro zvýšení pravděpodobnosti setkání se správným B-lymfocytem (Kuka et al. 2014). Antigen je B-lymfocytem pohlcen, rozštěpán na fragmenty a vystaven na MHC II komplexu stejně jako v případě dendritické buňky. V tomto stavu migruje

buňka na hranici mezi folikulem a T-zónou, kde vyčkává na příchod Tfh. Efektorový Tfh lymfocyt migruje po koncentračním gradientu chemokinů na tutéž hranici díky vlastnictví chemokinového receptoru CXCL6. To významně zvyšuje pravděpodobnost setkání těchto dvou antigenně specifických buněk (Shi et al. 2002) vedoucí k aktivaci B buněk a produkci specifických protilátek.

### 3.1.3.3 Produkce protilátek

Aby byl B-lymfocyt schopen sekrece protilátek, musí proběhnout vzájemná stimulace mezi ním a Thf lymfocytem. To se děje nejen skrze kontakt T buněčného receptoru s prezentovaným antigenem, ale nutný je také tzv. „druhý signál“ přes receptor CD40 - CD40 ligand (Hořejší et al. 2017). Rozlišujeme primární a sekundární protilátkovou odpověď, fáze obvykle následující těsně za sebou. Ze správně stimulovaného B lymfocytu se stává plazmocyt, buňka se dělí a pomnožené klony produkují první vlnu protilátek. Tyto produkty primární odpovědi jsou většinou protilátky výchozího typu IgM, s nízkou afinitou vůči antigenu. Kvalita protilátek se nicméně v průběhu imunitní odpovědi zvyšuje. Některé klony B lymfocytů (mechanismus výběru zatím není znám) se totiž vrací zpět do nitra folikulu a vstupují do germinální reakce (Alberts et al. 2017).

V mikroskopem dobře pozorovatelné tmavé zóně dochází k proliferaci těchto buněk provázené náhodnými bodovými mutacemi ve variabilních (V) částech Ig řetězců. Díky tomu se původní identické klony od sebe začnou mírně lišit stavbou svých B-receptorů, jejichž prostřednictvím kompetují o vazebné místo na omezeném množství nativního antigenu zachyceného na povrchu folikulárních dendritických buněk (Murphy & Weaver 2016). Pohltit antigen, prezentovat jeho část na povrchu Thf pomocným buňkám a tím projít selekcí tak mohou pouze ty nejúspěšnější klony, zatímco ostatní hynou. Výsledkem tohoto procesu, známého též pod názvem **afinitní maturace**, jsou plazmatické buňky produkující až o několik řádů kvalitnější, vysokoafinitní protilátky. Tyto buňky migrují zpět do kostní dřeně a protilátky odsud uvolňují do cirkulace. Některé diferencují v **paměťové B-buňky**, které osidlují sekundární lymfatické orgány a v případě nové infekce stejným patogenem dokáží zareagovat rychleji než naivní B-lymfocyty. Díky expresi anti-apoptotických faktorů mají velmi dlouhou životnost. Mechanismy, jakými se tak děje, jsou předmětem intenzivního výzkumu (Good-Jacobson et al. 2018).

### 3.1.3.4 IgE reakce

V reakci na mnohobuněčné parazity kdy převládne Th2 odpověď je prostřednictvím působení cytokinu IL-4 zahájen **přesmyk na IgE**. IgE byl objeven na konci 60.let, dlouho po identifikaci ostatních typů imunoglobulinů (Bennich et al. 1968) a tento objev konečně pomohl lépe pochopit podstatu reakce sérových proteinů na antigen při alergické reakci (Llewelyn et al. 1992).

Sekretované protilátky přisedají svou Fc částí na vysokoafinitní receptory, kterými jsou pokryté granulózní buňky (Siraganian & Hazard 1979). Při novém setkání s parazitem se ukotvené protilátky naváží na jeho odpovídající epitopy, kterých je na jednom patogenu obvykle

větší množství, neboť se zpravidla jedná o opakované strukturní motivy. To spouští signální kaskády vedoucí k degranulaci: lipidové váčky naplněné prozánětlivými mediátory splývají s buněčnou membránou a vypouští obsah granulí do mezibuněčných prostor. V tzv. časně fázi jsou to zejména histamin, heparin, enzym tryptáza a kininogéaza. Patogeny nepoškozují přímo - význam tkví především v signalizaci (Murphy & Weaver 2016).

Tzv. **časná fáze** je charakteristická rozvojem příznaků, jako je stažení hladkého svalstva (např. stěn průdušek), pocity svědění a dráždění a kožní pnutí v důsledku aktivace nociceptivních neuronů, zvýšení sekrece hlenu a další projevy lokálního zánětu.

Po 4-12 hodinách následuje plynulý přechod do **pozdní fáze** v důsledku aktivace fosfolipázy A v přemostěných granulocytech, která katalyzuje hydrolýzu kyseliny arachidonové z fosfolipidů (Hořejší et al. 2017). Její metabolity (prostaglandiny, tromboxany, leukotrieny) způsobují chemotaxi dalších imunitních buněk, zejména eozinofilů. Ty jsou schopny obalit povrch parazita a enzymaticky jej poškozovat obsahem svých granulí (Fuchs et al. 2016).

### 3.1.4 Imunopatologické reakce

Imunopatologickou je reakce nazvána v případě, kdy imunitní systém využívá některý ze svých obranných mechanismů k účelům, pro které není určen – zejména k potírání vlastních nebo neškodných antigenů (Hořejší et al. 2017).

Klasicky učebnicově se rozdělují dle klasifikace Coopse a Gella na čtyři základní typy dle jejich etiologie. Tato klasifikace podstoupila od své doby vydání mnohé revize (Rajan et al. 2003), ale pro účely této práce podrobnosti nejsou podstatné.

**Reakce I. typu** je zprostředkována výše popsaným mechanismem spráženým s IgE protilátkami a je tak zodpovědná za většinu alergických reakcí.

Při prvním setkání s neškodným antigenem začne organismus k alergiím náchylného jedince (atopika) uplatňovat stejnou strategii jako při setkání s mnohobuněčnými parazity. Dochází k maturaci DC, tvorbě Th2 a izotypovému přesmyku pod vlivem IL-4 a produkci protilátek IgE, které volně cirkulují v krvi nebo se váží na Fc receptory mastocytů a bazofilů (Finkelman et al. 1988). Tento proces je označován jako primární senzibilizace, kdy ještě nedochází k rozvoji příznaků, ale v krvi jsou již detekovatelné protilátky. Při opětovném vystavení antigenu probíhá nejen sekundární tvorba nových protilátek, ale dojde také k degranulaci výše zmíněných buněk (Abbas et al. 2015). Následuje rozvoj příznaků časně a pozdní fáze. Komplikací může být rozvoj eozinofilního zánětu u potravinových alergií, jelikož tyto buňky migrují zejména do plic a trávicího traktu, kde v nepřítomnosti parazita pohlcují komplexy protilátka-antigen a způsobují v tkáních četné strukturní změny (Bosquet et al. 1990).

V závažných případech může dojít k **anafylaxi**. Jedná se o život ohrožující stav, systémový zánět, způsobený nebezpečně vysokou koncentrací prozánětlivých mediátorů v krvi, který je ve svých důsledcích podobný septickému šoku: vazodilatace, hypotenze, nedokrvění orgánů, ztráta vědomí až smrt. V 80-90 % případů (Fuchs et al. 2016) se objevuje urtikarie a angioedém horních cest dýchacích.

**V reakci II. typu** jde především o zacílení IgG a IgM protilátek proti vlastním antigenům nebo jejich alelickým variantám. Takto navázané protilátky pak mohou svými Fc částmi aktivovat cytotoxické mechanismy, což je případ např. hemolytické nemoci novorozenců nebo

transfuzí od dárců s jinou krevní skupinou (Abbas et al. 2015). Účinek protilátek může být také blokační - svou vazbou a kompeticí s ligandy mohou měnit, zesilovat či zeslabovat fyziologickou aktivitu membránových receptorů a volných enzymů. Známe jsou např. protilátky proti inzulinovému receptoru vedoucí k vzácným formám diabetu mellitu nebo případy mužské a ženské neplodnosti způsobené protilátkami proti oocytům a spermii (Nash & Menge 1994).

**Reakce III. typu** je založená na tvorbě IgG-antigen imunokomplexů, zejména u částic v nadměrné dávce, které jsou obtížně fagocytovatelné. Imunokomplexy se mohou ukládat ve tkáních a působit zde jako prozánětlivý atraktor imunitních buněk (Fuchs et al. 2016). Jako typické případy lze uvést revmatoidní artritidu (protilátky proti Fc fragmentům jiných protilátek) nebo tzv. sérovou nemoc, rozšířenou zejména v době před vynálezem antibiotik, kdy často jedinou možností byla terapie sérem z imunizovaného zvířete (Wuthrich et al. 2014).

**Reakce IV. typu**, známá též jako DTH (delayed type hypersensitivity) má oproti předchozím třem typům původ v buněčné imunitě stimulované **Th1** lymfocyty (Carli et al. 1994). Ty vznikají jako výsledek prvotní senzibilizace. Při opakovaném kontaktu s antigenem dochází nejprve k migraci Th1 lymfocytů do postiženého místa, kde sekretují IFN  $\gamma$  vedoucí k aktivaci makrofágů a spuštění zánětu. To vyžaduje delší čas (1-3 dny), z čehož pramení „opožděnost“ reakce (Fuchs et al. 2016). V místě se tvoří tvrdý otok. Test podkožkového vpichu založený na DTH je využíván pro zjišťování stavu buněčné imunity proti mykobakteriím způsobujícím tuberkulózu. Tento tzv. tuberkulinový test byl v minulosti využíván pro diagnostiku některých alergií, avšak později byl modifikován na povrchové kožní prick testy (Wuthrich et al. 2014). Zapojeny do této reakce však mohou být také Th2 lymfocyty (Wasik et al. 2019).

### 3.1.5 Slizniční imunita

Většina míst, kterými tělo přichází do kontaktu s antigeny je kryta sliznicemi.

Mucosa associated lymphoid tissue (MALT, lymfoidní tkáň asociovaná se sliznicemi) patří mezi sekundární lymfatické orgány a společně s lymfatickými uzlinami a slezinou je místem indukce imunitní odpovědi (Montilla et al. 2004). Najdeme ji v různých modifikacích pod povrchem slizničního epitelu, pod lamina propria v gastrointestinálním traktu (GALT), urogenitálním traktu, vývodech žláz i v dutině ústní a nasofaryngeální (Brandtzaeg 2011). B- a T-lymfocyty stimulované v určité slizniční lokalitě často exprimují na svém povrchu membránové integriny, které slouží jako tzv. homing-markery umožňující zpětný návrat do této „domovské tkáně“ (Johansson-Lindbom & Agace 2007).

#### 3.1.5.1 Gut-associated lymphatic tissue

GALT (Gut-associated lymphatic tissue) je nejpodrobněji prozkoumanou periferní lymfatickou tkání a z hlediska výzkumu jakýmsi vzorem pro odvozování funkce ostatních, které se liší pouze v drobných detailech. Je spojena zejména se střevy. Lymfoidní folikuly zde mohou být buď volně roztroušeny v prostoru pod lamina propria nebo všechny buňky tvoří společně organizované struktury označované jako Peyerovy pláty, což je případ zejména tenkého střeva. Peyerovy pláty mají velmi podobnou strukturu jako lymfatická uzlina, ovšem postrádají kapsulu

a jsou přímo asociovány s jednovrstvným epitelem, který odděluje vnitřní prostor od lumen střeva. Na rozdíl od lymfatické uzliny je zde tak k antigenům velmi blízko. Anatomii Peyerových plátů se podrobněji zabývali Mowat et al.(2003).

V oblasti Peyerových plátů jsou mezi epiteliálními buňkami také M-buňky, které pohlcují tekutinu z lumen střeva. Za pomoci váčků (transcytózou) ji transportují dovnitř a poskytují tak vzorky antigenů přítomným antigen prezentujícím buňkám (zejména DC) (Abbas et al. 2015). Některé subpopulace dendritických buněk se vyskytují mimo oblasti plátů a vychytávají antigen přímo z lumen svými výběžky vmezeřenými mezi epitel. V lamina propria se nacházejí T-lymfocyty vykazující fenotyp paměťových T-buněk, které po kontaktu pravděpodobně poskytují pomoc B-lymfocytům k produkci protilátek (Zeitz et al. 1991).

### 3.1.5.2 O-MALT: Oral mucosa-associated lymphatic tissue

O-MALT je lymfatická tkáň asociovaná s dutinou ústní, zahrnující bukální sliznice, slinné žlázy a periferní části Waldeyerova mízního okruhu. Na rozdíl od GIT zde krycí vrstvu tvoří vícevrstvý šupinový epitel. Kritickou vstupní branou infekce zde mohou být především prostory okolo zubů. M buňky, typické pro střevní epitel, zde byly detekovány pouze v oblasti mandlí (Wu et al. 2014). Pro ústní dutinu je charakteristická přítomnost slin, obsahujících imunoglobuliny (např. sekretované IgA), antimikrobiální peptidy atd. (Sahasrabuhide et al. 2004).

Dalšími specializovanými místy jsou pak NALT (nasopharynx-associated lymphoid tissue, lymfatická tkáň asociovaná s nasofaryngeální oblastí) (Brandtzaeg 2011) nebo SALT (skin-associated lymphoid tissue, lymfatická tkáň asociovaná s kůží) (Quaresma et al. 2019).

### 3.1.6 Indukce slizniční tolerance

Antigenní nálož takového rozsahu, s jakým se sliznice setkávají, by při absenci regulačních mechanismů zákonitě vedla k totální destrukci organismu permanentně zažívanými záněty.

Je proto výhodnější, platí-li pro každý přichozí antigen presumpce nevinny, kdy výchozí odpověď sliznice je vždy **tolerance**. Zásadním zprostředkovatelem této tolerance jsou dendritické buňky (DC), které setrvávají v lamina propria v nezralém stavu a řídí se pravidlem: nebezpečné je pouze to, co má potenciál poškozovat nebo přímo poškozuje. DC na svém povrchu exprimují celou řadu receptorů, které reagují na přítomnost a koncentraci molekul z okolního prostředí, zejména cytokinů a růstových faktorů. Intenzivní mezibuněčné komunikace se účastní přítomné imunitní buňky, buňky slizničního epitelu a výsledky některých studií naznačují, že je zapojena i střevní mikrobiota. Kombinace těchto signálů aktivuje různé signální dráhy uvnitř DC a ovlivňuje tak genovou expresi vedoucí k regulatornímu nebo prozánětlivému fenotypu(Murphy & Weaver 2016).

Za normálních okolností převažuje vysoká koncentrace cytokinů IL-6, TGF- $\beta$ , IL-10 a prostředí je bohaté také na další protizánětlivé faktory jako kyselina retinová nebo enzymIDO (Abbas et al. 2015).

Napadené, poškozené nebo nekrotizované epiteliální buňky, stejně jako infekcí aktivované makrofágy, granulocyty aj. svou změněnou sekrecí způsobí vychýlení obvyklých

poměrů těchto a dalších látek jako např. alarminů. Pohltí-li dendritická buňka antigen v takovémto prostředí, získá potřebný stimul pro expresi povrchových znaků, charakteristických pro zralou dendritickou buňku. Maturace probíhá během cesty do spádových lymfatických uzlin, kde DC posléze indukuje tvorbu odpovídajících populací Th-lymfocytů v závislosti na druhu nebezpečí (Dalod et al. 2014).

Další možností, jak navodit maturaci DC, je zachycení některé z dobře známých bakteriálních struktur na povrchu DC přes receptor, který je rozeznává (lektiny, Toll-like receptory, NOD-like receptory a další). I zde je však důležitá přítomnost dalších podnětů z okolí (Hasegawa & Matsumoto 2018).

V nepřítomnosti signálů asociovaných s nebezpečím zůstává dendritická buňka v nezralém stavu i po pohlcení antigenu a migraci do uzlin, což má za následek tvorbu indukovaných T-regulačních lymfocytů. Ukazuje se, že tolerancebýt navozena také tvorbou anergických (nereaktivních) klonů Th buněk nebo přímým spuštěním apoptózy v daném klonu naivního T-lymfocytu (Hasegawa & Matsumoto 2018).

Roli hrají také IgA protilátky, které jsou sekretovány do střevního lumen, kde obalují některé komenzální bakterie a brání jim tak v kontaktu se sliznicí. Hořejší et al. (2017) uvádí, že tyto bakterie tím nejsou nijak omezovány ve svých životních funkcích a mohou dále symbioticky působit.

IgA protilátky mohou být produkovány buď závisle nebo nezávisle na T-lymfocytech. První zmíněný způsob se děje skrze „pathogen-recognize“ receptory na povrchu B-buněk, druhý způsob závisí na přesmyku k nízkoafinitním IgA protilátkám v B-buňkách v prostředí bohatém na IL-21 a TGF- $\beta$  (Chorny et al. 2010).

Vznik orální tolerance zůstává stále předmětem intenzivního výzkumu. Navzdory novým poznatkům z posledních deseti let není tento mechanismus blíže objasněn a je spíše dále komplikován objevy stále nových aktérů, zejména souvisejících s mikrobiomem (Kubinak et al. 2015).

Narušení těchto procesů může vést k rozvoji alergické reakce (Abbas et al. 2015).

### 3.1.7 Alergická reakce

Dle doporučené definice Světové zdravotnické organizace se za **alergii** považuje „(...) reakce přecitlivělosti navozená imunologickými mechanismy, zahrnující složku protilátkovou i buněčnou. Ve většině případů patří protilátky specificky odpovědné za alergickou reakci k třídě IgE“ (WHO/EAACI 2003).

V současné době trpí nějakou formou alergie 10 - 30 % světové populace. Spouštěčem může být široká řada alergenů: prach, zvířata a roztoče, hmyzí bodnutí, latex, plísňe, pyl, potraviny, léky i některé kovy (WAO 2013).

S alergií dále souvisí pojem **atopie** a tyto dva termíny jsou často nesprávně zaměňovány. Hořejší et al. (2017) definuje atopii jako „geneticky podmíněnou tendenci jedinců odpovídat na expozici nízkým dávkám běžných alergenů zevního prostředí nadměrnou tvorbou specifických protilátek IgE“ a vysvětluje IgE-zprostředkovanou alergii jako fenotypický projev atopického genotypu.

Stejně jako v případě jiných fenotypových znaků nemá ani alergie v populaci stoprocentní penetraci a expresivitu. Jedná se o složitou souhru mnoha faktorů genetiky a prostředí na úrovni atopického jedince i zdroje alergenu (Vegro et al. 2016). Atopici mohou mít v krvi antigenně specifické IgE protilátky a přesto být klinicky zcela bez příznaků (Boyce et al. 2011) a to až v poměru 10:1 (Fuchs et al. 2016).

Senzibilizace probíhá prostřednictvím kontaktu alergenů s kůží, sliznicí dýchacích cest při inhalaci aeroalergenů a sliznicí trávicího traktu.

Velmi neobvyklý způsob senzibilizace prostřednictvím přísátého klíštěte byl odhalen u alergie na červené maso (Fuchs et al. 2016).

### 3.1.7.1 Příznaky alergie

Většina běžných alergenů způsobuje klasickou, Th2 zprostředkovanou odpověď I. typu. Závažnost této reakce je určována především stabilitou daného proteinu (Pekar et al. 2018). Některé potravinové alergeny vykazují vysokou odolnost vůči trávicím enzymům a kyselé denaturaci, což vysvětluje jejich působení ve střevech (Wiesha & Bettoni 2010). Lokálním výsledkem působení mediátorů střevních mastocytů je zvýšená peristaltika, břišní diskomfort, zvýšená sekrece tekutin buňkami, zvracení a průjem. Tyto reakce se objevují v raném dětství a v dospělosti často vymizí. U těchto alergenů je také větší pravděpodobnost spuštění systémové reakce, které mohou přerůst do anafylaxe (Fuchs et al. 2016).

Labilní potravinové alergeny rychle ztrácející konformaci vyvolávají pouze lehčí příznaky jako alergická rhinitida, pocit podrážděného krku, svědění v očích a na rtech či mírná kopřivka při kontaktu s kůží. Zvláštní kategorií je tzv. orální alergický syndrom (Carlson & Coop 2019) asociovaný s pylem, popsáný již na počátku této kapitoly, kdy jedinec, senzibilizovaný pylovým aeroalergenem, pociťuje po kontaktu s homologním proteinem některého ovoce či zeleniny lehké příznaky alergie na rtech, jazyku a v ústní dutině (Ebner et al. 1991).

U reakcí na aeroalergeny jsou požadavky na stabilitu nižší, protože ke kontaktu dochází hned po vdechnutí na sliznici dýchacích cest a jedná se většinou o mikroskopická zrnka, kde k uvolnění alergenu dochází velmi časně (Behrendt & Becker 2001). I v lokálním měřítku tak může docházet k závažnějším reakcím jako alergická konjunktivitida, kašel a obstrukce dýchacích cest. Opakovaná expozice alergenům může vést k chronickému zánětu dýchacích cest známému jako astma bronchiale (Dekker et al. 2014).

Mezi kožní projevy alergie patří urtikarie a ekzém (Fuchs et al. 2016).

### 3.1.7.2 Původ alergie

Alergie má šanci rozvinout se pouze jsou-li splněny tyto dvě podmínky:

- schopnost antigenu působit alergenně, což souvisí s jeho velikostí, strukturou a hmotou, která jej obklopuje, což bude detailněji rozebráno v kapitole 3.2.
- narušená způsobilost imunitního systému navodí orální toleranci vedoucí k simulaci reakce na vstup domnělého mnohobuněčného parazita (Chinthrajah et al. 2016).

Zapojují se vlivy genetické a epigenetické (Abrahamsson et al. 2015; Harb & Renz 2015), environmentální (doprovodná infekce, znečištění ovzduší) i společenské (zvýšená hygiena, změna stravovacích návyků, migrace) (D'Amato et al. 2010; Castelain 2011).

K narušení integrity slizničních bariér může dojít v důsledku pozměněného epitelu náchylnějšího k poškození, a to buď z příčiny vnější (kouřením, respirační infekce) nebo vnitřní (genetické predispozice), případně kombinací obou. Cytokinové prostředí pro maturaci DC se pak tvoří na základě signalizace skutečně poškozených epiteliálních buněk (Sugita et al. 2018). Bylo prokázáno, že jedinci trpící atopickou dermatitidou jsou více náchylní k senzibilizaci potravinovými alergeny skrze kontakt s kůží (Martin et al. 2015). Významným mediátorem je TSLP, který působí přímo na rekrutaci bazofilů (raný zdroj IL-4.) (Leyva-Castillo et al. 2013). Rozvolněné mezibuněčné spoje např. ve střevním epitelu umožňují vstup většího množství antigenního materiálu a tolerogenní rovnováha může být vychýlena signalizací makrofágů (Tettamanti et al. 2018). Nové výzkumy poukazují na vliv ILC (Sugita et al. 2018).

Buňky mohou být k produkci alarminů stimulovány i bez zevního poškození některými složkami potravy nebo toxinů různého původu, které slouží jako tzv. adjuvans a dojde-li k podání neškodného antigenu ve stejném místě a okamžiku, může dojít k senzibilizaci (Lozano-Ojalvo et al. 2019). Smith et al. (2017) vyslovuje „false alarm“ hypotézu, která vidí jako jednu z příčin vzrůstu alergií západní styl stravování s přemírou smaženého masa, olejů, sýra a především cukru. Takovéto potraviny obsahují velké množství AGE (produktů pokročilé glykace), které mohou působit jako falešné alarminy.

Cytokinového prostředí směřujícího k maturaci DC a indukci Th2 odpovědi může být dosaženo také mutacemi v genech příslušných cytokinů nebo dalších genů zainteresovaných v této signalizaci - receptorů, adaptorových proteinů, transkripčních faktorů atd.

Jedním z markerů, který odlišuje alergiky od zdravých jedinců je zvýšená exprese IL-9, produkovaného v první fázi především mastocyty. Ty jsou také raným zdrojem další z klíčových prozánětlivých molekul - IL-4 (Chen et al. 2015). Aktivace mastocytů je spojena s alarminy (Tettamanti et al. 2018).

Mutace v inhibiční doméně receptoru pro IL-4 vede u myších modelů *in vivo* k abnormálnímu vzrůstu IgE protilátek a indukci astmatu a potravinové alergie na podané alergeny (Tachdijan et al. 2010). Nadměrná produkce IL-4 vede nejen k supresi vzniku iT-Reg lymfocytů, ale i k jejich přímému přeprogramování na buňky podobné Th2 lymfocytům, produkující další nálož IL-4 a neschopné navodit toleranci (Rivas et al. 2015). Studie těchto autorů na dětech alergických na mléko dále potvrdila, že jsou tyto reprogramované fenotypy přítomné u potravinových alergiků.

Pokles indukce T-reg lymfocytů může být způsoben také změnami v drahách zapojených do produkce TGF- $\beta$  a IL-10. Poruchy v sekreci intraepiteliálních buněk (významní producenti TGF- $\beta$  a IL-10 na sliznicích) nebo pohárkových buněk (ovlivňuje TGF beta produkci jiných buněk) mohou přispět k cytokinové nerovnováze (Cheroutre et al. 2011; McDole et al. 2012).

Pro správný vývoj iT-reg lymfocytů je zcela klíčovým transkripčním faktorem Foxp3. Vyřazení tohoto genu je spojeno s rozvojem silné potravinové alergie u myších modelů (Torgerson et al. 2007). Práce Yang et al. (2016) vyzdvihuje význam jedné z iT-reg subpopulací



exprimující jak Foxp3, tak znak ROR- $\gamma$ t (spojený především s Th17 lymfocyty), jehož delece významně brání vzniku orální tolerance nejen k potravinovým alergenům, ale také ke komenzálním bakteriím ve střevě narušením produkce IgA protilátek (Abdel-Gadir et al. 2019).

### 3.1.7.3 Vliv mikrobiomu

Novým a velmi zajímavým odvětvím výzkumu se ukazuje být hledání vztahů mezi imunitním systémem a právě touto **komenzální mikrobiotou**. Pozornost je upřena zejména na GIT, ale interakce s mikrobiomem probíhá také v respiračním traktu (Man et al. 2017) a na kůži (Grice et al. 2008). Dysbióza čili narušení této symbiózy může vést k poruchám orální tolerance a naopak, což dokazují četné studie zejména na bezmikrobních zvířatech.

Studie provedená skupinou Azad et al. (2015) zaměřená na zkoumání mikrobiální diverzity u kanadských dětí ukázala, že snížená diverzita v raném věku (3 měsíce) dvojnásobně zvyšuje riziko potravinové senzibilizace v pozdějším věku (1 rok). U těchto dětí byl oproti zdravým jedincům zároveň patrný vzrůst počtu kolonií čeledi *Enterobacteriaceae*, doprovázený nižším zastoupením čeledi *Bifidobacteriaceae*.

Prokazatelně snížená produkce IgA u potravinových alergiků narušuje vztahy i se zbylýmikomenzály, což je varovným signálem, že potravinová alergie je spojena s daleko širším prolomením orální tolerance, než bylo původně předpokládáno (Kubinak et al. 2015).

Výzkumy z posledních deseti let prokázaly, že střevní bakterie se mezi sebou dorozumívají prostřednictvím tzv. „quorum sensing“ látek a navzájem tak synchronizují expresi celého mikrobiomu (Swift et al. 2000). Mikrobiomem se rozumí soubor genů všech mikrobiálních genů dohromady nezávisle na taxonomické příslušnosti. Ukazuje se však, že čilá komunikace probíhá též mezi bakteriemi a buňkami lidského těla jako např. epiteliálními buňkami nebo makrofágy (Thomas & Versalovic 2015). Podstata této komunikace vedoucí k toleranci prozatím zůstává spíše neznámá. Některé z možných způsobů navrhuje Stephen-Victor & Chatilla (2019).

Mortha et al. (2014) odhaluje spolupráci mezi buňkami přirozené a adaptivní imunity zprostředkovanou mikrobiálními signály komenzálních druhů. Makrofágy v reakci na tyto signály sekretují IL-13, čímž stimulují ROR $\gamma$ t+ přirozené lymfoidní buňky (ILC) k produkci GM-CSF faktoru, který je nezbytný pro vývoj iTreg lymfocytů. ILC také v reakci na přítomnost *Clostridiales* mohou působit na snížení permeability slizničního epitelu (Diefenbach et al. 2017).

Transplantace fekální mikrobioty zdravých dětí (*Clostridiales*, *Bacterioides*) do bezmikrobních (GF) myší potlačila senzibilizaci na B-laktoglobulin, zatímco mikrobiota alergiků neměla žádný efekt. Stejný pokus byl úspěšně proveden také u atopických IL4ra (delece inhibiční domény IL-4 receptoru) bezmikrobních myší (Feehley et al. 2019). Překvapivý výsledek měla transplantace jediného vytipovaného kmenu *Annaerostripes caccae* do GF myší. Tento samotný kmen dokázal pozměnit expresní profil epiteliálních buněk a zabránit rozvoji potravinové alergie. Další výzkumy potvrdily, že mikrobiota zdravých dětí dokáže u IL4ra myší indukovat tvorbu ROR $\gamma$ t+ iT regulačních lymfocytů a zároveň zvýšit produkci IgA oproti IgE, což částečně obnovilo normální vztahy mezi tolerogenní vztahy ve střevě (Abdel-Gadir et al. 2019). Mezi oběma mechanismy existuje vzájemná závislost. „Správná“ mikrobiota spouští MyD88 signální dráhu (MyD88 je adaptorový protein TLR receptoru reagujícího na IL1, IL18, IL33) v rodících se iT-reg lymfocytech, která je důležitá pro expresi znaku ROR $\gamma$ t. Takto vybavený regulační

lymfocyt, pravděpodobně skrze produkci TGF- $\beta$  a IL-21, napomáhá izotypovému přesmyku na IgA (Chorny et al. 2010). Delece genu pro ROR $\gamma$ t v IL4a myších vedla k selhání orální tolerance, a to i přes transplantaci fekální mikrobioty zdravých dětí, což staví ROR $\gamma$ t do popředí jako jeden z hlavních markerů potravinové alergie (Abdel-Gadir et al. 2019).

Lozano-Ojalvo et al. (2019) nabádají k obezřetnosti vzhledem k tomu, že většina studií je prováděna na myších a na lidských studiích se výsledky hledání bakteriálních signatur liší.

I přes určité odlišnosti (Mestas et al. 2004) se však stále jedná o v imunologii běžně používané modely a je čím dál více zřejmé, že mikroorganismy hrají při udržování orální tolerance aktivní úlohu. Mikroorganismy, které by dokázaly potravinovou alergii naopak navodit zatím nebyly popsány (Stephen-Victor & Chatilla 2019).

Složení mikrobiální flóry dítěte a tím i rozvoj imunitního systému jsou ovlivněny chováním matky během těhotenství např. prostřednictvím epigenetického imprintingu (Abrahamsson et al. 2015), osídlením při kontaktu s porodními cestami matky (Karlsson et al. 2011), kojením, následnou výživou a kontaktem s okolním prostředím. Imunologická role rozdílů v mikrobiálním osídlení dětí narozených císařským řezem je obsáhle diskutována ve studii Aagaard (2020), kde autor upozorňuje na některé slabiny těchto studií a na vzrůstající evidenci mikrobiálního transferu *in utero*.

V roce 1989 Strachanem navržená hygienická hypotéza předpokládá vyšší výskyt alergií nižším počtem členů domácnosti a zvýšenou hygienou (Strachan et al. 1989).

To je v moderním pojetí vysvětlováno výrazně nižší stimulací buněk vrozené imunity dříve velmi frekventovanými patogeny, což upozaďuje Th1 odpovědi a snižuje koncentraci interferonu- $\gamma$  a IL-12 (Cochrane et al. 2009). Suha et al. (2005) dále přičítá vliv nižšímu počtu T-regulačních lymfocytů a jejich produktů TGF- $\beta$  a IL-10, v důsledku snížené expozice neškodným, symbiotickým mikroorganismům. Rolí může hrát také častější užívání antibiotik, zejména v raném věku (Kuo et al. 2013). Senghor et al. (2018) dává mikrobiotu také do souvislosti s geografickou polohou, protože mikrobiální diverzita v lidských střevech napříč zeměmi a kontinenty je značná.

Nepříliš prozkoumaným polem prozatím zůstává vztah mezi potravinovou alergií a mikrobiální dysbiózou v dospělosti. Není známo, jestli u dospělých alergiků budou platit podobné vzorce jako v dětství a jestli mikrobiota ovlivňuje také Non-IgE mechanismy. Zbývá také určit, zda alergie na jednotlivé potraviny vykazuje odlišné či překrývající se dysbiotické vlastnosti (Stephen-Victor & Chatilla 2019).

### 3.2 Alergeny

*„Když tedy dovedou vzbuzovat pocity různé,  
musí se atomy značně svou podobou lišit.“*

*Lucretius, De Rerum Natura*

Již v dávných dobách si lidé při pozorování neobvyklých reakcí na pyl či běžná jídla kladli otázku, co přesně z oněch věcí je schopno je vyvolat tuto reakci. S myšlenkou, že různá podoba věcí je pouze různým uspořádáním atomů přišlo také poznání, že potravina není homogenní masa stejnorodých částic a že alergeny jsou molekuly, nikoli celistvá zvířata nebo rostliny (Wuthrich 2014). Odvěká touha rozebírat celky na menší a menší části a izolovaně zkoušet jejich účinky přivedla postupně badatele až k úspěšné izolaci prvních alergenních komponent a objevu, že alergenicita zůstane zachována, ponecháme-li proteinovou frakci. Vágní definice, že „tělo reaguje na jídlo“ byla postupně nahrazena modelem reakce „antitoxinů“ krevního séra na alergenní extrakt. Brzy poté byl „*Seitenketten*“ Paula Ehrlicha definován jako epitop protilátky třídy imunoglobulinů a příslušný „atopic reagin“ jako konkrétní protein, zejména glykoprotein (Llewelyn et al. 1992).

### 3.2.1 Epitop

Alergeny, jak už bylo řečeno, bývají zpravidla **proteiny**, tedy vysokomolekulární látky složené z peptidových řetězců účelně kódovaného pořadí aminokyselin. Proto je nutné na alergen nahlížet jako na funkční jednotku, která ve zdrojovém organismu plní nejrůznější úlohy. Ty jsou v drtivé většině určovány schopností vázat více či méně specifický ligand - protein vystavuje svůj hydrofilní povrch s téměř nekonečným počtem potenciálních vazebných míst (Alberts et al. 2017). Je proto velmi pravděpodobné, že receptory imunitních buněk ve svém širokém repertoáru naleznou strukturu s dostatečnou afinitou a vznikne tak nekovalentní interakce shodná s modelem pomyslného zámku a klíče, charakteristická pro Fisherem popsanou vazbu enzymů (Silverstein 1986). Takové místo nazýváme **epitop**. Během translace a posttranslačních úprav dochází ke sbalování proteinu do sekundárních a terciálních struktur v závislosti na sekvenci, pH okolního prostředí a činnosti specifických enzymů. Díky různé orientaci aminokyselinových zbytků zaujme tak protein určitou konformaci, tedy prostorové uspořádání, které pak určuje konkrétní vazebné vlastnosti (Alberts et al. 2017). Rozlišujeme epitopy **konformační** a **lineární**. Aminokyseliny tvořící konformační epitop jsou od sebe často sekvenčně velmi vzdálené a jejich vzájemná blízkost je dána pouze trojrozměrným uspořádáním proteinu. Je tedy možné zničit tyto epitopy denaturací. Lineární epitopy jsou dány prostým sekvenčním sledem aminokyselin a mohou tak přetrvávat i po ztrátě konformace. Lineární jsou např. fragmenty na MHC II komplexu antigen prezentujících buněk (T buněčné epitopy), jelikož prezentaci antigenu předchází vždy jeho denaturace a proteolýza na menší peptidy (Weber et al. 2009).

Některé epitopy se překrývají s místy, která jsou pro původní funkci proteinu zcela nepostradatelná a zůstaly proto mezi druhy tuto funkci využívající více či méně konzervovány. Obvykle se jedná o blízkce příbuzné skupiny. To tvoří základ tzv. zkřížené reaktivity, zmíněné již na začátku práce a v souvislosti s „Pollen-food“ syndromem (Carlson & Coop 2019). Někdy stačí sekvenční shoda celého proteinu přesahující 50 %, ale záleží na trojrozměrném uspořádání, protože konzervována je především struktura, nikoli sekvence. V průměru se jedná o 70 - 80 % shodu. Má-li některý alergen vyšší shodu, mluvíme o něm jako o **panalergenu** (Fuchs et al. 2016). Alergeny zkřížené s tímto panalergenem se obvykle řadí do skupin, příkladem může být

skupina alergenů spřažených s břízovým alergenem Bet v 1 z řádu *Fagales* (Biederman et al. 2019).

### 3.2.2 Názvosloví alergenů

Zdrojem proteinových alergenů mohou být rostliny, živočichové i mikroorganismy. Seznam všech alergenů je k dispozici v Allergen Nomenclature database ([www.allergen.org](http://www.allergen.org)) 880 proteinů z širokého množství zdrojů.

Název alergenu sestává z prvních tří písmen rodového jména (*Malus*), jednoho písmena druhového jména (*domestica*) a čísla, které udává, v jakém pořadí byl u daného druhu objeven. První identifikovaný alergen jablka (*Malus × domestica*), nese tedy název Mal d 1. V průběhu let někdy dochází ke změnám v taxonomické nomenklatuře, jako např. u druhu *Betula verrucosa*, který byl přejmenován na *Betula pendula*. Původní označení Bet v pro alergeny tohoto stromu zůstalo pro jeho četnost v publikacích zachováno. Další pravidla jsou shrnuta v Pomés et al. (2018).

Izoalergeny jsou homologní alergeny v rámci jednoho druhu, vzniklé pravděpodobně genovou duplikací, které sdílí společné biochemické vlastnosti: podobnou molekulovou velikost, stejné či podobné biologické funkce (jsou-li známy) a aminokyselinovou sekvenční shodou větší než 67 %. Každý izoalergen může mít mnoho tzv. izoform, které jsou definovány sekvencí lišící se typicky pouze o jednu či dvě aminokyseliny). První dvě čísla za tečkou (01-99) rozlišují izoalergen (Mal d 1.01), následující dvojčíslí pak udává izoformu (Mal d 1.0101) (King et al. 1994).

### 3.2.3 Klasifikace alergenů

Vzhledem k původu všech druhů ze společného předka sdílejí všechny organismy některé bazální funkce a na základě sekvenční podobnosti nacházíme v jejich proteomu mnohé homology, které jsou dědictvím po společném předku. I přes četné zásadní mutace, přestavby a genomové duplikace, kdy docházelo k jejich rozrůznění a vzniku paralogů a ortologů přejímající nové funkce, je možné tuto příbuznost dosledovat (Alberts et al. 2017). Doposud bylo identifikováno přes 1500 alergenů (Rouvinen et al. 2010). Na základě strukturní podobnosti, která odráží zároveň i podobnost funkce, můžeme různé rodiny překlenout pod střechu superrodin. Seznam všech alergenů a identifikovaných proteinových rodin podílejících se na alergii je uveden na stránce Allfam (Allergen Families Database) a na webu: [www.allergen.org](http://www.allergen.org) provozovaném podvýchobem WHO pro nomenklaturu alergenů.

#### **Prolaminy**

Tato superrodina sdružuje na základě strukturní podobnosti tyto čtyři hlavní skupiny: zásobní proteiny semen (gluteniny a gliadiny), nespecifické lipid transfer proteiny (nsLTPs), 2S albuminy a inhibitory  $\alpha$  amylázy/proteáz. Ač sekvenčně velmi odlišné, sdílejí tyto rodiny společný fold ze čtyř  $\alpha$ -helixů stabilizovaný disulfidovými můstky (Hoffman et al. 2009), což je činí vysoce odolnými vůči trávení a patří tak mezi významné potravinové alergeny. Tepelně denaturovaný Pru p 3, je-li v kyselém prostředí, dokáže po ochlazení obnovit svou nativní konformaci (Gaier et al. 2008). 2S albuminy zahrnují např. některé alergeny arašídů (Ara h 2, Ara

h 6) (Hoffman et al. 2009). **NsLTP** usnadňují transport membránových fosfolipidů a podílejí se také na obraně rostliny proti virovým a bakteriálním infekcím. Vykazují vysokou odolnost vůči trávení a proto jsou často původci silných alergických reakcí (Pastorello et al. 2007). Jsou to hlavní alergeny čeledi *Rosaceae*, např. Mal d 3 (jablko) nebo Pru p 3 (broskev) a zdroje najdeme také v zelenině a ořeších. Zkřížená reaktivita spojená s PFS byla zaznamenána pouze v případě broskve a pelyňku (Art v 3) (Lombardero et al. 2004). **Inhibitory  $\alpha$ -amyláz** najdeme v pšenici, ječmeni a rýži. Po vdechnutí mohou alergikům způsobit syndrom pekařského astmatu, po strávení např. alergii na pivo (Pastorello et al. 2007).

**Cupiny svádí dohromady charakteristická** struktura tvořící  $\beta$ -barel a od latinského slova cupa (barel) je také odvozen jejich název. Jednotlivé rodiny najdeme u rostlin, živočichů i hub a jejich sekvence naznačují, že se zřejmě vyvinuly ze společného prokaryotního předka. Alergenní jsou však pouze rostlinné cupiny. Patří sem germíny (pepř a pomeranč), viciliny (arašíd, vlašský ořech), biscupiny, 7S a 11S globuliny (arašíd, pohanka, sója, lískový ořech) (Hoffman et al. 2009).

**Profiliny** jsou malé cytosolické proteiny vážící aktin, jsou přítomny ve všech eukaryotických buňkách. Vykazují střední stabilitu vůči teplu, ale za nízkého pH denaturují (Hoffman et al. 2009). Alergenní potenciál však mají pouze rostlinné homology, které způsobují 10 - 20 % všech alergií na stromové pyly. Zhruba třetina alergiků na mrkev a celer je senzibilizována profiliny (Valenta et al. 1992). Jedná se o časté původce zkřížených reakcí, které však nejsou vždy nutně spojeny s klinickými příznaky. K významným zástupcům pylů patří bříza (Bet v 2) a bojínka luční (Phl p 12) z ovoce a zeleniny pak také jablko (Mal d 4), celer, meloun, citron, banán nebo rajče. Profiliny najdeme také v pepři, hořčičném semeni, rýži, olivách, pšenici nebo kukuřici (Valenta et al. 1992).

### **Bet v 1 spřažené proteiny**

Tyto proteiny obvykle o 154 - 163 aminokyselinách sdílí strukturní podobnost s panalergenem Bet v 1, hlavním alergenem břízy, který je také nejlépe prozkoumaným proteinem v této skupině (Ahammer et al. 2017), kam patří také jablečný Mal d 1. Řadíme sem 8 rodin, z nichž mají největší význam proteiny reagující na patogenní stimuly s označením PR-10 (Hoffman-Sommergruber et al. 1997). Jejich exprese narůstá také s abiotickými stresy jako jsou např. zvýšená salinita, chlad, sucho, UV záření nebo oxidativní stres (Aglas et al. 2020). Jejich trojrozměrná struktura sestává ze sedmi antiparalelních  $\beta$  skládaných listů ovinutých kolem C-terminálního  $\alpha$  helixu, který je obklopen dvěma krátkými  $\alpha$  helixy tvořící dohromady tvar písmene V (Gajhede et al. 1996; Ahammer et al. 2017). Hlavním sdíleným strukturním motivem je velká hydrofobní dutina uvnitř proteinu, přístupná z několika míst pro vazbu ligandu (Radauer et al. 2008). Funkce těchto proteinů není zcela objasněna, ale předpokládá se jejich zapojení v biosyntéze flavonoidů související s obrannými mechanismy i např. barvou plodu a také při regulaci dostupnosti fytohormonů, jelikož byla prokázána vazba na některé cytokiny (kinetin, zeatin) (Ruszkowski et al. 2013). Vazba těchto ligandů může bránit jejich předčasnému uvolnění pro další zpracování a udržovat je v neaktivní formě dokud nepřijde příslušný signál. Podstata těchto signálů zůstává neznámá (Aglas et al. 2020). Několik studií prokázalo také nukleázovou aktivitu, což souvisí s tím, že ligand zeatin je nukleosidový analog a protein by tak mohl být

schopen vázat na DNA či RNA (Swoboda et al. 1996; Filipenko et al. 2013). Afinita k určitému ligandu se mezi jednotlivými homology i mezi izoformami velmi často liší (Seutter von Loetzen et al. 2015), což podporuje domněnku, že každá izoforma získala v průběhu evoluce svou vlastní specializaci (Aglas et al. 2020).

Alergení PR-10 proteiny se nacházejí v pylových zrnech čeledi *Betulaceae* a *Fagaceae* a v plodech čeledi *Rosaceae*, které zastřešuje společný klad *Fagales*, ale zkřížená reaktivita se objevuje i u evolučně vzdálenějších druhů, jako např. u mrkve z řádu *Apiaceae* (Hecker et al. 2012). Některé plody (jablko, lískový ořech) jsou rozeznávány lépe než jiné (sója, celer) (Hoffman et al. 2009).

**Thaumatín-like proteiny (TLP)**, jsou další z řady rodin reagujících na biotické a abiotické stresy. Stabilizace 8 disulfidickými můstky jim poskytuje značnou stabilitu a jedná se proto o alergeny schopné perzistovat v zažívacím traktu, obdobně jako nsLTP (Krebitz et al. 2003). Zdrojem těchto alergenů v ovoci je zejména jablko (Mal d 2), třešeň (Pru av 2) a kiwi (Act d 2), z pylů se jedná o horský cedr (Jun a 3) a cypřišek (Cup a 3) (Hoffman et al. 2009).

**Tropomyosin** se vyskytuje v příčně pruhované svalovině, kde zprostředkovává interakce mezi troponinem a aktinovým komplexem při svalovém stahu (Alberts et al. 2017). Alergenicitu byla pozorována u lososa (Sal s 4), krevet (Pan b 1), dalších mořských plodů a domácích škůdců jako roztoči (Der p 10) nebo švábi (Bla g 7) (Hoffman et al. 2009).

**EF-hand** je rodina  $\text{Ca}^{2+}$  vazných proteinů, mezi něž patří kalmoduliny, troponiny (švábi, mořské plody) a parvalbuminy, které jsou velmi častým alergenem obsaženým v rybách (např. kapří Cyp c 1) (Hoffman et al. 2009).

**Kaseiny tvoří až 80 % všech proteinů savčího mléka** a vyskytují se zde ve formě agregátů s fosforečnanem vápenatým (Holt et al. 2013). V alergiích jsou nejvíce zapojené  $\alpha$ -s-kasein a  $\beta$ -s-kasein. Poměr jednotlivých forem se od sebe liší napříč druhy i jednotlivými plemeny (Fuchs et al. 2016).

**Lipokaliny** jsou transportními proteiny pro malé molekuly jako lipidy, steroidy nebo hormony. Zdrojem těchto inhalačních alergenů jsou produkty mazových a slinných žláz savců, např. kočky (Fel c 4), myši (Mus m 1), psa (Can f 1) nebo koně (Equ c 1). Mezi lipokaliny patří také hlavní syrovátkový alergen Bos d 5, známý pod názvem  $\beta$ -laktoglobulin (BLG) (Radauer et al. 2008).

**Inhibitory serinových proteáz** jsou spojeny zejména s alergiemi na vaječný bílek, např. termostabilní ovomukoid (Gal d 1). Dalšími významnými alergeny vajec jsou **ovalbumin** (Gal d 2) a **ovotransferin** (Gal d 3) (Radauer et al. 2008).

### 3.2.4 Alergenicita

Moderní imunologická terminologie rozlišuje pojmy antigen, imunogen, hapten a alergen. Pojmem **antigen** označujeme libovolnou molekulu či molekulární strukturu, která má na svém povrchu vazebné místo (epitop) pro navázání protilátky. **Imunogen** je antigen, který je zároveň schopen vyprovokovat imunitní odpověď, která k produkci protilátek vede. Nemá-li tuto vlastnost, jedná se o **hapten**. Ten vyvolá odpověď pouze je-li navázán na imunogenní nosič (zpravidla bílkovinné povahy), který ji zprostředkuje. Užším pojmem pro antigen je pak **alergen**, což je antigen, který nejenže vyvolá protilátkovou imunitní odpověď, ale tato odpověď způsobí pacientovi klinicky manifestované příznaky **alergie**. Tento pacient je označován jako **alergik**.

Z pohledu antigenu vede k úspěšnému vyvolání alergické reakce splnění těchto podmínek:

#### 3.2.4.1 Imunogenicita (T-cell reaktivita)

Imunogenicita je schopnost antigenu způsobit imunitní odpověď vedoucí k úspěšné aktivaci naivních T-lymfocytů a jejich klonální expanzi. Jestli se následně rozvine Th2 nebo jiný typ odpovědi již v hodnocení vlastní imunogenicity nehraje roli. Podoba, v jaké antigen přichází na sliznici může ovlivnit intenzitu, s jakou dendritické buňky (též slizniční M-buňky) odebírají okolní materiál, účinnost internalizace a proteolýzy, vazbu peptidu k MHC II receptoru a stabilitu tohoto komplexu na membráně. Také epiteliální buňky, makrofágy aj. mohou být zapojeny. Souhra všech těchto faktorů má vliv na maturaci DC, produkci cytokinů a aktivaci naivních CD4+ lymfocytů přes T-receptor (Abbas et al. 2015).

Imunogenicita může být ovlivněna mutací v klíkových pozicích (změna konformace), glykosylací, odolností vůči endolysozomálním proteázám (Dellamare et al. 2005) nebo např. vazbou ligandu do vnitřní dutiny homologů z PR-10 rodiny (Wallner et al. 2001; Roulias et al. 2014). Rosenberg et al. (2006) zdůrazňuje vliv terciární struktury alergenů a dodává, že predikce alergenicity, často zaměřena na srovnávání sekvenční identity, by měla zahrnovat i ověření oligomerizace.

Bylo prokázáno, že různé izoformy jednoho alergenů, ač sekvenčně téměř identické, se mezi sebou často liší jak v tendenci tvořit oligomery tak v imunogenicitě, což může a nemusí mít vliv na výslednou alergenicitu. Studie na Bet v 1, hlavním alergenem břízy, ukazuje, že hypoalergenní izoforma Bet v 1d, která zároveň tvoří dimery, je ve srovnání s Bet v 1a aktivněji pohlcována. Zároveň byl zaznamenán vyšší počet maturovaných DC a odlišné cytokinové prostředí, vyšší množství Th1 lymfocytů, IgG a IgA protilátek (Zaborsky et al. 2010). Naopak v mutačním experimentu na jablečném alergenem Mal d 1, provedeném týmem Roulias et al. (2014) nebyl v imunogenicitě mezi dimerem a monomermem zaznamenán žádný rozdíl.

#### 3.2.4.2 Přemostění

Imunizovaný jedinec rozvine alergickou reakci pouze za přítomnosti histaminu a dalších prozánětlivých produktů obsažených v granulích mastocytů a bazofilů. Antigen je schopen

vyvolat degranulaci pouze v případě, je-li schopen přemostit dvě sousední IgE molekuly, zakotvené v Fc membránových receptorech těchto buněk (Izhisaka et al. 1978). Jelikož všechny protilátky na téže buňce jsou identické, předpokládá se, že antigen musí být **multivalentní** (obsahovat minimálně dva identické epitopy) (Taylor et al. 1987).

Povrch mikroorganismů či mnohobuněčných parazitů je zpravidla tvořen vzájemně se opakujícími strukturami a splňuje tak kritéria multivalence. Velikost typického alergenu je pouze 10 - 70 kDa (Taylor et al. 1987). Kontakt vazebného místa protilátky s jedním konformačním epitopem (BV16) březového alergenu Bet v 1 (17 kDa) pokrývá 10 % povrchu proteinu. Pravděpodobnost existence identického, adekvátně vzdáleného a nepřekrývajícího se epitopu je zde oproti velkým objektům nižší (Niemi et al. 2015). U Bet v 1 existence dvou shodných epitopů dosud nebyla přesvědčivě prokázána krystalografickými daty.

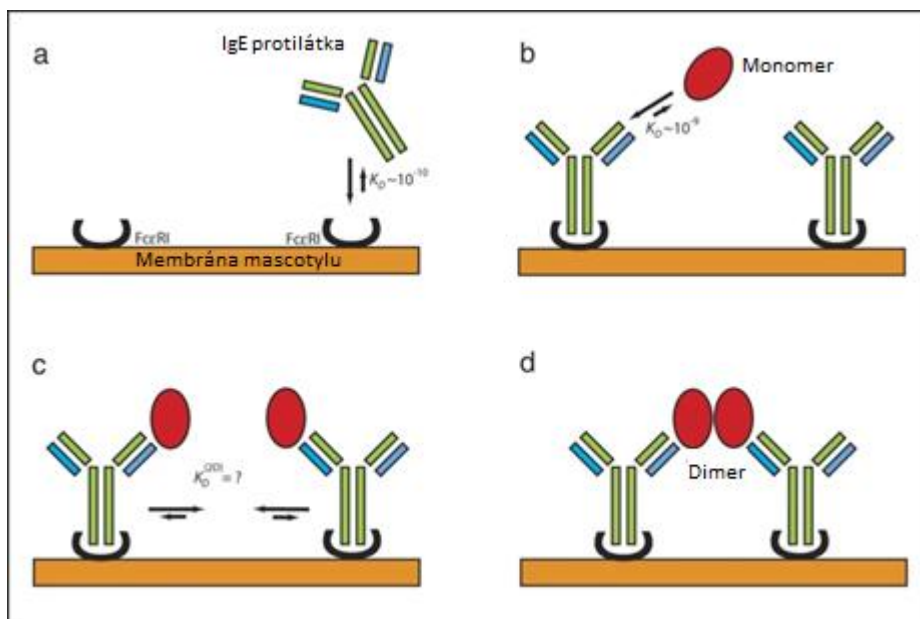
Scholl et al. (2005) a Rosemberg et al. (2006) navrhli jako možné řešení existenci stálých a přechodných **dimerů** tvořených dvěma identickými **monovalentními** alergeny. Jejich frekventovaný výskyt je prokázán jak mezi inhalačními tak mezi potravinovými alergeny (Rouvinen et al. 2010; Roulias et al. 2014; Niemi et al. 2015).

Rouvinen et al. (2010) zkoumal schopnost tvoření homooligomerů u 55 známých alergenů na základě veřejně dostupných krystalografických dat a dále pomocí hmotnostní spektrometrie. 44 těchto alergenů tvoří za fyziologických koncentrací dimery, trimery nebo vyšší agregáty, ačkoli 24 z nich bylo předchozími studiemi založenými na jiných metodách popsáno jako monomerní (Pasquato et al. 2006). Rouvinen tyto rozdíly vysvětluje vlastnostmi tzv. přechodných dimerů, které tvoří významný podíl pouze při vyšších koncentracích (více než 0,5 mMol), zatímco za obvyklé buněčné koncentrace (10 - 100  $\mu$ M) se vyskytují převážně jako monomery. 0,5 mMol je obvyklá koncentrace pro krystalizační experimenty a zároveň je možné jí dosáhnout kolokalizací alergenu v konkrétním místě - na povrchu bazofilů a žírných buněk. Výsledky potvrdila i hmotnostní spektrometrie, která zachovává proteiny v nativní konformaci.

Niemi et al. (2015) předkládá jako nejpravděpodobnější verzi kdy na povrchu bazofilů dochází nejprve k interakci každého monomeru s jinou IgE protilátkou, čímž je lokálně zvýšena „koncentrace“ a teprve poté dochází k jejich vzájemnému spojení. Dodává, že se nejedná na buněčné úrovni o ojedinělý typ přenosu signálu - podobnou strategii volí např. povrchový H-Ras protein ze skupiny malých GTPáz.

Koffler et al. (2014) prokázali, že schopnost vázat IgE protilátky při imunoblotu je u Bet v 1 dimerů o něco nižší díky blokaci místa domnělého hlavního epitopu, ale vázalo se - asi další, náhradní epitop. Nepoužili však monoklonální protilátku, ale polyklonální séra pacientů, takže se nedá určit, zda tento epitop váže stejnou protilátku. V testu aktivace bazofilů si monomery i dimery vedly přibližně stejně. Vzhledem k výsledkům imunoblotu však autoři připouštějí možnost, že se dimery snadněji a lépe přemostí, čímž „dohnaly náskok“ monomerů ve vazbě na IgE (Niemi et al. 2015, Obrázek 1).





Obrázek 1. Jedna z možností, jak dosáhnout přemostění Fc receptorů (Niemi et al. 2014).

Další možností jak monovalentní antigen učinit alergenem je navázat se jiným vazebným místem k další, klonálně odlišné, protilátce. Většina dosud studovaných alergenů je polyvalentních, jak dokazují studie epitopů i rozdíly v IgE vazbě mezi polyklonálními séry pacientů (Savazzini et al. 2020). Naváže-li každé Fab rameno protilátky A jeden antigen, dostane oba dva proteiny do adekvátní blízkosti pro přemostění dvou ramen sousedních protilátek B. Toto bylo prokázáno na experimentálním modelu Gieras et al. (2016) u koňského myoglobinu. Pro vyvolání alergie je zde tak potřeba minimálně dvou druhů IgE protilátek.

Zcela převratný náhled poskytuje Mitropoulos et al. (2018). Krystalizace alergenu bojínku lučního (Phl p 7) s Fab fragmentem monoklonální protilátky odhalila symetrickou strukturu, kde je monomer vždy připojen k dvěma Fab fragmentům (což by zdánlivě odpovídalo multivalenci). A dále, což bylo velmi překvapivé, Fab fragment zároveň vázal dva monomery. Toto uspořádání staví na hlavu klasické dogma „jedna protilátka – jeden epitop“. Bylo zjištěno, že monomer se jedním epitopem váže na CDR1 doménu těžkého řetězce Fab fragmentu jako každý způsobilý antigen, zatímco druhý, strukturálně odlišný epitop je spojen s FR (framework-region) lehkého řetězce. Využití této strategie bylo zatím pozorováno jen u bakteriálních proteinů A (*Stafylococcus aureus*) a L (*Peptostreptococcus magnus*) a několika dalších, známých jako tzv. superantigeny (Marone et al. 2007).

### 3.2.4.3 Stabilita

Od původního zdroje až k lidské sliznici vede dlouhá cesta, která je z hlediska alergenu plná nástrah. Stabilita se posuzuje jako schopnost proteinu čelit vnějším vlivům beze změny své nativní konformace a zachovat tak své epitopy v neporušeném stavu. To je důležité zejména u potravinových alergenů, které jsou při průchodu zažívacím traktem ohrožovány lytickými enzymy a kyselým pH žaludku (Gaier et al. 2008). Důležitým stabilizátorem jsou disulfidické můstky. Kyselé prostředí žaludku bez odpovídajících redukčních podmínek samo o sobě

nedokáže tyto vazby zničit a ty tak díky udržení rigidní struktury proteinu mohou znemožnit kyselou denaturaci a odhalení štěpicích míst pro proteázy, jak bylo prokázáno u broskvového LTP a arašídového koglutinu. Mohou také bránit dislokaci fragmentů rozštěpaných proteázami a do určité míry zachovat alespoň epitop (Wiesha & Bettoni 2010). Stabilizační i destabilizační vliv může mít vazba kovových iontů, asociace s lipidy či vitamíny či posttranslační modifikace (glykosylace, nitrace, sukcinylace), které ovlivňují přístupnost štěpných míst. Významnou roli hraje také úprava jídla před samotným požitím jako vaření, pečení, smažení, pasterizace, vysokotlaká konzervace nebo přidání různých aditiv (Verhoeckx et al. 2015). Během tepelné úpravy dochází často nejen k denaturaci, ale také k reakcím alergenu s dalšími molekulami obsaženými v jídle, tzv. „food matrix“. PR-10 alergen spřažený s Bet v 1 (např. Mal d 1, Pru av 1) teplem nevratně denaturují (Bohle et al. 2006) a po navázání sacharidů (glykace) silně redukuje vazbu k IgE (Gruber et al. 2004), zatímco jiné proteiny, např. z rodiny LTP (Mal d 3), jsou naopak velmi termostabilní. Těmito procesy nicméně může naopak dojít k odkrytí takového epitopu, který byl v nativním stavu skryt uvnitř. To bylo prokázáno např. u rybího tropomyosinu, glykovaného při Maillardově reakci během uzení (Nakamura et al. 2000). Veřejností často zmiňovaný vliv GMO prozatím žádnou studií nebyl prokázán, jak shrnují v review Dunn et al. (2017).

#### 3.2.4.4 Alergeny a prostředí

Z hlediska vstupu do těla rozlišujeme alergeny na inhalační, orální a kontaktní.

##### **Inhalační alergeny**

Aeroalergen, často jako součást drobných lehkých částic, jsou nasávány s proudem vzduchu do dýchacích trubice. Při průchodu dýchacími cestami se ihned dostávají do kontaktu s nosní sliznicí nebo je zachytí řasinkový epitel v nosohltanu. V prostředí dýchacího traktu nemusí alergen čelit agresivním trávicím procesům a tak jsou požadavky na jeho stabilitu nižší (Fuchs et al. 2016).

Mezi hlavní zdroje inhalačních alergenů patří prachové částice složené ze zbytků roztočů a zvířecích chlupů, některé zásobní proteiny semen způsobující pekařské astma, zvířecí sliny a především pyl trav a stromů, který zde krátce zmíním kvůli spojitosti se zkříženou reaktivitou břízy a jablka způsobující PFS.

Pylový alergen, narozdíl od potravinového, přichází z vnějšího prostředí jako nezanedbatelný host prostřednictvím stejně tak nezvané částice - pylového zrna. Většina alergenních pylů pochází z větrosnubných rostlin. Pyl může být transportován i více než 100 kilometrů daleko za rychlosti 10 m/s (Stanley & Liskens 1984 in Taketomi et al. 2006).

Biologická funkce pylu spočívá v oplodnění samičího gametofytu. Vnější stěna pylového zrna (exina) je složená ze sporopoleninu, který pokrývá celý povrch zrna s výjimkou klíčního póru. Hladká vnitřní vrstva obklopuje pylovou cytoplazmu, obsahující kromě organel také vegetativní a zárodečná jádra, škrobové granule a jistou koncentraci pylového alergenu. Jeho uvolnění je základním předpokladem pro indukci imunitní odpovědi (Katifori et al. 2010).

Vdechnuté pylové zrno se lepí na povrch neustále zvlhčované sliznice. Zahájí rehydrataci a pod dojmem, že přisednulo na bliznu, nastartuje germinační procesy, při nichž dochází k růstu pylové láčky a tvorbě dalších pórů ve sporopoleninové svrchní vrstvě buněčné stěny. Za použití

metod Imuno-gold-elektronové mikroskopie bylo dokázáno, že protein Bet v 1 se v dormantním stavu pylu vyskytuje pouze roztroušen v cytoplazmě, zatímco při rehydrataci se shlukuje u otvorů a těmito mikrokanály difunduje z buňky - většina zlatem značených částic byla po 5 minutách nalezena ve vodné fázi (Grote et al. 1993). Takto se alergeny dostanou do prostředí mukózy. Některým se, pravděpodobně vlivem proteáz z původní pylové cytoplazmy, podaří dostat do lamina propria.

Tento mechanismus však není uspokojivým vysvětlením rozvoje astmatu, protože pylové zrno je pro průnik do dolních dýchacích cest příliš velké. Jak dokázal Suphigolu et al. (1998) u travních pylů, k úniku cytoplazmatických komponent do vzduchu vlivem plazmoptýzy často dochází po kontaktu s hypotonickým prostředím, např. dešťovou vodou. U stromových pylů k tomu dochází prostřednictvím tzv. abortivní germinace, kdy po kontaktu s vodou buňka zahájí růst pylové láčky, jejíž špička však posléze praská, jak prokázal Grote et al. (2003) u břízy a dalších druhů čeledi *Betulaceae*. Tyto volně poletující alergeny mohou asociovat s jinými mikroskopickými částicemi. Byly zaznamenány případy, kdy uhlíkové zplodiny dieselových motorů (DECP) koncentrovaly na svůj povrch velké množství těchto proteinů (Knox et al. 1997). Cizorodé prvky mohou působit jako adjuvans zvyšující pravděpodobnost senzibilizace vedoucí k Th2 odpovědi (Chen et al. 2020, Heo et al. 2001).

### **Kontaktní a injekční alergeny**

Mezi zdroje kontaktních alergenů, které vyvolávají alergickou reakci při prostém dotyku na kůži (nebo jemném škrábnutí) patří zvířecí sliny a některé jedovaté rostliny. Zdroji neproteinových alergenů jsou pak chemikálie a kovy. Injekční alergeny se liší svou neschopností vybudit dostatečně silnou reakci nejsou-li přes kožní bariéru transportovány prostřednictvím vpichu - jedná se např. o jedy při hmyzím bodnutí (Kimber et al. 2003).

### **Orální alergeny**

Alergeny přicházející orální cestou mohou být některé léky či nechtěně zkonsumované spory, ale najdeme je především v potravinách.

Potravinové alergeny bývají klasicky děleny na dvě třídy. **Alergeny I. třídy** charakteristické svou termostabilitou a odolností vůči trávicím enzymům či kyselé hydrolyze, mají po perorálním podání tendenci perzistovat delší dobu v zažívacím traktu. Patří sem rodiny nsLTP (jablečný Mal d 3), TLP (jablečný Mal d 2), zásobní proteiny ořechů, obilovin a luštěnin (zejména sóji), dále ovomukoidy, ovalbuminy, tropomyosiny, laktoglobuliny a kaseiny.

**Potravinové alergeny II. třídy**, rychleji ztrácející svou nativní konformaci pod fyzikálními a chemickými vlivy a jsou po požití obvykle doprovázeny mírnějšími příznaky lokálního charakteru. K primární senzibilizaci proto dochází většinou pouze inhalačně, což je důvodem spojení této třídy a PFS. Významnými zástupci jsou rodiny profilinů a Bet v 1 homologů, zodpovědné za syndromy bříza - ovoce - zelenina, latex - ovoce a pelyněk - celer - koření (Fuchs et al. 2016).

Alergeny Mal d 1 - Mal d 4 jsou lokalizovány v cytoplasmě (Breitededer et al. 2004; Marzban et al. 2005; Savazzini et al. 2020). Obsah rostlinné buňky je chráněn buněčnou stěnou. Lidské trávicí enzymy nejsou schopny efektivně ničit  $\beta$ -1,4 glykosidovou vazbu celulózy a lýza membrán lipázami je tak značně ztížená. Získávání živin z rostlinné stravy je tedy podmíněno

činností komenzálních bakterií v trávicím traktu a dobrým mechanickým rozmělněním potravy v ústní dutině, případně jiným způsobem předzpracování potravy - např. krájení, drcení, tepelná úprava atd. Alergik, který nakrájel jablko nožem, způsobil rupturu mnoha buněk stojících řezu v cestě a uvolněná tekutina tak může způsobit obtíže již při dotyku se rty nebo olíznutí nože. Rozbití buněk zuby je velmi účinné, především v případě mladého, hydratovaného plodu s vysokým turgorem. Alergen se vylévá na sliznici v oblasti rtů, dásní, obou pater, celé dutiny ústní, hltanu a jícnu, kde působí lokální alergickou reakci (OAS)(Carlson & Coop 2019). Hluběji do zažívacího traktu se vzhledem k nízké odolnosti vůči proteázám ve své aktivní konformaci většinou nedostává. Trávicí proces začíná již v dutině ústní díky přítomnosti alfa amyláz, což může zasáhnout strukturu glykoproteinů (Boehlke et al. 2015).

Po rychlém průchodu hltanem a jícnem směs potravy přichází do žaludku. Nízké pH žaludečních šťáv (u zdravého člověka mezi 1,5 – 3) působí jako silné denaturační činidlo a je důležité pro aktivaci pepsinových proteáz. Pacienti s gastrickou hypoaciditou mají vyšší riziko potravinové senzibilizace (Shakeri-Leidenmühler et al. 2015). Okyselená natrávenina vstupuje do střeva, což je následováno sekrecí bikarbonátu z pankreatu, který díky svým pufracním vlastnostem zvýší pH až k neutralitě. Z pankreatu se do střeva dostávají také trypsin, chymotrypsin, enteropeptidázy, elastázy a další proteázy štěpící proteiny v různých aminokyselinových pozicích (Pekar et al. 2018). Stabilní jablečné alergeny, jako např. Mal d 2 a Mal d 3, si i v tomto prostředí dokáží zachovat své epitopy a po zachycení M-buňkami střevního epitelu jsou zachycovány dendritickými buňkami nebo, v případě již senzibilizovaného jedince, také paměťovými B-lymfocyty a střevními mastocyty. Až 2 % proteinů projde neporušeně skrze epitel do krve a jsou transportována do jater nebo do sekundárních lymfatických tkání (Warshaw et al. 1974 in Chinthrajah et al. 2016).

### 3.2.4.5 Regulace genové exprese

Sestoupíme-li o úroveň níž a místo samotného proteinu se zaměříme na mechanismy ovlivňující jeho vznik, můžeme hledat zdroj alergenicity určité potraviny např. v regulaci genové exprese na translační nebo transkripční úrovni.

Mechanické zpracování jako loupání, krájení, ale také skladování mohou mít vliv na alergenicitu. Buňky vnímají mechanické či chemické vnější stimuly jako signál pro zvýšení exprese stresových proteinů (Alberts et al. 2017). Mnohé z nich patří mezi známé alergeny, jako např. Bet v 1 homology PR-10, což je případ i jablečného Mal d 1 (Pühringer et al. 2000).

## 3.3 Metody diagnostiky

Vhodná, přesná a chybami co nejméně zatížená diagnostika je předpokladem pro dobré klinické i epidemiologické studie. Je významným nástrojem také pro výzkumy alergenicity jednotlivých potravin a šlechtitelskou praxi.

Je velmi důležité přesně definovat nástroje, se kterými konkrétní diagnostika pracuje.

**Alergenní extrakt** je roztok extrahovaný z čerstvého materiálu, který je komplexní směsí alergenních a nealergenních komponent jako proteiny, polysacharidy, lipidy, nukleové kyseliny,

nízkomolekulární metabolity, soli a pigmenty. Jedná-li se o komerční produkt s nutností skladování, může obsahovat také různá stabilizační a protisrážlivá aditiva. Extrakty mohou být uchovávány také lyofilizované formě nebo v 50% glycerolu (Nelson & Cox 2020).

**Purifikaci** je možné získat pouze jeden konkrétní alergen. Toho je možné docílit purifikací z alergenního extraktu chromatograficky, dělením proteinů elektroforézou v polyakrylamidovém gelu a následným Western blotem nebo pomocí magnetických kuliček (Curin & Valenta 2017). Získávat nativní alergeny z jednotlivých rostlin je z důvodu jejich často nízké koncentrace velmi náročné a nákladné. Proto se využívá jejich exprese v bakteriích a kvasinkách nebo transgenních rostlinách (dle náročnosti proteinu na eukaryotní posttranslační modifikace a výsledkem purifikace je poté tzv. **rekombinantní alergen**. Příkladem je např. transgenní rýže, která ve svých semenech koncentruje velké množství agregátů proteinu Bet v 1 (Wang et al. 2013). Tento postup se využívá také k produkci hypoalergenních mutantů (nebo přirozených izoform) pro imunoterapii (Curin & Valenta 2017). Je vždy nutné ověřit, zda si rekombinantní proteiny zachovaly správnou konformaci a mají schopnost reagovat se séry pacientů stejně jako nativní proteiny. Oberhuber et al. (2008) takto ověřil všechny čtyři významné jablečné alergeny, Mal d 1 - 4.

**Monoklonální protilátky** jsou protilátky, které mají všechny původ v pouze jediném klonu B-lymfocytu. Přípravují se většinou rekombinantním způsobem pomocí exprese v plazmidových vektorech vnesených do hybridomových kultur a poté jsou purifikovány z buněčného lyzátu. Mohou být nápomocné např. při hledání nových epitopů a krystalizačních experimentech (Koffler et al. 2014; Niemi et al. 2015).

**Polyklonální protilátky** jsou směsí produktů různých B lymfocytů, se specifitou vůči různým epitopům jednoho antigenu. Jejich příprava většinou sestává z imunizace laboratorních zvířat, často králíků, antigenem nebo designovanými antigenními peptidy všech kýžených izoform a z purifikace vytvořené směsi protilátek z krevního séra.

Historický vývoj výroby protilátek od druhé poloviny 20. stol. shrnuje review Hamilton et al. (2005).

### 3.3.1 Diagnostika alergie

Úkolem alergologa je zjistit, jsou-li pacientovy obtíže klinicky manifestovanými příznaky alergie. Metoda spočívá v cílené expozici pacienta a jeho krevního séra různým druhům alergenů a hodnocení reakcí na ně pomocí mezinárodních standardů. Nejstarší a stále využívanou metodou jsou **kožní prick-testy (SPT)**. Několik alergenních extraktů je nakapáno k předem označeným místům na předloktí a mírným vpichem jehličkou zatlačeno do kůže. Hodnotí se, zda erytém a velikost pupenu dosahuje prahových hodnot (Beyer & Teuber 2005). Huang et al. (2018) udává citlivost testu mezi 30 - 90 % a jeho 20 - 60% specifitu. Je-li SPT negativní, je možno vyloučit IgE mediovanou alergii, naopak je-li pozitivní, není tento důkaz dostačující. V minulosti bylo mnoho lidí na základě pozitivních prick testů zbytečně odsouzeno k drastickým eliminačním dietám (Beyer & Teuber 2005). Proto je výsledky potřeba potvrdit **detekcí specifických IgE protilátek** v pacientově séru.

Základním principem je inkubace séra nejprve s antigenem, obvykle navázaným na pevném nosiči, a po odmytí pak se sekundární protilátkou k níž je připojen enzym. Následně přidaný substrát je enzymaticky štěpen a produkty tohoto štěpení lze spektrofotometricky měřit (ELISA test) (Negrini et al. 1987). Nejmodernějším nástrojem je tzv. **komponentová diagnostika (CRD)** založená na microarray technologii. Rekombinantní alergeny vázané v mikroskopických jamkách umožňují detekovat reakci pacientova séra na desítky alergenů současně za použití minimálního množství séra (30 µl) (Bojcůvková et al. 2019). Tato molekulární diagnostika vede k preciznějšímu stanovení příčiny alergie a pomáhá odhalit zkříženou reaktivitu. Detekcí konkrétní problematické molekuly zabráňuje mnohdy zbytečným a neúčinným omezením doporučovaným na základě alergenních extraktů (Van Hage et al. 2017). V ČR jsou používány panely Immuno CAP ISAC a ALEX (Allergy Explorer), obě ve srovnatelné kvalitě (Bojcůvková et al. 2019). Kvantifikace celkového množství IgE se oproti tomu ukázala jako v diagnostice spíše neúčinná (Mehl et al. 2005).

Další možností, v klinické praxi nepříliš používanou, je **test aktivace bazofilů (BAT)**. Přemostěním aktivované bazofily exprimují na svém povrchu specifické markery, díky kterým je možné rozeznat tyto buňky v průtokovém cytometru. Je možné hodnotit také množství prozánětlivých mediátorů (Crockard & Ennis 2001).

U diagnostiky potravinových alergií předchází těmto testům eliminační dieta s úplným vyřazením dané potraviny z jídelníčku. Definitivním průkazem přítomnosti alergie je pak pozitivní **orální expoziční test**. Pacientovi je ve zvyšujících se dávkách podávána buď potravina nebo placebo a jeho příznaky jsou hodnoceny bodovou škálou. Zlatým standardem jsou tzv. dvojité zaslepené kontrolované expoziční testy (double-blind placebo controlled food challenge – DBPCFC), kde ani asistující lékař neví, podává-li placebo či nikoliv (Asero et al. 2009).

Při závažnějších alergiích jsou expoziční testy sice jistým rizikem, ale na základě mnohých studií vyhodnoceným jako přijatelné. Při podezření na závažnější reakce probíhají testy za hospitalizace pod odborným lékařským dohledem (Perri et al. 2004).

### 3.3.2 Epidemiologické studie alergie

Epidemiologické studie vycházejí z konsenzu o klinickém obrazu alergika a snaží se hledat markery tohoto obrazu v populaci. Zjišťována je **prevalence**, definovaná jako počet alergických jedinců k celkovému počtu jedinců ze kterých byl náhodný vzorek vybírán - svět, stát, region, místní populace či jiným kritériem omezená skupina lidí. Významným ukazatelem je také **incidence**, tedy počet nových případů za časové období, většinou jeden rok (Fuchs et al. 2014). **Korelační studie** se zabývají vztahem mezi alergií a jiným markerem charakteristickým pro danou skupinu - příkladem mohou být studie rozvoje astmatu u kuřáků oproti nekuřákům. Korelace však nutně nemusí znamenat kauzalitu, jak ukazuje např. prevalenční studie astmatu mezi očkovánými a neočkovánými dětmi na základě dotazníkového šetření. Výsledky mluví jednoznačně pro nižší riziko u neočkováných, ale sami autoři přikládají vliv životnímu stylu komunity, z níž vzorek neočkováných dětí pocházel - zdravé stravě, většímu kontaktu s přírodou

díky životu na venkově, nižší expozici polutantům a omezené užívání antibiotik (Enriquez et al. 2005).

Zlatým standardem jsou již zmíněné dvojitě zaslepené expoziční testy (double blind oral-food challenges) (Bock et al. 1988), které však pro svou nákladnost a náročnost nejsou prováděny příliš často. Dle rozsáhlého mezinárodního průzkumu pouze 10% z 83 členů Světové alergické organizace disponuje studii založenými na tomto principu (Prescott et al. 2013). Ostatní metody jako testování IgE protilátek či STP mohou u části populace vykazovat falešně pozitivní či falešně negativní výsledky a svědčí spíše o senzibilizaci pacienta než o skutečné alergii (Loh & Tang 2018). Některými autory je relativizována i neochvějnost dvojitě zaslepených orálních testů: Niggeman & Beyer(2007) poukazují na možné problémy vedoucí k falešné pozitivitě či negativitě.

### 3.3.3 Diagnostika alergenicity

Schopnost daného jídla/zvířete/rostliny, respektive konkrétní molekuly působit alergenně může být testována na mnoha úrovních - klinické, imunologické i genetické. Měří se síla imunitní reakce a množství alergenu ve vzorku, protože obojí může jistou měrou přispívat k výsledné alergenitě (Fuchs et al. 2014).

Ke stanovení alergenicity používáme zkoušky *in vitro* a *in vivo*. *In vivo* jsou prováděny především **kožní prick testy (SPT)** z důvodu nižší náročnosti oproti orálním expozičním testům v případě potravin a inhalačním v případě aeroalergenů (Huang et al. 2018). Ke zkouškám *in vivo* je vždy potřeba skupina alergických pacientů. Na rozdíl od předchozích typů studií jsou však nyní oni sami v roli diagnostického nástroje a proto musí být náležitě „kalibrováni“, zejména je nutné vyloučit jedince senzibilizované na jiné alergeny v daném jídle. Také pro **sérologické *in vitro* testy** by měl být zajištěn dostatek sér pro napodobení vzorce průměrné alergické populace (Savazzini et al. 2020). Tato séra jsou využita pro detekci předpokládaných alergenů při imunoblotu (Vegro et al. 2015).

Provádí se také test aktivace bazofilů a uvolňování mediátorů - v tomto případě jsou zdrojem bazofilů většinou pokusná zvířata, imunizovaná daným alergenem, nebo buněčné kultury (Crockard & Ennis 2001). Hodnotí se schopnost alergenu přemostit IgE receptory. V případě testování odrůd na aktivitu různých izoform hodnotíme pouze tuto izoformu ve vztahu k celku. Huang et al. (2018) ve své práci shrnuje všechny současně používané degranulační modely.

Někdy je potřeba testovat u alergenu imunogenicitu - zejména chceme-li vytvořit účinný hypoalergenní protein pro imunoterapii. Ta byla dříve testována na geneticky upravených myších kmenech, především BALB/c, C57BL/6 a A/J (Liu et al. 2016). Egger et al. (2011) dokazuje, že panuje závislost mezi mírou imunogenicity a náchylností alergenu k enzolyzozomální proteolýze. Nabádá proto vědce k tomuto účelu používat kultury dendritických buněk, čímžby se snížily počty používaných laboratorních zvířat pro testování.

Pro lokalizaci alergenu v konkrétní rostlinné tkáni používáme metodu immuno-tissue printing (Lezica et al. 2015), kdy je na tenký plátek vzorku přenesena nitrocelulósová

membrána, která vsaje přítomné proteiny a zároveň zamezí veškeré difuzi, takže proteiny zůstanou na místě a je možné je detekovat hybridizací s protilátkami. Pro jablko tuto metodu rozpracovali Marzban et al. (2005).

Míra alergenicity potravin často odpovídá také množství obsaženého alergenu či přímo některé z jeho izoform, jako je tomu např. u Mal d 1.02 (Vegro et al. 2016). Některé odrůdy s nižší expresí se mohou dostat pod prahovou hodnotu citlivosti průměrných alergiků a lze je doporučit ke konzumaci jako hypoalergenní (Notghegger et al. 2020).

Kvantifikovat můžeme samotný protein nebo jeho mRNA. V případě **proteinu** samotné zkoušce často předchází výroba vlastních polyklonálních protilátek schopných navázat všechny známé izoformy a jejich epitopy, protože heterogenní krevní séra pacientů by je nemusela pokrýt. Na základě dostupných sekvencí všech známých izoform jsou dle počítačového modelu rekombinantně připraveny peptidy, kterými jsou následně inokulována laboratorní zvířata, často např. králíci. Protilátky z jejich séra jsou poté použita pro hybridizaci s lineárními epitopy alergenů při Western blotu. Tento postup byl použit např. ve studii Vegro et al. (2016) při kvantifikaci Mal d 1.

Množství mRNA se stanovuje metodou RT-PCR. Izolovaná RNA je nejprve přepsána do cDNA (complementary DNA) za pomoci reverzní transkriptázy a poté probíhá klasická polymerázová řetězová reakce (PCR) v přístroji s názvem light cycler. Amplifikaci produktu můžeme díky fluorescenčnímu značení sledovat v reálném čase (real-time PCR). Této metodě se bude podrobněji věnovat celá kapitola č.3.5 a následná experimentální část práce.

V běžné praxi bývá při porovnávání odrůd z časových, kapacitních i finančních důvodů často preferován jeden, nejjednodušejší proveditelný test. Výsledky *in vivo* a *in vitro* testů mohou být však navzájem odlišné (García Casado et al. 1996). Nejlepším řešením je zpočátku volit metod vícero a teprve po opakovaném ujištění, že mezi výsledky existuje jasný vztah, je správné spoléhat se pouze na jednu z nich (Asero et al. 2006).

### 3.4 Jablko (*Malus × domestica*) a jeho alergeny

„An apple a day keeps the doctor away.“

Anglické pořekadlo

Jablko je nejkonzumovanějším ovocem mírného pásma a z hlediska vyprodukované tonáže patří mezi dvacítku nejpěstovanějších plodin na světě (FAO 2014). Je pozitivně hodnoceno pro svůj vysoký obsah rostlinných sekundárních metabolitů jako např. antokyany, quercetin, katechin, floridzin nebo kyselina chlorogenová, které jakožto polyfenoly sice nejsou molekulárními biologi příliš vítány kvůli tvorbě komplexů s nukleovými kyselinami, ale jsou konzumenty ceněny zejména pro své antioxidační účinky (Boyer & Liu 2004). Obsah všech polyfenolů v jablku se pohybuje kolem 132 mg/100g (Suková 2008). Počítáme-li polyfenoly volné i vázané, jablko se mezi ovocem umísťuje na druhém místě hned za brusinkou (Sun et al. 2002). Mnoho studií považuje tyto a další látky, jako např. triterpeny a karotenoidy, za aktéry při prevenci kardiovaskulárních chorob, diabetu, obezity či osteoporózy (Boyer & Liu 2004; Vafa et al. 2011)



a bylo také prokázáno jejich antiproliferativní působení na rakovinné buňky *in vitro* (Thompson et al. 2009).

### 3.4.1 Produkce

Na celém světě se každoročně vyprodukuje kolem 86 milionů tun jablek, přičemž celosvětová produkce nadále roste. Zdaleka největším producentem jablek je Čína, která sama produkuje kolem 40 milionů tun jablek ročně (Yan et al. 2018). Po ní následuje s velkým odstupem Evropská unie s necelými 10 miliony tun jablek, dále USA s 5 miliony jablek a Turecko se 3 miliony tun jablek (Czernyszewicz 2016). Podíl EU na světové produkci se pozvolna snižuje, zatímco podíl Číny, Ruska, Indie, Turecka či Brazílie dlouhodobě roste. Obecně se dá říci, že nejrychleji se zvyšuje produkce jablek v Asii, ovšem většina této produkce se zde také spotřebuje (Wang et al. 2016). Česká republika produkuje ročně zhruba 110 tisíc tun jablek a z hlediska objemu produkce je tak na 51. místě na světě. Spotřeba jablek v ČR na obyvatele činila dle ČSÚ v roce 2017 průměrně 82 kg za rok (MZe, 2019)

### 3.4.2 Původ a biologie

Jablko je plodem jabloně domácí (*Malus × domestica*), ovocné dřeviny z čeledi *Rosaceae* spadající do kladu *Rosida*, který zahrnuje až třetinu všech kvetoucích rostlin (Velasco et al. 2010) a uvnitř něj pak do řádu *Rosales* (růžotvaré). Molekulární taxonomie na základě chloroplastového genomu řadí jablko společně s hruškami (*Pyrus*) a některými dalšími malvicemi z čeledi *Rosaceae* do kmene *Maleae* (Zhang et al. 2017; Turland et al. 2018).

Domestikace jabloně proběhla před 10 000 - 4000 lety ve střední Asii. Přesné genetické události, jakými došlo k přerodu původních planých kyselých plodů v požitelnou a chutnou potravinu, nejsou příliš známy (Gross et al. 2014). Výrazná malvice u jablka a jeho blízkých příbuzných se zdá být výsledkem expanze genové rodiny transkripčních faktorů MADS-box (Velasco et al. 2010).

Jablono se nejvíce daří při průměrné roční teplotě nad 6,5 °C na dostatečně osvětlených plochách, srážkové optimum je okolo 500-800 mm. Preferuje půdy humózní, hlinitopísčité až hlinité, nezamokřené, s půdní reakcí mezi 5 - 7,5 (Vaněk et al. 2012).

Jablono, stejně jako mnoho jiných druhů z čeledi *Rosaceae*, vykazuje gametofytickou inkompatibilitu (GSI). Samosprašné jablono jsou poměrně vzácné. GSI na pestíku je regulován extacelulární ribonukleázou, S-RNázou, která je kódována lokusem S (Pereira-Lorenzo et al. 2018). Toto může činit problémy při křížení blízkých příbuzných jabloní.

Původ jabloně domácí byl dlouho spojován s *Malus sylvestris*, nicméně genomové analýzy posledních deseti let ukazují, že primárním předkem je spíše *Malus sieversii* pohoří Ťan Šan v Kazachstánu a *M. sylvestris* byl pouze sekundárním přispěvatelem, jehož introgrese však proběhla poměrně nedávno a byla tak intenzivní, že současně pěstovaná jablka se jeví blíže tomuto druhu než svému skutečnému zakladateli. Duan et al. (2017) sestavili komplexní evoluční mapu dokumentující jak se původně domestikovaná *Malus sieversii* postupně šířila z centrální Asie podél Hedvábné stezky až do západní Evropy, přičemž cestou docházelo k hybridizaci s druhy sibiřskými (*M. baccata*), kavkazskými (*M. orientalis*) a evropskými (*M. sylvestris*).

### 3.4.3 Odrůdy

Během staletí náhodných výběrů i cíleného šlechtění získalo jablko svůj současný fenotyp, přizpůsobený lokálním podmínkám a ovlivněný křížením, což vedlo ke vzniku mnoha specifických odrůd. Některé staré odrůdy jako např. 'Lady' nalezneme v historických pramenech už v raném 16. století a jejich sady stále existují (Marini et al. 2018). Světová produkce jablek v posledních 50 letech je nicméně založena na asi dvacítce nových či vylepšených kultivarů s vlastnostmi více odpovídajícími intenzivnímu pěstování a prodeji na globálním trhu (Sansavini et al. 2004). Jsou to především 'Golden Delicious', 'Red Delicious', 'McIntosh', 'Gala', 'Granny Smith', 'Fuji', 'Braeburn', 'Pink Lady', 'Jonagold', 'Idared' a 'Florina'. Nejstaršími běžně užívanými, více než sto let starými odrůdami, jsou 'Golden Delicious' a 'Jonathan', které byly a stále jsou základem pro tvorbu mnoha nových odrůd. Nizozemské odrůdy 'Santana' a odrůda 'Elise' jsou pak doporučovány jako hypoalergenní, což bylo potvrzeno i na základě dvojitého zaslepených expozičních testů (Vlieg-Boertstra et al. 2011).

V České republice jsou z hlediska výměry sadů i produkce v tunách nejběžnějšími kultivary 'Golden Delicious', 'Jonagold', 'Gala' a 'Rubín' (Buchtová et al. 2011). Mezi staré odrůdy s dlouhou tradicí pěstování na českém území patří např. 'panenské české' nebo „branátka“ ('Hetlina') a oblíbené mezi zahrádkáři jsou také zahraniční staré odrůdy jako 'Boskoopské' nebo 'Matčino'. Nejvýznamnější moderní české odrůdy vznikaly v 90. letech v Ústavu experimentální botaniky AV ČR ('Rubín', 'Melodie', 'Topaz') a ve VŠÚO Holovousy ('Frosta', 'Julia', 'Meteor', 'Angold', 'Resista') (Blazek et al. 2013).

### 3.4.4 Genetika

Rok 2010 znamenal významný průlom pro výzkumníky i šlechtitele: díky úsilí čtrnácti institucí z pěti zemí byl publikován první celý genom jablka. Velasco et al. (2010) zvolili k sekvencování referenčního genomu odrůdu 'Golden Delicious'. Jablko se tak stalo desátým osekvenovaným rostlinným genomem po huseníčku (nejrozšířenější modelový organismus), rýži, topolu, hroznu, papáje, čiroku, okurce, kukuřici a sóje (Peace et al. 2019). Fragmenty sekvencí byly sestaveny *in silico* do překrývajících se souvislých segmentů (tj. kontigů) a tyto kontigy byly následně přiřazovány k úsekům jednotlivých chromozomů za použití genetické mapy šesti rodin ( $n = 720$  potomků) s 1643 genetickými markery, většinou SNP ze samotného genomu Golden Delicious.

V průběhu dalších let byly osekvenovány další tři genomy (Li et al. 2016; Daccord et al. 2017; Zhang et al. 2019). V jablku bylo identifikováno 42 140 protein kódujících genů a 1965 neproteinových genů (Daccord et al. 2017). Velasco et al. (2010) uvádí o něco více - 57 386 genů, a Li et al. (2016) 56 687, z toho protein kódujících 53 922. Odhad velikosti genomu v haploidním stavu se pohybuje mezi hodnotami 742,3 (Velasco 2010) a 651 Mb (Daccord et al. 2017). Až 60% celého genomu pak tvoří vysoce repetitivní „temná hmota“ tvořená zejména transponovatelnými elementy (TE) neboli transpozony (Daccord et al. 2017).

Počet chromozomů jabloně v haploidním stavu se odlišuje od ostatních členů čeledi *Rosaceae*. Zatímco většina z nich disponuje 7,8 či 9 chromozomy, u jabloně a dalších druhů

kmenu *Maleae* je  $n=17$ . Těchto 17 chromozomů je monofyleticky odvozeno z relativně nedávné celogenomické duplikace ( $> 50$  milionů let) z 9-chromozomových předků (Velasco et al. 2010). Většina jabloní je diploidní, což z nich dělá dobrý modelový organismus, ačkoli primární sekvenování technicky poměrně komplikuje vysoká míra heterozygotnosti, která např. u 'Golden Delicious' dosahuje až 3,2 SNP/1000 bp (Peace et al. 2019). Některé odrůdy jsou triploidní (cca 10%) či tetraploidní. Nejlepšími opylovači jsou odrůdy diploidní, vykazující vysokou klíčivost. Triploidní odrůdy s 51 chromozomy, např. 'Jonagold' nebo 'Boskoopské', jsou ceněny pro svou větší velikost a celkovou odolnost, ale nejsou dobrými opylovači. Jejich pylová zrna jsou dobře rozeznatelná pod mikroskopem, neboť vznikají asymetrickým rozchodem chromozomů v meióze a zrna jsou tak výrazně větší ( $2n$ ) nebo naopak výrazně menší ( $n-1$ ) (Considine et al. 2012). Triploidní jsou pravděpodobně výsledkem spojení neredukovaného  $2n$  vajíčka oplodněného klasickou haploidní spermií, neboť zatímco neredukovaná pylová zrna jsou většinou sterilní, vajíčka si fertilitu zachovávají (Considine et al. 2016). Způsoby, jakými dochází ke vzniku polyploidů u jablek a jejich detekci se zabývá práce Pikunova et al. (2018).

Do budoucna směřují snahy překonat koncept jednoho referenčního genomu a spustit masivní sekvenování mnoha dalších stejně jako např. „Projekt 100 000 genomů“ u člověka a umožnit tak vzájemné porovnání a identifikaci markerů spojených s šlechtitelsky cennými vlastnostmi (Peace et al. 2019). V roce 2019 publikovali Zhang et al. nový referenční genom pomocí kombinace SMRT sequencing (single-molecule real-time sequencing), Hi-C sequencing a optického mapování a použili jej pro komparativní analýzu s dosud publikovanými genomy. Sledovali vysoce dynamický vývoj transpozonů a objevili např. LTR (retrotransposon, který je spojen s fenotypem červené slupky, a může tak sloužit jako cenný nástroj pro šlechtění pomocí MAS (marker assisted selection). Paralelně s tímto přístupem se pomocí GBS (genotyping by sequencing) a SNP (single nucleotide polymorphism) screeningových metod daří čím dál podrobněji mapovat genetickou podstatu rozdílů mezi odrůdami a populacemi, čemuž odpovídá i nárůst identifikovaných QTL v genomové databázi *Rosaceae* (Soundararajan et al. 2019). Současné poznatky o genomu jablka shrnuje v obsáhlém review Peace et al. (2019).

U jablka probíhá také intenzivní zkoumání transkriptomu pomocí RNA-Seq, využívající metody sekvenování nové generace (Bai & Xu 2014).

Stále nicméně postrádáme hlubší pochopení genetické podstaty mnoha ekonomicky významných vlastností a funkce velké části genů zůstává stále neznámá (Zhang et al. 2019).

### 3.4.5 Šlechtění

Dle Pereira-Lorenzo et al. (2016) bylo posledních dekáдах šlechtění jablek zaměřeno zejména na tyto vlastnosti: estetickou stránku (tvar ovoce, velikost, barva slupky), kvalitativní (obsah cukru, enzymatické hnědnutí, pevnost pro lepší skladovatelnost), výstavbu stromu (např. sloupovitý růst jabloní usnadňující sklizeň), přizpůsobení klimatickým podmínkám (mrazuvzdornost, suchovzdornost) a rezistenci či toleranci vůči biotickým a abiotickým stresům (strupovitost, korová nekróza, bakteriální spála, napadení sviluškami). Právě poslední zmíněná vlastnost může mít zároveň spojitost s alergenicitou, jak upozorňuje Vegro et al. (2016). Hlavním alergenem jablka je Mal d 1, který patří do skupiny PR-10 proteinů zvyšující svou expresi v

odpovědi na stresové podněty (Pühringer et al. 2000) Zvýšená pozornost šlechtitelů na zlepšování odolnosti jabloní může tak být částečnou odpovědí na otázku, proč bývají staré tradiční odrůdy méně alergenní než odrůdy moderní.

V posledních letech pak vyvstávají šlechtitelům nové výzvy v podobě vzrůstajícího zájmu společnosti o životní prostředí a své vlastní zdraví, což povede k šlechtění na vlastnosti dosud spíše opomíjené jako např. nutriční vlastnosti jablka, jeho alergenicita a schopnost růstu v režimu udržitelné produkce (Farneti et al. 2015). K tvorbě hypoalergenních odrůd bylo již úspěšně použito metody RNA-interference (Gillissen et al. 2005; Krath et al. 2009; Dubois et al. 2015), ale vzhledem k současně platné legislativě nepřátelské vůči genovému inženýrství nemá v Evropě tento přístup příliš budoucnost a zdejší úsilí tkví především v aktivním testování vhodných kultivačních podmínek a vyhledávání genotypů vykazujících nízkou alergenicitu potvrzenou kombinací orálních provokačních testů a stanovení množství proteinu, jak ukazují recentní práce Romer et al. (2020) a Nothegger et al. (2020).

### 3.4.6 Jablečné alergeny

Jak již bylo zmíněno výše, v rámci světové populace existuje skupina lidí, která by úvodní frází o zdravotních benefitech jablka mohla použít v opačném významu - jablka konzumovaná v čerstvém stavu u nich totiž vyvolávají alergickou reakci, která v nezhledná končí cestou k lékaři pro radu. V 40 - 90 % případů (rozpětí je obrovské z důvodu nekonzistence těchto studií, dle Carlson & Coop 2019) se naštěstí jedná o lehké lokální symptomy v dutině ústní, tedy OAS (Ebner et al. 1991). Tato reakce je způsobena zkříženou reaktivitou hlavního jablečného alergenu **Mal d 1** na březový pyl, což omezuje výskyt těchto alergií na areál výskytu břízy - zejména střední a severní Evropa. Minoritním alergenem způsobujícím OAS je Mal d 4 - protein z rodiny profilinů, jehož homologem je březový Bet v 4 (Ma et al. 2006). Ve Středomoří naopak převažují potíže lokalizované ve střevech a závažnější systémové reakce, které jsou spojeny se senzibilizací na některé trávové pyly a broskvev (Pastorello & Rivolta et al. 2004). Tyto těžší symptomy jsou spojovány s odolnějšími alergeny Mal d 2 (Krebitz et al. 2003) a Mal d 3 z rodiny LTP (Diaz-Peralez et al. 2003), schopnými perzistovat v zažívacím traktu.

**Mal d 2** je součástí genové rodiny PR-5 proteinů, zvaných také thaumatin-like (TLP) (Bohle et al. 2006). Purifikovaný Mal d 2 vykazuje stejnou abnormální migraci v SDS polyakrylamidové gelové elektroforéze jako ostatní TLP a to díky hojnosti disulfidových můstků, které zvyšují jeho odolnost a stabilitu jakožto alergenu (Breineneder et al. 2004). Protein je lokalizován v dužině a jeho množství vzrůstá během zrání. Vyskytuje se v glykosylované a neglykosylované formě (Breitededer et al. 2004), přičemž první zmíněný stav je spojován s vyšší schopností vázat IgE protilátky v sérech alergických pacientů a to ze 70% oproti 15% (Herndl et al. 2007). Na alergenicitu Mal d 2 má vliv vitamin C a síra (Marzban et al. 2014).

Mal d 3 patří mezi nespecifické lipid-transfer proteiny - nsLTP, taktéž velmi stabilní díky disulfidickým můstkům (Diaz-Peralez et al. 2003) a jeho přítomnost je omezena pouze na dužinu (Sancho et al. 2006). Vykazuje odolnost vůči tepelnému zpracování při 90°C (Sancho et al. 2003) a jeho obsah v průběhu skladování klesá (Sancho et al. 2006).

### 3.4.6.1 Genová rodina Mal d 1

Genová rodina Mal d 1 je z hlediska alergie na jablko nezávažnější. Jedná se o hlavního původce pollen-food syndromu (PFS) (Carlson & Coop 2019). Jeho vysoce alergenní potenciál je dán jeho 3D strukturou ustavující na povrchu proteinu konformační epitopy shodné či velmi podobné s epitopy na homologních proteinech břízy (Bet v 1) (Vanek-Krebitz et al. 1995). IgE protilátky alergika senzibilizovaného původně břízou tak mohou zkříženě reagovat i s Mal d 1 a způsobovat tak lokální alergické reakce v ústní dutině známé jako OAS (Ortolani et al. 1988).

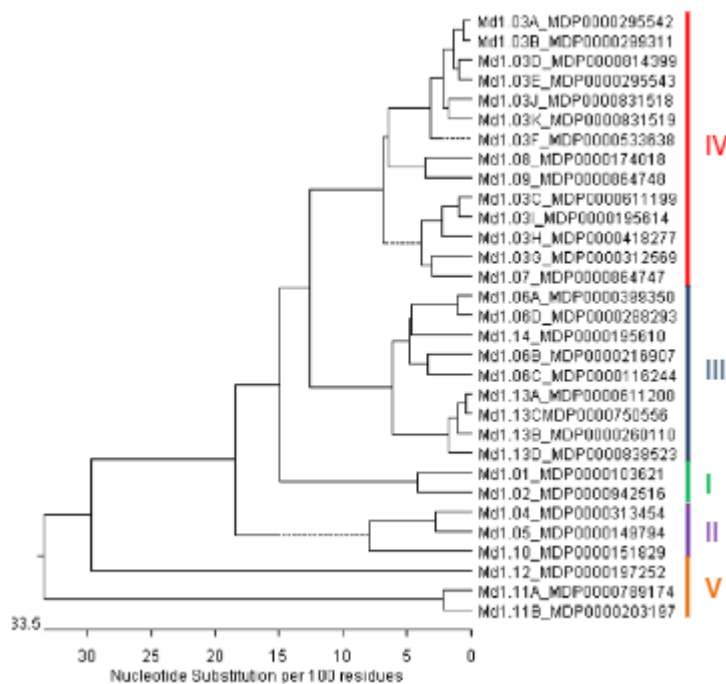
### 3.4.6.2 Sekvence Mal d 1

V genomu jabloně se nachází celkem 31 genů kódujících Mal d 1 izoalergeny (Pagliarani et al. 2012). Dohromady tvoří jednu vazebnou skupinu na 16. chromozomu (Gao et al. 2005). Tyto geny můžeme na základě sekvenční identity a délky intronů rozdělit do pěti skupin (Gao et al. 2005), jak je možné vidět na obrázku 2. V. skupina, identifikovaná Pagliarani et al. (2012), čítající geny Mal d 1.11A, 1.11B a 1.12, jejichž nukleotidová a následně i aminokyselinová sekvence vykazuje oproti ostatním značné rozdíly a to zejména v pozicích epitopů (Pagliarani et al. 2013). Pořadí nukleotidů v genech v rámci jedné skupiny vykazuje 86 - 98,1% shodnost, zatímco mezi jednotlivými skupinami dosahuje 71-83% (Gao et al. 2005). V těchto datech nicméně není zahrnuta skupina V., popsána až v roce 2012.

Každý izoalergen má také několik alelických variant (izoforem). Ahammer et al. (2017) uvádí, že prvními izoformami, jejichž sekvence DNA byly přečteny, se staly Mal d 1.0101 z 'Granny Smith' a Mal d 1.0102 z 'Golden Delicious'.

Gao et al. (2008) uvádí u izoalergenu Mal d 1.06 C až šest proteinových variant. Práce Bokszczanin et al. (2015) pak v průzkumu polských odrůd odhalila další tři nové alely z celkových sedmi u Mal d 1.01 a k jedné známé alele u 1.02 přidala dvě další.

Ačkoli sekvenční identita alel v jednom genu se pohybuje mezi 98 - 100 % (Gao et al. 2005), jedna z alel genu 1.06A je některými autory (Pagliarani et al. 2012; Savazzini et al. 2020) diskutována jako potenciálně související s vyšší alergenicitou několika kultivarů a to na základě pozorování ve studii Gao et al. (2008).



**Obrázek 2. Strom příbuznosti Mal d 1 izoalergenů sestavený na základě kódující sekvence 31 genů získaných z referenční odrůdy Golden Delicious. Římské číslice značí rozdělení do pěti podrodin (Pagliarani et al. 2012).**

### 3.4.6.3 Protein Mal d 1

Mal d 1 spadá do kategorie PR-10 proteinů, jejichž charakteristická struktura s velkou hydrofobní dutinou je konzervována napříč rostlinnou říší a díky prvotnímu soustředění výzkumníků na březový pyl jsou také známé jako Bet v 1 homology (van Loon et al. 2006). Vlastnosti a předpokládané funkce v organismu u této skupiny byly detailněji rozebrány v kapitole 3.2.3. a Mal d 1 tyto obecné charakteristiky větší či menší měrou sdílí (Vanek-Krebitz et al. 1995).

Panuje názor, že různé izoalergeny mohou být specializovány pro různé funkce, což je podpořeno nejen jejich odlišnou expresí, jak popisuje následující kapitola, ale také záměnami v některých aminokyselinových pozicích (Romer et al. 2020), které vedou u některých izoform k prokazatelně rozdílným fyzikálně chemickým vlastnostem jako např. posunu izoelektrického bodu, změně indexu stability (Savazzini et al. 2020), nebo snadnější schopnosti tvořit oligomery díky cysteinovým mutacím (Rouvier et al. 2010; Ahammer et al. 2017). Konformační variabilita mezi izoformami má pak zásadní imunologický dopad.

Testy alergenicity dokazují, že alergická reakce není vždy přímo úměrná celkovému obsahu proteinu (Vegro et al. 2016; Kschonsek et al. 2018). Recentní publikace Romer et al. (2020) poskytuje rozsáhlou proteomickou analýzu izoalergenů a jejich alel, následovanou orálními provokacemi. Byly identifikovány některé velmi variabilní regiony, z nichž některé unikátní sekvence vykazovaly odrůdovou specifitu a vykazovaly korelace s alergenicitou. Příkladem může být např. peptid LYYYALVLDADNLLPK, nalezený pouze u vysoce alergenní odrůdy 'Golden Delicious', který zároveň spadá do míst pravděpodobně se vyskytujícího epitopu. Tento i další předpokládané IgE epitopy je možné nalézt v databázi <https://ideb.org>.

Výzkumu epitopů u Mal d 1 se věnují mutačních studie (Holm et al. 2011; Hecker et al. 2012; Roulias et al. 2014), z nichž vyplývá, že Mal d 1 sdílí pouze některé epitopy s Bet v 1 (např. BV16), jednotlivé izoformy se liší a pomocí několika málo aminokyselinových záměn je možné docílit IgE reaktivity.

V roce 2017 byla publikována první strukturní analýza proteinu Mal d 1, konkrétně izoformy Mal d 1.0108, pomocí NMR spektroskopie (Ahamer et al. 2017). Díky tomu je nyní možné přesněji predikovat možné epitopy *in silico*, např. na základě srovnání s o mnoho prozkoumanějšími epitopy u Bet v 1 (Savazzini et al. 2020).

Nejprůkaznější metodou je pak krystalizace s Fab fragmenty monoklonálních protilátek, kterou provedl Mirza et al. (2000) u Bet v 1. K průkazu více než jednoho identického epitopu zatím krystalizace provedena nebyla ani u Bet v 1 ani u Mal d 1 a důkazy o multivalenci, ačkoli se předpokládá, nebyly autorkou této bakalářské práce v dostupné literatuře nalezeny. Roli může hrát dimerizace (Rouvinen et al. 2010), ačkoli Roulias et al. (2014) prokázali, že mezi dimerem a monomerem Mal d 1 nejsou v alergenicitě a imunogenicitě rozdíly.

Séra pacientů reagujících na Mal d 1 jsou polyklonální – obsahují různé typy protilátek, vážících různé epitopy (Asero et al. 2006). IgE profily jednotlivých pacientů se mezi sebou liší (Marzban et al. 2005; Savazzini 2020). Dlouho byly z hlediska afinity k IgE zkoumány pouze proteiny 1.01 a 1.02 (Son et al. 1999). Vegro et al. (2016) a zejména Savazzini et al. (2020) se věnovali více izoalergenům. Tato skupina podrobila testování také 07, 06B a 11A. Mal d 1.11A vykazoval velmi slabou, téměř žádnou reaktivitu, což ve shodě se sekvenčními daty ze studie Pagliarani et al. (2012) zmíněnými v předchozí kapitole.

#### 3.4.6.4 Genová exprese Mal d 1

V roce 2012 publikovali Pagliarani et al. sekvence primerů založených na SNP pro každý jednotlivý izoalergen. Z celkového počtu 31 byla prokázána exprese dvaceti z nich (Pagliarani et al. 2012). Zdá se, že všech dvacet zmíněných genů je exprimováno alespoň v nejmenší možné detekovatelné míře v každé zkoumané odrůdě (Pagliarani et al. 2013; Vegro et al. 2016).

Mezi exprimované geny patří celá skupina I, skupina V, někteří členové rodiny III (1.06A, 1.06B, 1.06C, 1.13A, 1.13B, 1.13D) a rodiny IV (1.03E, 1.03K, 1.03F, 1.03G, 1.07, 1.08). Rodina II se zdá být transkripčně neaktivní. Mezi nejvíce exprimované geny, které jsou většinou používány k analýzám, patří tato desítka: 1.01, 1.02, 1.06A, 1.06B, 1.11A, 1.13A, 1.03A, 1.03D, 1.03E, 1.07 (Pagliarani et al. 2013).

Množství transkriptu jednotlivých izoform je nicméně tkáňově i odrůdově specifické.

Celková exprese Mal d 1 rodiny je vyšší ve slupce než v dužině (Fernandez-Rivas et al. 1999; Zunová 2017).

Nejvyšší expresi napříč tkáněmi i kultivary vykazují Mal d 1.01 a 1.02 (Pagliarani et al. 2013; Vegro et al. 2016; Zunová 2017; Táborská 2018), zpravidla o několik řádů, a jsou proto řazeny mezi významné izoalergeny. Údaje se však mezi jednotlivými autory liší. Pagliarani et al. (2012) udává jako nejvíce exprimovanou izoformu 1.01, zatímco 1.02 je zmiňována u Beuning et al. (2004) a Botton et al. (2008).

Zajímavou se v tomto kontextu jeví izoforma 1.11A, jejíž exprese nebývá obvykle příliš vysoká. Odrůda Calvilla Bianca d'Inverno, která zároveň jeví hypoalergenní vlastnosti, vykazuje nebývale vysoké množství tohoto transkriptu a adekvátně s tímto dramaticky sníženou expresí 1.02 (Vegro et al. 2016). Autoři také uvádějí, že ve slupce celkové množství Mal d 1 proteinu neodpovídá celkové imunoreaktivitě, což souhlasí i s Gao et al. (2008). Séra pacientů inkubovaná s rekombinantním proteinem r1.11A vykazují nejnížší, téměř žádnou reaktivitu (Savazzini et al. 2020). Sekvenování izoform odhalilo u V. skupiny, kam patří i 1.11A, malou sekvenční identitu s ostatními geny - u 1.11A je to pouhých 40% (Pagliarani et al. 2012) a několik amonokyselinových záměn najdeme i na velmi konzervovaných pozicích P-smyčky, které se zdají být klíčové pro tvorbu epitopu (Ghosh & Bhattachang 2007). Všechny tyto informace opět podporují hypotézy, že 1.11A není alergenem.

Vegro et al. (2016) testovali alergenicitu 24 odrůd pomocí RT-PCR, imunoblotu a SPT. Po seskupení dat do klastrů dle korelace výsledků se ukázalo, že významnou shodu ze všech tří metod vykazuje pouze Mal d 1.02. Výsledky SPT u zkoumaných odrůd potvrdil Nothegger et al. (2020) pomocí orálních expozičních testů. Imunoblot rekombinantního alergenu 1.02 se séry dospělých pacientů (Savazzini et al. 2020) jevil nejsilnější signál mezi ostatními testovanými geny 03G, 06B, 07, 1.11A, 1.13B), nicméně druhý nejexprimovanější izoalergen testován nebyl. Za zmínku však stojí, že u dětských sér se jednalo o nejméně reaktivní alergen z těchto pěti a zdaleka největší afinitu pro IgE měl Mal d 1.07 (Savazzini et al. 2020).

Cílené snížení množství transkriptu izoformy 1.02 pomocí RNA-interference vedlo sice k výraznému snížení alergenicity, jak bylo dokázáno pomocí kožních prick testů, nicméně u jednoho nepovedeného mutanta, který expresi tohoto genu v listech snížil ale ve slupce naopak zvýšil, byla také prokázána redukce alergenicity oproti WT, ačkoli ne tak výrazná (Dubois et al. 2015). Exprese však nebyla zkoumána na úrovni proteinu.

Míra exprese i alergenicita Mal d 1 není ovlivněna pouze genotypem, ale také pěstební technologií (Matthes et al. 2009), obsahem polyfenolů (Vegro et al. 2016; Romer et al. 2020) a skladováním (Bolhaar et al. 2005; Sancho et al. 2006). Tento fenomén podstatou PR-10 proteinu - během skladování je plod vystaven velkým stresům (Beuning et al. 2004). Byl také potvrzen vliv ethylenu během zrání (Yang et al. 2012) a zvýšená alergenicita po skladování v řízené atmosféře (Sancho et al. 2006, Táborská et al. 2018). Roli hraje také sucho (Romer et al. 2020).

Promotor tohoto genu byl studován v práci Puehringer et al. (2000) vložním před reportérovým genem v transgenním tabáku a byla prokázána jeho indukce celou řadou biotických i abiotických stresů. Transkripční variabilita je pravděpodobně způsobena změnami v promotorové sekvenci. Žiarovská et al. (2019) provedli štěpení promotorových sekvencí izolovaných z Mal d 1 genů u různých odrůd a prokázali významný rozdíl v délce fragmentů mezi hypoalergenními odrůdami 'Santana' a 'McIntosh' oproti ostatním odrůdám. Rozdíly byly zaznamenány i mezi jednotlivými odrůdami, nicméně analýza izoform nebyla provedena.

O tom, jak sekvenční variabilita mezi izoformami a izoalergeny ovlivňuje aktivitu promotorů, neexistuje mnoho informací. Jen velmi málo je toho známo o molekulární podstatě měnící expresi Mal d. Jeho specifické transkripční faktory a další regulující proteiny jako enhancery apod. prozatím zůstávají neznámé.



### 3.4.7 Alergenicita kultivarů

Kultivary jsou běžně rozdělovány na vysoce, středně a málo alergenní (Kiewning 2014). Mnoho autorů shoduje na tom, že mezi vysoce alergenní odrůdy patří 'Golden Delicious' a odrůdy, které z něj byly vyšlechtěny jako 'Jonagold', 'Jonaprince' nebo české odrůdy 'Hetlina' (Prošková et al. 2013). Dle Proškové et al. (2013) vykazuje však alergenicitu odrůd jako 'Hetlina' či 'Florina' velký vliv ročníku, což potvrzuje Vegro et al. (2016) a Romer et al. (2020) i pro další odrůdy.

Jako hypoalergenní jsou označovány odrůdy 'Santana' (Gilissen 2005), 'McIntosh' (Bolhaar et al. 2005; Kootstra et al. 2007), 'Elise', 'Pink Lady' a 'Modi' (Vlieg-Boerstra et al. 2011), z nichž poslední jmenovanou však Vegro et al. (2016) uvádí jako středně alergenní. Z nových českých odrůd vykazuje nejnižší alergenicitu 'Topaz' a 'Angold' (Prošková et al. 2013).

Zajímavé je srovnání starších a novějších odrůd. Nové kultivary, často šlechtěné na nižší obsah polyfenolů pro eliminaci natrpklé chuti a enzymatického hnědnutí, jsou dle práce Kschonsek et al. (2018) více alergenní, což je v souladu s prací Romera et al. (2020), který zjistil korelaci mezi množstvím polyfenolu flavan-3-olu a alergenitou. U starých odrůd ('Ontario', 'Dulmener', 'Rosenapfel') byla až o 62% nižší alergenita - měřená metodou ELISA - než u nových ('Braeburn', 'Granny Smith') a rostla úměrně k nižšímu enzymatickému hnědnutí a obsahu polyfenolů (Kschonsek et al. 2018). Nižší alergenitu starých odrůd uvádí na základě sérologických a kožních testů i Vegro et al. (2016) a jeho výsledky byly potvrzeny orálními provokacemi (Nothegger et al. 2020). Jako důvod autoři uvádí zejména šlechtitelské preference rezistentních vlastností, kterými byla spolu s vyšší expresí některých izoform PR-10 proteinů do genotypu potichu vnesena také vyšší alergenita. Naopak hypoalergenní odrůdy jako 'Santana' a 'Elise' exprimují převážně předpokládaně nealergenní izoalergen Mal d 1.11A (Vegro et al. 2016).

Táborská (2018) sledovala, jak se mění exprese vybraných kultivarů před a po skladování. Z výsledků je patrné, že některé odrůdy řazené po sklizni mezi nízkou až středně alergenní, např. 'Frosta', vykazovaly po skladování tak vysokou expresi některých izoform, že předběhly většinu velmi alergenních odrůd.

Zdá se tedy, že alergenita je typem kultivaru určována jen do jisté míry (Savazzini et al. (2020). Významnou roli sice hraje skladba konkrétních alel, ale i přesto je patrné, že genotyp pouze určuje meze, v jakých se poměrně nestálá exprese může pohybovat v závislosti na konkrétních podmínkách, a tyto meze se u jednotlivých odrůd často překrývají. Alergenita je tak pokaždé souhrou mnoha vnitřních i vnějších faktorů, zahrnujících interakce s ostatními molekulami uvnitř plodu, infekci, pěstební techniku, způsob skladování a vliv ročníku.

### 3.5 Měření genové exprese pomocí kvantitativní PCR

Jádro každé buňky obsahuje v rámci téhož organismu shodnou genetickou informaci, z níž velké procento tvoří aktivně přepisovaná místa. Pouze několik procent těchto transkriptů tvoří klasické, protein kódující geny, kterých je u jablek k roku 2019 popsáno 42 140 tisíc (Peace et al. 2019). To, co odlišuje jednotlivé buňky, tkáně a orgány v rámci jednoho organismu od sebe je odlišný expresní profil. Při procesu genové exprese vzniká dle návodu konečný produkt, který vede k příslušnému fenotypu. Geny kódující informaci pro tento produkt - geny - uložené v

molekule DNA, jsou přepisovány do RNA, z nichž některé mají funkci samy o sobě (rRNA, tRNA, krátké RNA) a jiné slouží jako tzv. messengerové RNA (mRNA) k produkci proteinu na ribozomech. Mezi klíčové události ovlivňující, jak, kdy a kde bude gen exprimován, patří regulace jeho transkripční aktivity (modifikace histonů, cis elementy), posttranskripční úpravy (vyštěpování intronů, alternativní splicing), regulace translace (miRNA, lokalizace, načasování) a posttranslační modifikace (Alberts et al. 2017). Ve všech bodech hraje roli dostupnost všech potřebných proteinů a jejich konverze do aktivního stavu prostřednictvím fosforylace, vazby ligandu nebo naopak poklesu koncentrace jejich inhibitoru. Každá buňka se stabilně drží svého „expresního plánu“, v němž je zahrnuta také naprogramovaná reakce na vnější fyziologické podněty nebo stresory, které spouští signalizační kaskády vedoucí k aktivaci či supresi některých genů (Alberts et al. 2017).

Míra exprese zkoumaného genu je vyjadřována buď koncentrací proteinu přítomného ve vzorku, nebo množstvím jeho mRNA. Kvantifikace mRNA poskytuje informaci o transkripční aktivitě genu. Ne všechna mRNA však nutně vždy podléhá translaci. Příkladem může být např. inhibice translace prostřednictvím floémem transportovaných miRNA u rostlin (Zhang et al. 2009). Některé mRNA také mohou setrvávat dlouhý čas v dormantním stavu (Villalba et al. 2011). Objektivnějším přístupem je zaměřit se na samotný protein, čímž se při měření alergenicity dostáváme blíže skutečnosti, protože alergenem je peptid, nikoli nukleotidový návod na něj. Práce s proteiny je však obtížná a zdlouhavá a na rozdíl od nukleových kyselin v běžné praxi dosud neexistují dostupné nástroje, které by umožňovaly jejich skutečně spolehlivou kvantifikaci, zejména jedná-li se o jednotlivé izoalergeny lišící se o několik málo aminokyselin (Bohle et al. 2006; Pagliarani et al. 2013). Velmi nápomocná při rozlišování jednotlivých izoform je hmotnostní spektrometrie (Romer et al. 2020).

Použití kvantifikace mRNA by mělo předcházet ověření, zda poměr mRNA/protein není příliš vychýlen směrem k mRNA (Silva et al. 2016). Edfors et al. (2016) navrhuje stanovit poměr RNA/protein zvlášť pro každou tkáň/buněčnou kulturu a přepočítávat každá další měření získanými koeficienty. Rozdíly v poměru mRNA/protein většinou zůstávají pod přijatelnou hranicí, ale dvojnásobné či nižší změny mohou mít podstatné funkční důsledky (Silva et al. 2016). V případě stanovení alergenů nás však spíše než změna funkce zajímá vliv na alergenicitu. Vegro et al. (2016) prokázali, že u Mal d 1 množství mRNA u dvou zřejmě nejvýznamnějších izoalergenů Mal d.1.02 a Mal d 1.01. koreluje jak s množstvím proteinu, tak s alergenicitou, takže použití mRNA kvantifikace je možné.

Dříve byla k těmto účelům využívána RT-PCR následovaná Northern blotem, dnes se jedná především o real-time PCR (Wong & Medrano 2005). Metody izolace a detekce nukleových kyselin budou námětem následujících podkapitol.

### **3.5.1 Izolace nukleových kyselin**

Bez ohledu na zvolenou detekční metodu je nejprve nutné provést extrakci nukleových kyselin ze surového materiálu.

První známou extrakci DNA provedl švýcarský lékař a přírodovědec Friedrich Miescher roku 1869, kterému se z jader leukocytů alkalickou extrakcí a následnou acidifikací podařilo vysrážet látku bohatou na fosfát, kterou nazval nuklein (Dahm 2008).

Izolaci nukleových kyselin předchází odběr vzorků a jeho homogenizace. U rostlinného materiálu je vhodné, dovolí-li to podmínky experimentu, odebírat vzorek z mladých listů spíše než ze starších z důvodu nižšího obsahu polyfenolů, které mohou agregovat s proteiny a DNA či RNA a formovat z nich nežádoucí vysokomolekulární komplexy (Schneiderbauer et al. 1991).

Aby bylo možné určit zpětně výtěžek, je vzorek před dalším zpracováním nejprve zvážen. Drcení a homogenizace rostlinného materiálu probíhá v třecí misce za pomoci tekutého dusíku nebo ve speciálních homogenizátorech, často už za přítomnosti lyzačního pufru. Výsledná drť je přenesena do mikrozkušavky.

Klasická izolační procedura pak spočívá v odstředování této drti na centrifuze za postupného přidávání redukčních a denaturačních činidel, detergentů a organických rozpouštědel, které jsou součástí lyzačních a extrakčních pufrů v rámci komerčních kitů. Velké a těžké zbytky buněčných struktur jsou odstředivou silou vytlačeny ke stěnám, zbylý supernatant s lehčími komponenty je transferován do další zkumavky a proces se několikrát opakuje (Sambrook et al. 2006).

### 3.5.1.1 Buněčná lýze

Prvním krokem je **rozbití buněčných stěn a lýze membrán**, zahájená již důslednou homogenizací vzorku. Používá se detergentů. Detergenty jsou amfifilní molekuly, jejichž struktura jim umožňuje vmezeřit se svou nepolární částí do hydrofilních povrchů, rozbít je, vytrhávat fosfolipidy z membrány, obalit jednotlivé molekuly a umožnit mísení těchto látek s vodou díky vytrčení svých vlastních polárních konců do roztoku. Cetyl trimethylammonium bromid (CTAB) je kationtový detergent často používaný pro extrakce z rostlin díky své schopnosti rozpouštět buněčnou stěnu a vázat polysacharidy (Meisel et al. 2005). Dodecylsírán sodný (SDS) účinně trhá vazby mezi nukleovými kyselinami a proteiny, což je důležité pro oddělení od histonů či ribozomů a je často používán při alkalické extrakci DNA (Ehrt et al. 2003). N-Lauroylsarcosin (Sarcosyl) je vhodný pro práci při nižších teplotách, při kterých se jiné detergenty mohou srážet (Ali et al. 2017).

S obsahem cytosolu se do roztoku vylévají také nukleázy, jejichž neřízené aktivitě je třeba zabránit a předejít tak degradaci RNA. SDS a některé další silné detergenty jsou zároveň také chaotropními činidly. **Chaotropy** jsou látky schopné denaturovat proteiny díky rozrušování sítě vodíkových můstků (Salvi et al. 2005). Protein, náročný na hydratační obal, ztrácí konformaci. I některé ne-detergenty mohou být chaotropy, např. fenol, močovina či pro svou sílu velmi využívaný guanidium thiokyanát (Ali et al. 2017). Není přesně známo, jakým způsobem přispívá k denaturaci, neboť se jedná o velmi málo hydratovanou molekulu. Účinek zřejmě spočívá v přímé interakci s proteinem (Mason et al. 2003). B-merkapt ethanol (B-ME) působí jako redukční činidlo, které podporuje denaturaci ničením disulfidových můstků.

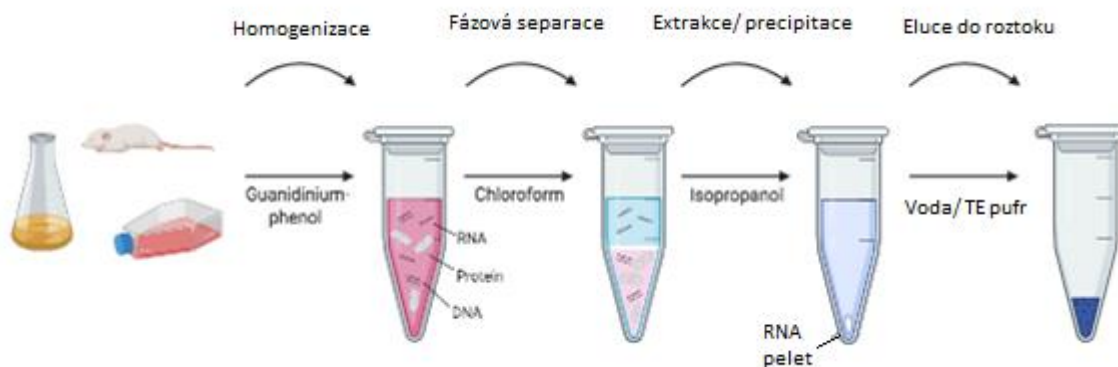
Pro udržení pH jsou přidávány pufrы jako např. TE pufr, obsahující trisaminomethan (Tris) a kyselinu ethylendiamintetraoctovou (EDTA). Ta zároveň nepřímo inhibuje RNázy a DNázy tvorbou chelátů s dvoumocnými jonty vápníku a hořčíku, které slouží jako enzymové kofaktory (Ali et al. 2017).

U vzorků s vysokým obsahem polyfenolů se do směsi přidává polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) jako látka se silně hygroskopickými vlastnostmi schopná na sebe tyto nečistoty vázat (Schneiderbauer et al. 1991). K degradaci proteinů je možné použít serinovou Proteinázu K. Ačkoli je sama proteinem, je vůči chaotropům a detergentům odolná a její aktivita s přidáním těchto komponent dokonce stoupá, protože preferenčně štěpí odhalená hydrofobní místa denaturovaných proteinů (Hilz et al. 1975).

### 3.5.1.2 Separace

Separace nukleových kyselin od proteinů se standardně provádí organickou extrakcí (Obrázek 3) a následným vysolováním či pomocí spinových kolonek. Existuje nesčetně mnoho protokolů lišících se v předepsaných reagentiích a jejich koncentracích (Ali et al. 2017). Složení mnohých extrakčních pufrů zná pouze dodavatelská firma. Základním principem organické extrakce je fázová separace rozpustných a nerozpustných látek pomocí dvou navzájem nemísitelných kapalin. Většina protokolů uvádí fenol a chloroform v poměru 1:1 (Sambrook & Russel 2006). Některé dále doporučují přidat k tomuto poměru 1/24 izoamylalkoholu pro prevenci přílišného pění (Asif et al. 2006). Po centrifugaci s lyzátem se ve zkumavce vytvoří dvě dobře viditelné fáze - vodní nahoře a fenol-chloroformová u dna díky vyšší hustotě obou látek. Na rozhraní se nyní nachází denaturované proteiny, zanořené svými nově odhalenými hydrofobními zbytky do spodní méně polární fáze, protože molekuly vody preferují nyní pouze interakce s jejich zbylými hydrofilními skupinami nebo mezi sebou. DNA a RNA si díky svým negativně nabitým fosfátům v neutrálním pH zachovávají rozpustnost a zůstávají tak ve vodné fázi (Alberts et al. 2017).

Vodná fáze je přenesena do nové zkumavky. Cílem následné purifikace je naopak udělat nukleovou kyselinu nerozpustnou a vysrážet ji na dně zkumavky. Toho je dosaženo přidáním isopropanolu společně s vysokou koncentrací rozpustných solí - např. octanu sodného (Ali et al. 2017). Za normálních okolností jsou nabitě fosfátové skupiny od interakcí s opačně nabitými ionty chráněny obalem z molekul vody, které jsou natočeny dle směru náboje. Izopropanol není tak silné dielektrikum a sodné jonty tak mohou být přitahovány, čímž dojde k neutralizaci náboje DNA nebo RNA a vysrážení na dně zkumavky, stejně jako zbylé soli. Pro odstranění těchto solí promýváme směs vychlazeným 75% ethanolem, který soli opětovně rozpustí a vypláchne, zatímco nukleové kyseliny zůstávají na dně a mohou být přeneseny do čisté zkumavky (Sambrook et al. 2006).



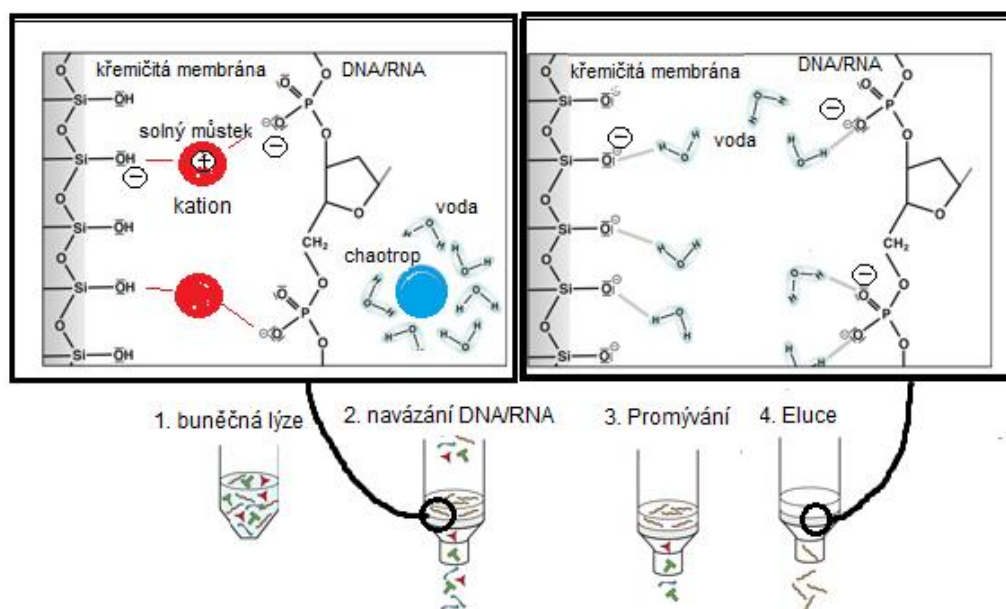
Obrázek 3. Princip organické extrakce

(upraveno dle: <https://blog.addgene.org/rna-extraction-without-a-kit>)

RNA a DNA mají velmi podobnou, ale nikoli stejnou chemickou strukturu. Přítomnost OH skupiny na 2' uhlíku ribózy a pravděpodobně i záměna thyminu za uracil mění do jisté míry chemické vlastnosti kyseliny ribonukleové oproti DNA, což se projevuje např. posunem pKA kyseliny fosforečné, která se udrží v disociovaném stavu při vyšší koncentraci  $H^+$  jontů. Toho se využívá při tzv. kyselé extrakci RNA (Chomczynsky & Sacchi 1989). Před extrakcí je k lyzátu přidán pufr, který sníží pH na hodnotu kolem 4. V tomto prostředí dochází u DNA fosfátů již k protonaci a molekula, stávajíc se nerozpustnou, je vypuzena do fenol-chloroformové fáze.

Při alkalické extrakci DNA se využívá faktu známého více než sto let - destabilizace RNA v prostředí o vysokém PH(Ehrt & Schnappinger 2003). Dochází k situaci, kdy z 2'OH skupina ribózy disociuje  $H^+$  a volný kyslík atakuje fosfor vedlejší báze, což vede ke zničení fosfodiesterové vazby(McMurry 2015).

Široce využívanou metodou se v poslední době stává také extrakce pomocí **adsorpčních kolon** (Vogelstein & Gillespie 1979), jak ukazuje Obrázek4.



**Obrázek 4. Princip vazby na kolonu za vysoké koncentrace solí.**

Přítomnost chaotropních činidel, ethanolu a izopropanolu v pufru umožní tvorbu kationtových solných můstků mezi záporně nabitým křemičitým povrchem a fosfáty. Po několika promývacích cyklech je navázaný materiál ponořen do čisté vody nebo pufru a dochází k eluci do roztoku (upraveno dle Vogelstein & Gillespie 1979). Je možné takto selektivně navazovat i proteiny a uhlovodíky, záleží pouze na použitém pufru.

Izolace nukleových kyselin je relativně jednoduchý a standardizovaný proces, který je však personálně i časově náročný a často vyžaduje práci se zdraví škodlivými chemikáliemi. Centrifugací je také část materiálu nenávratně zničena (Ali et al. 2017). Alternativní metodou, která si postupně v laboratořích nachází místo, je izolace pomocí magnetických částic, jejíž výhoda spočívá především v separaci DNA či RNA ze surového lyzátu bez nutnosti organické extrakce (Berensmeier 2006).

V nedávné době také skupina Foret et al. (2019) z Ústavu anorganické chemie v Brně vyvinula elektromigrační metodu zvanou epitachoforéza, užitečnou zejména pro velkoobjemové vzorky s nízkou koncentrací cílové DNA.

Různé protokoly pro extrakci RNA z jablek poskytují Mitra et al. (1993), Gasic et al. (2004), Asif et al. (2006) a Gambino et al. (2008). Srovnání všech metod z hlediska časové náročnosti, výtěžnosti RNA a její kvality se zabývá práce Tian et al. (2010).

### 3.5.1.3 Měření koncentrace a kvality

Koncentrace je určena pomocí spektrofotometrického stanovení absorbance při 260 nm. Hodnota 1 je naměřena při koncentraci 50 µg/ml dvouvláknové DNA nebo 40 µg/ml RNA. Toto měření je běžně prováděno přístrojem Nano Drop, který je schopen analyzovat i drobné kapky, takže není nutné vzorek ředit a provádět přepočty. Koncentrace je obvykle udávána v jednotkách ng/µl.

Celkový výtěžek je pak stanoven přepočtem na hmotnost vstupního materiálu zváženého před počátkem extrakce.

Čistota je měřena jako poměr absorbance při 260 a 280 nm, což odpovídá poměru mezi nukleovými kyselinami a proteiny. Za uspokojivě čistou je považována DNA v rozmezí hodnot 1,5 - 2, u RNA pak 2. Nižší hodnoty jsou známkami kontaminace a extrakt je nutné dále purifikovat. Nízký poměr absorbance 260/320 značí znečištění dalšími komponenty jako chaotropní soli nebo sacharidy (Ali et al. 2017).

### 3.5.2 Detekce nukleových kyselin a polymerázová řetězová reakce

K průkazu přítomnosti konkrétní části nukleové kyseliny je nutné učinit ji **rozlišitelnou** mezi ostatními. Toho bylo již od samých počátků molekulární biologie dosahováno elektroforetickou separací úseků, kterými jsou buď samotné RNA transkripty nebo fragmenty DNA rozštípané restrikcí endonukleázami (RFLP). Díky záporně nabitým fosfátovým skupinám migrují vlákna ke kladně nabitě katodě, v čemž jim částečně brání porézní agarózový gel. Menší molekuly tak putují rychleji a po vypnutí elektrod v gelu zůstanou různě vzdálené pruhy (Csako et al. 2006). Ty je možné vizualizovat díky interkalačním barvivům (Ethidium bromid, SYBR Green) pod UV světlem, což se využívá zejména pro kontrolu proběhla-li izolace nukleových kyselin správně (Alberts et al. 2017).

Pro lepší rozlišení je nutné provést tzv. **Southern blot**, nazvaný po jeho vynálezci, Edwinu Southernovi. DNA je z gelu přenesena na pevný nosič, přičemž si zachová své umístění. Používají se nitrocelulózoové nebo nylonové membrány (Csako et al. 2006).

Zobrazování je pak založeno na principu detekce signálu ze značených sond. Jedná se o krátké oligonukleotidy komplementární ke zkoumané sekvenci, které hybridizují s původními denaturovanými vlákny DNA. V minulosti byly sondy značeny radioaktivními izotopy, nyní jsou používána bezpečnější a méně náročnější fluorescenční barviva (Zipper et al. 2004).

Je-li však ve vzorku pouze malé množství cílových úseků, intenzita signálu je nízká a může se nacházet pod prahem citlivosti detektoru. **Zesílit signál** je v případě DNA možné buď

použitím více materiálu nebo namnožením zkoumaných úseků. V prvních desetiletích po Watson-Crickově objevu bylo toto množení složitou *in vivo* procedurou zahrnující rozštěpání DNA restrikcími enzymy, klonování kóženého fragmentu v expresních vektorech *E.coli* a jeho materiálně a časově náročné zpětné izolaci. Když v roce 1986 představil Dr. Karry Mulis techniku PCR, znamenalo to průlom v oblasti celé molekulární biologie (Bartlett & Stirling 2003). Polymerázová řetězová reakce využívá tradiční buněčný mechanismus replikace: DNA dependentní RNA polymeráza (primáza) v replikačním počátku nejprve vytvoří krátký RNA primer, jehož 3' OH konec slouží jako záchytný bod pro DNA dependentní DNA polymerázu - enzym neschopný katalyzovat polymeraci nukleotidů bez již přítomného 3' hydroxyly (Alberts et al. 2017). PCR je v podstatě cyklicky opakovaná replikace, omezená však pouze na cílové fragmenty (Mullis et al. 1986). Každý cyklus znamená zdvojení a počet amplikonů tak roste s druhou mocninou původního množství. Ve zkumavce je částečně simulováno buněčné prostředí (pH, koncentrace solí), které ošálí přidanou polymerázu a donutí ji „pracovat pro vědu“. Roztok obsahuje komponenty potřebné pro katalýzu jako  $Mg^{2+}$  ionty (kofaktor polymerázy), dNTP (směs čtyř deoxyribonukleotidů) a uměle připravené primery. Helikáza a další rozvolňovací enzymy nejsou přítomny - pro oddělení dvouvláken v každém replikačním cyklu používáme tepelnou denaturaci. Cyklus začíná zahřátím směsi na vysokou teplotu, obvykle kolem 93°C. Dochází k **denaturaci**. Následuje snížení teploty na cca 55-65°C, což je teplota ještě nedostatečná ke zpětné renaturaci ale již postačuje pro **annealing** - hybridizaci jednovlákn s krátkými primery. Poslední fáze cyklu, bližící se teplotně 72°C, je fáze prodlužovací (= **extending**). Polymeráza začíná připojovat nukleotidy od 3' konce primeru a pokračuje v prodlužování až ke konci vlákna nebo dokud nedojde k její spontánní disociaci. Amplifikace pouze cílových fragmentů je zajištěna prostřednictvím dvou typů primerů - F primer (forward) přisedající před počáteční sekvenci úseku na kódujícím (+) vlákně a R primer (reverse), přisedající za koncovou sekvenci úseku na nekódujícím (-) vlákně. Protože polymeráza syntetizuje nové vlákno ve směru 5' - 3', dochází už ve 3. cyklu k produkci prvních z obou stran ohraničených úseků (Mullis et al. 1986).

Délka trvání každé z těchto tří fází závisí na délce fragmentů a je vhodné ji experimentálně vyladit a přizpůsobit protokol (Wong & Medrano 2005).

V minulosti bylo střídání reakčních teplot dosahováno ručním namáčením zkumavek do o požadovaných teplotách. Provedení celé reakce najednoubránila denaturační teplota příliš vysoká pro zachování funkce enzymu a polymerázu tak bylo nutné přidávat po každém cyklu znovu (Mullis et al. 1986). Pouze někteří extrémofilové jako např. bakterie z horkých podmořských pramenů disponují enzymy, které jsou při takto vysokých teplotách schopné pracovat. Nápad využít tyto enzymy pro PCR byl realizován v roce 1988 (Saiki et al. 1988) izolací polymerázy z gramnegativní bakterie *Thermus aquaticus*, nyní všeobecně známé jako Taq polymeráza (Bartlett & Stirling 2003). Využití termostabilních polymeráz těchto organismů výrazně usnadnilo PCR techniku a umožnilo uzavřít zkumavky pod víko specializovaného přístroje **cykléru** (Bartlett & Stirling 2003). Zkumavky jsou zde vsazeny do bloku s dobrou tepelnou vodivostí, zahříváním a ochlazováním sérií Peltierových článků. V současné době disponují cykléry vyhříváním víkem, programovatelností a uživatelským rozhraním propojeným s počítačem.

Takto amplifikované úseky pak mohou být elektroforézou separovány v agarózovém gelu a vizualizovány pod UV světlem díky interakci s interkalačními barvivy (EdtBr, Gel Red, SYBR Green) a/nebo za využití Southern blottingu (Ali et al. 2017).

Amplifikace může proběhnout mnoha alternativními způsoby (Morisset et al. 2008), ale PCR zůstává stále v praxi nejpoužívanější metodou.

Místo blottingu je PCR produkt často dále analyzován např. kapilární elektroforézou s fluorescenčně značenými primery nebo je využíváno rychlých sekvenačních metod třetí a čtvrté generace (Bai & Xu 2014). Zajímavé je v tomto ohledu také využití všestranného nástroje CRISPR asociovaného s Cas 13a/C2c2 (Gootenberg et al. 2017).

### **3.5.2.1. Detekce mRNA**

Pro analýzu mRNA ve vzorku existuje řada metod, jejichž volba závisí na výzkumném záměru a technickém vybavení laboratoře. Patří zde zejména northern blotting, qRT-PCR (Wong & Medrano 2005), microarray (Bunney et al. 2003), RNase protection assay (Ma et al. 1996), a RNA sekvenování. Pro určení délky poly (A) konců je určena metoda PAT (Sallés et al. 1999).

Je-li účelem vyhodnotit velké množství genů v určité tkáni a sestavit kompletní expresní profil, je v dnešní době výhodné použít RNA-Seq, jako to uskutečnili např. Bai & Xu (2014) u jablka. V současné době je možné provádět i single-cell analýzy, které pomocí metod průtokové cytometrie, označování transkriptů „buněčnými adresami“ a NGS sekvenování umožňují zaznamenat expresi stovek genů v každé buňce zvlášť (Hashimshony et al. 2012). Tímto způsobem je stále objeveno množství nových buněčných typů a expresní profily stávajících jsou zpřesňovány, neboť již nejsou pouhým průměrem homogenizované tkáně (Villani et al. 2017). Tato technologie však ještě není široce dostupná.

### **3.5.2.2 Northern blotting**

Při dostatku materiálu bylo dříve obvyklé provádět přenos z gelu na membránu a hybridizaci se značenou sondou i v případě RNA - tzv. Northern blotting. Název metody nemá spojitost s žádnou osobou ani světovou stranou k níž má být laborant otočen - vznikl jako pouhé odlišení od blottingu Southernova stejně jako proteinový Western blot (Nicholas et al. 2013). RNA je však značně nestabilní, čemuž je nutné přizpůsobit blotovací podmínky. Separční gel je ošetřen formamidem, který působí na snížení potřebné teploty pro uchycení na membránu a denaturačním činidlem kvůli prevenci tvorby sekundárních struktur (Ali et al. 2017).

Ve výsledných snímcích je pak zkoumána přítomnost cílové mRNA na základě existence odpovídajícího proužku velikostně srovnatelného s pozitivní kontrolou. V případě zjišťování míry exprese jsou snímky podrobeny tzv. semikvantitativní analýze, kdy se množství cílové mRNA odhaduje ze síly příslušných proužků. Nestačí-li prosté porovnání okem, odhad a porovnání provede počítačový program (Bartlett & Stirling 2003).

### **3.5.2.3 Reverzní transkripce**

RNA nelze použít pro klasickou PCR amplifikaci z důvodu neschopnosti polymeráz kopírovat dle RNA templátu. Řešení přišlo v podobě využití reverzních transkriptáz. Tyto enzymy, přítomné u retrovirů ale také u eukaryot v podobě telomeráz, tvoří výjimku z centrálního



dogmatu a dokáží katalyzovat transkripci směrem RNA → DNA (Alberts et al. 2017). V současné době jsou nejpoužívanější enzymy izolované z MMLV (Virus moloneyské myši leukemie) nebo AMV (virus ptačí myeloblastózy) (Heller et al. 2019).

Reakce neslouží k cyklické produkci kopií, ale pouze k přepisu původních RNA vláken do tzv. cDNA (complementary DNA), která již může být dále využita pro konvenční PCR. Jedná se tedy pouze o sled několika neopakujících se teplotních změn způsobujících postupně denaturaci, přisednutí primerů, reverzní transkripci a teplotní deaktivaci enzymu (Bustin et al. 2003). **Úvodní denaturace** (65 – 70 °C) není vždy nutná - je důležitá zejména pracujeme-li s dlouhými či na CG úseky bohatými molekulami, které jsou náchylné k tvorbě sekundárních struktur. Teplotní maximum pro zachování aktivity reverzní transkriptázy se v závislosti na typu pohybuje mezi 37 - 50 °C a je tak hluboko pod denaturační teplotou, takže mix s enzymem musí být přidán až po tomto kroku, což obnáší zvýšené riziko kontaminace (Bustin et al. 2009).

Volba primerů se odvíjí od záměru který s RNA máme. Pro tvorbu cDNA z celkové RNA používáme **náhodné hexamery**. Jedná se o oligonukleotidy složené z náhodné kombinace šesti bází, které hybridizují s komplementárními sekvencemi roztroušenými v různých místech. Nedošlo-li k izolaci čisté mRNA už chromatografií či jinými metodami, je možné tuto část získat pomocí **oligo d(T) primerů**. Jedná se o RNA primer dlouhý okoloosmnácti deoxythymidinů (5'-dT<sub>18</sub>-3') který může hybridizovat s poly (A) koncem každé eukaryotické mRNA. Metoda je vhodná pro stanovení expresního profilu zkoumaných tkání a k tvorbě cDNA knihoven. Je však velmi náročná na kvalitu a integritu mRNA, protože v případě fragmentovaných vláken hrozí ztráta potřebného poly-A konce. Z tohoto důvodu je někdy volena kombinace s náhodnými hexamery (Bustin et al. 2003).

**Genově specifické primery** jsou sekvence cílené na konkrétní genový transkript. V případě, že pro zájmový gen ještě nejsou komerčně dostupné, je možné využít služby specializovaných firem, zhotovujících primery „na přání“. Pro tyto účely se dá využít i PCR reverzní primer (komplementární sekvence pro forward primer se na RNA transkriptu daného genu nenachází, jelikož RNA zde představuje „+“ vlákno) (Stahlberg et al. 2004).

### 3.5.2.4 RT-PCR

Rozlišujeme RT-PCR **dvoukrokovou** (two-step) a **jednokrokovou** (one-step). Při two-step RT-PCR jsou od sebe reverzní transkripce a PCR amplifikace navzájem odděleny. cDNA vzešlá z RT může být následně rozdělena do PCR jamek nebo být skladována při -20 °C pro následné použití. Výhoda tohoto postupu spočívá především v možnosti použít výslednou cDNA jako „zásobní roztok“ pro více oddělených PCR experimentů, což šetří RT reagentie (Stahlberg et al. 2004). Nevýhodou je pak delší trvání této procedury a vyšší riziko kontaminace (Bustin et al. 2002).

One-step PCR umožňuje průběh obou reakcí v jedné zkumavce bez nutnosti další manipulace se vzorkem mezi RT a PCR. To velmi šetří čas a díky pipetování obou typů komponent současně již na počátku je hrozba kontaminace nižší. Termocykler mění teploty

nejprve dle protokolu pro RT a poté automaticky přechází na program pro PCR(Heller et al. 2019).

Tento postup však s sebou nese riziko v podobě nežádoucí interakce mezi polymerázou a reverzní transkriptázou(Sellner et al. 1992). Suslov a Steindler (2005) se ve své práci zabývali různými aktivitami reverzních transkriptáz a navrhují metodu lepší purifikace RNA, který tento problém redukuje na únosnou míru.

Nové možnosti skýtá proteinové inženýrství. Zajímavým řešením je např. tvorba hybridního enzymu s teplotně vyhovující aktivitou jak reverzní transkriptázy, tak polymerázy, obsahující také doménu potřebnou pro 3 - 5 exonukleázovou aktivitu, důležitou pro qPCR (Heller et al. 2019).

Jistým vylepšením RT-PCR je metoda kvantitativní PCR(Wong & Medrano 2005), o které bude podrobněji pojednáno v následující kapitole. Iniciály „RT“, shodné pro pojmy „real-time“ a „reverse transcription“ zavádají příčinu mnohým nedorozuměním, kdy je zkratka RT-PCR chaoticky používána k označování dvou různých metod. Konsenzus praví, že „RT“ značí reverzní transkripci. RT-PCR je každá PCR, které předcházela tento krok a je-li kopírovaná cDNA zároveň také kvantifikována v reálném čase, přidáváme ke zkratce písmeno „q“ a označujeme tuto reakci jako RT-qPCR. Zároveň ne každé qPCR nutně předchází reverzní transkripci - PCR v reálném čase je možné využít i pro účely běžné DNA diagnostiky (Butler et al. 2012).

### 3.5.3 Kvantitativní PCR

Metoda kvantitativní PCR bývá někdy také označována jako real-time PCR čili PCR v reálném čase. Fluorescence značených sond navázaných na DNA je zde detekována senzorem umístěným přímo v moderním termocykleru (light cycler) a to na začátku každého cyklu, což umožňuje sledovat postupně přibývajícím produktem a sestavit amplifikační křivku(Wong & Medrano 2005).

#### 3.5.3.1 Reportérová barviva a detekce signálu

Jako zdroj fluorescence pro detekci kopírovaných molekul slouží buď nespecifická **interkalační barviva** (SYBR Green) nebo sekvenčně specifické TaqMan sondy. První zmíněný postup je založen na schopnosti tohoto cyaninového barviva vázat se do malého žlábků dvouřetězcové DNA. Komplex DNA/SYBR Green absorbuje nejlépe modré světlo o  $\lambda=497$  a  $\lambda_{em}$  jeho emisního spektra je 520 nm (Zipper et al. 2004). Nízká afinita barviva k jednořetězcové DNA je důvodem jeho využití jako reportérového barviva při qPCR(Cao & Shockey 2012).

**TaqMan sondy** jsou krátké oligonukleotidy opatřené na 5'konci molekulou fluoroforu a na 3'konci tzv. zhášecem(quencher). Metoda využívá kvantově mechanického jevu FRET (Fluorescence resonance energy transfer). Dokud je sonda vcelku, drží tyto molekuly blízko sebe ve vzdálenosti menší než  $<100 \text{ \AA}$ . V přítomnosti záření odpovídající excitační energii fluoroforu k fluorescenci nedochází z důvodu tranferu přebytečné energie na molekulu zhášecí. Ten ji

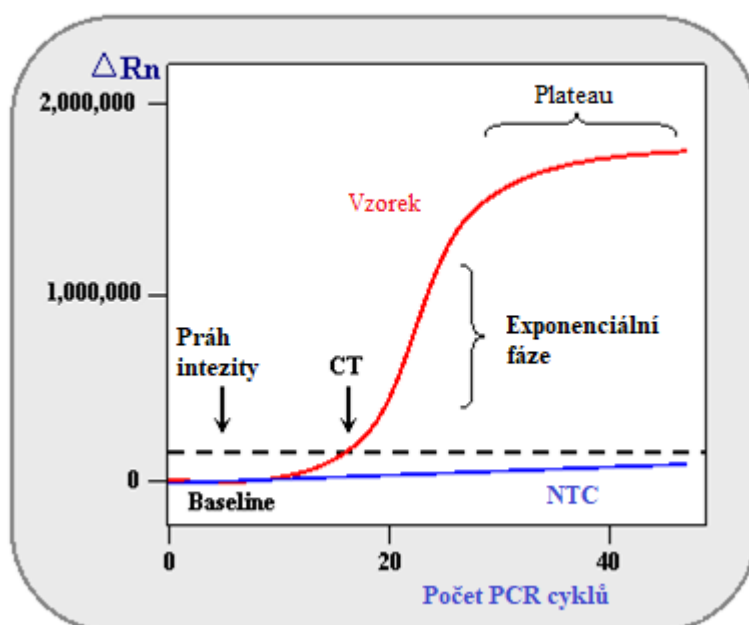
posléze vyzáří v infračerveném spektru, což detektor nevnímá jako rušivé pozadí (De Angelis 1999).

Tyto sondy přisedají na komplementární sekvenci denaturovaného jednovlákná, nikoli však na okraj jako primery, ale do prostoru mezi ně. Taq polymeráza tak při syntéze nového vlákna zákonitě narazí na tuto překážku, ale díky své 5'-3' exonukleázové aktivitě začne sondu hydrolyzovat (Alberts et al. 2017). Nukleotid nesoucí fluorofor je uvolněn do roztoku, dostává se daleko od zhášedce a po absorpci záření z qPCR lampy vyše světelný signál zpět k detektoru, který posléze převede proud fotonů na signál elektrický. Tento postup je opakován v každém cyklu a vizualizován v podobě amplifikační křivky. Oblíbenými kombinacemi barviv jsou FAM nebo VIC pro fluorofor a TAMRA pro zhášedce (Butler et al. 2012).

Detektor v přístroji má většinou několik kanálů, na kterých může světlo vnímat a zdroj několik filtrů - díky tomu je možné použít současně několik typů sond označených různými fluorofory a analyzovat tak větší množství genů současně v jedné zkumavce, kde každému genu odpovídá jedna amplifikační křivka (multiplex reakce). Rozlišovací schopnosti přístroje mají však své limity a nejsou-li od sebe emisní spektra jednotlivých barviv dostatečně vzdálená, hrozí splnutí signálu.

Přístroje bývají většinou vybaveny lampou či jiným stacionárním zdrojem záření, které osvětluje jamky v destičce nerovnoměrně a odlišné vzdálenosti od detektoru vedou k rozdílům v absolutní fluorescenci mezi jamkami se stejnou koncentrací fluoroforu (Jordan & Kurz 2010). Za účelem normalizace těchto výkyvů je do jamek často přidáváno vnitřní referenční barvivo vykazující stabilní emisi nezávislou na průběhu PCR reakce (Wong & Medrano 2005).

### 3.5.3.2 Amplifikační křivka



Obrázek 5. Amplifikační křivka pro qRT-PCR (upraveno dle: <https://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>)

Obrázek 5 zobrazuje typickou amplifikační křivku real-time PCR. Intenzita fluorescence vyjádřená bezrozměrnou veličinou  $\Delta Rn$ , odrážející množství kopií DNA, je zde vynášena na osu y. Na ose x postupuje čas v podobě počtu proběhlých cyklů (C)(Bonab et al. 2015).

Protože v každém cyklu dochází k replikačnímu zdvojení vláken, roste jejich počet s druhou mocninou a křivka je exponenciální. Neroste však donekonečna - při určité koncentraci produktů růst zpomaluje a dostává se nejprve do lineární a posléze do plateau fáze, kdy se amplifikace téměř zastaví. Kinetika reakce, zejména příčina nástupu plateau, je stále předmětem bádání. Jako důvody jsou uváděny vyčerpání nebo termické štěpení primerů nebo nukleotidů, tepelná inaktivace DNA polymerázy a akumulace produktu, což vede k soutěži mezi hybridizací primerů a hybridizací produktu, jakož i blokování DNA polymerázy pomocí dvouřetězcových amplikonů, což shrnuji v úvodu svého článku Janson a Hedman (2019). Tato dvojice v rozsáhlém experimentu provedla analýzu všech těchto příčin a z výsledků vyplývá, že problém tkví především ve vyčerpání zásoby primerů.

Jako **baseline** je označováno několik počátečních cyklů, kdy fluorescence sice s každým cyklem vzrůstá, ale nachází se pod prahem citlivosti detektoru a je přehlušována stále ještě mnohem silnějším pozadím (Bonab et al. 2015).

**Rn**, čili normalizovaný reportér, je poměr intenzity fluorescence reportérového barviva k referenčnímu barvivu.  **$\Delta Rn$**  je hodnota **Rn** očištěná od rozkolísané části v baseline.

**Threshold** neboli prahová hodnota, je volitelná hodnota míry fluorescence. Jedná se o nejnižší možný fluorescenční signál, který už můžeme považovat za odpovídající skutečnému stavu. Bod průniku amplifikační křivky tímto prahem označujeme jako **hodnotu Ct** (cycle of threshold), někdy je možné setkat se také se zkratkou Cq. Ct hodnota, udávající počet cyklů nutných pro dosažení určitého množství kopií, je nosným pilířem qPCR metody, na jehož základech stojí veškerá další produkce dat.

Čím nižší je počáteční koncentrace sledovaného transkriptu, tím více cyklů potřebuje k dosažení prahu a hodnota Ct tak bude vyšší než u vzorku, kde bylo transkriptu více (Bonab et al. 2015).

### 3.5.3.3 Absolutní a relativní kvantifikace

Ke kvantifikaci genové exprese za pomoci Ct hodnot můžeme přistupovat dvojným způsobem - absolutně nebo relativně. Je-li pro experiment nutné určit skutečné počáteční množství transkriptu (**absolutní kvantifikace**), musí vyhodnocení předcházet tvorba ředící řady, stejně jako např. při spektrofotometrii. Pouze z prahové intenzity fluorescence není již jaksí z logiky věci možné určit původní počet molekul bez jejího umístění na škálu Ct hodnot vzorků o předem známých koncentracích. Častější a pro většinu účelů vhodnější, je **relativní kvantifikace** (Schmittgen & Livak 2008). Je-li předmětem zájmu porovnání míry exprese genu vůči jiným několika genům v jednom organismu/tkáni nebo např. porovnávání exprese jednoho genu během různých experimentálních podmínek, pak není nutné znát přesnou koncentraci a k analýze stačí Ct hodnoty. Metoda využívá faktu, že pokud budeme v PCR množít dva či více genů, jejich počáteční vzájemný poměr zůstane zachován a odrazí se v Ct hodnotách. Hodnotu

sledovaného genu tak můžeme vztáhnout ke genu referenčnímu, určit o kolik cyklů se liší ( $\Delta Ct$ ) a následně porovnávat tyto rozdíly různými metodami mezi jednotlivými vzorky, čímž dospějeme k hodnotě relativní exprese udávající „o kolik“ bylo v původním vzorku daného transkriptu více či méně než zvoleného kalibrátoru (Schmittgen & Livak 2008).

Klíčovou vlastností referenčního genu, bez níž by porovnání vzorků nebylo možné, je jeho stabilní exprese nezávisle na experimentálních podmínkách. Volíme proto pouze geny, u kterých nepředpokládáme výchyly mezi jednotlivými vzorky. Tyto požadavky splňují zejména tzv. **house-keepingové geny**, jejichž konstantní hladina je nezbytná pro bazální metabolické a výstavbové procesy v každé buňce, jako např.  $\beta$ -aktin,  $\beta$ -tubulin, GAPDH (glyceraldehydfosfát dehydrogenáza), UBC (ubiquitin C) nebo 18S ribozomální RNA (Gutierrez al. 2008).

I tyto geny však vykazují jistou transkripční variabilitu a žádný z nich se nedá označit jako 100% spolehlivý a univerzálně použitelný (Zhu et al. 2019). Je proto vhodné neprve validovat stabilitu exprese zamýšlených genů, což se dělá standardně pomocí výše zmíněné qPCR (Gutierrez al. 2008). S určením vhodnosti může pomoci software Best keeper vyvinutý týmem Pfaffl et al. (2004).

Standardně probíhá validace referenčních genů pomocí několika nezávislých statistických softwarů, jejichž výsledky jsou následně zpracovány např. programem Ref Finder (Zhu et al. 2019).

#### 3.5.3.4 Klasický qPCR experiment

Veškerou práci s RNA je nutné provádět v rukavicích ve sterilním prostředí laminárního boxu, vysvíceném UV zářením. Pracovní plochy by měly být ošetřeny inhibitory RNáz. Nejprve je do příslušné mikrozkušavky dle protokolu připraven Master mix postupným přidáváním předepsaného množství F a R primerů, směsi deoxyribonukleotidů, enzymu, sond či barviv a chloridu hořečnatého, který slouží jako kofaktor polymerázy (Alberts et al. 2017). V případě multiplex reakce je připravován jeden Master mix, jinak vždy pro každý gen zvlášť. Při one-step PCR jsou zároveň připravovány i komponenty pro RT. Řada firem dnes nabízí již předem připravené premixy, které v sobě skrývají i mnohé jiné netušené, reakci vylepšující komponenty. Připravená směs je dále rozdělena do označených stripů nebo PCR destiček, kam následně přijde čerstvě vyizolovaná RNA (one-step) nebo dostatečně rozmrazená cDNA (two-step) (Bonab et al. 2015).

Standardem je použití minimálně dvou biologických a tří technických replikátů (Bustin et al. 2009). Biologické replikáty jsou vzorky stejného typu, podstupující stejné experimentální podmínky, ale pocházející z různých jedinců. Technický replikát vzniká rozdělením každého biologického replikátu do několika jamek a jeho smyslem je eliminace chyb při pipetování vzorku a náhodným artefaktům během qPCR.

Vnitřní kontrola se používá pro ověření správnosti izolace – zjišťuje se je-li ve vzorku RNA, taková která je vždy přítomná, obvykle používaná pro kontrolu v laboratorní diagnostice kde není prostor pro replikáty a čas pro kontrolu v gelu (např. při průkazu koronavirové infekce) - pro účely relativní kvantifikace tuto roli plní referenční gen (Wong & Medrano 2005).

Dalšími komponenty jsou:

NTC - kontrola bez templátu obsahující pouze qPCR reagentie a vodu (Hellemans et al. 2011).

PCR voda - čistá voda

Existuje mnoho typů PCR destiček s různým počtem jamek a různou měrou průhlednosti, které je třeba zohlednit při nastavování protokolu v termocykleru (Bonab et al. 2015). Destička zakrytá sterilním víkem je dále odstředěna na centrifuze a umístěna do termocykleru nastaveného na příslušný program.

Specifitu amplifikovaných produktů ověřujeme **analýzou křivky tání** (melting curve analysis) nebo analýzou na agarózovém gelu (Wong & Medrano 2005).

### 3.5.3.5. Stanovení relativní exprese

Na počátku každého zpracování qPCR dat vstupují vždy Ct hodnoty a výstupem je relativní exprese (R), přičemž cesty k jejímu dosažení mohou být různé. Nejčastější metodou je  $\Delta\Delta Ct$  dle Livak & Schmittgen (2001), znázorněná tímto vzorcem.

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Existuje více přístupů jak nakládat s daty a počítat  $\Delta\Delta Ct$ . Ct hodnoty technických replikátů sledovaného i referenčního mohou být zprůměrovány (aritmetickým či geometrickým průměrem) a tyto průměry následně použity pro získání  $\Delta Ct$ . Z každého biologického replikátu tak dostaneme pouze jednu  $\Delta Ct$  i jednu  $\Delta\Delta Ct$  hodnotu (Schmittgen & Livak 2008).

Jiný přístup tkví v použití Ct hodnot každého technického replikátu zvlášť u obou genů, vypočítat  $\Delta Ct$  pro každou jejich kombinaci a tímto způsobem pokračovat i při určování  $\Delta\Delta Ct$ . Předpokládáme dva technické replikáty tak dají vzniknout sadě  $2 \times 2$   $\Delta Ct$  hodnot. Jedna z těchto sad, určená jako kalibrátor, bude sloužit k tvorbě  $\Delta\Delta Ct$  hodnoty pro všechny ostatní sady a každý biologický replikát tak bude místo jedné průměrné zahrnovat  $4 \times 4$   $\Delta\Delta Ct$  hodnot (Hellemans et al. 2011).

Nevýhoda této metody spočívá v jejím předpokladu, že **účinnost** (efficiency, E) s jakou jsou porovnávány geny amplifikovány, je stejná nebo alespoň velmi podobná (Livak & Schmittgen 2001). V teoretické rovině je uvažována 100% účinnost: v každém cyklu jsou replikována všechna cílová DNA vlákna, takže dochází k jejich cyklickému zdvojení a koncentrace v  $n$ -tém cyklu je rovna počtu počátečních molekul krát 2. V praxi se však mnohdy setkáváme s účinností nižší, způsobenou např. špatně designovanými primery, rozdílnou koncentrací F a R primeru nebo opožděnou hybridizací jednoho z nich (rozdíl v  $T_m$  větší než  $1^\circ C$ ), ovšem některé problémy nelze jednoduše odstranit a je nutné s pozmeněnou účinností dopředu počítat (Pfaffl et al. 2001).

Zjistit účinnost (E) pro daný gen lze pomocí **analýzy standardní křivky**. Tu vytvoříme, proložíme-li přímkou body grafu spojující Ct hodnoty získané z ředící řady a logaritmičtě transformované koncentrace těchto vzorků. Logaritmičké měřítko se používá z důvodu velkého rozsahu hodnot. Ředění je obvykle desítkové, kdy při 100% účinnosti vychází mezi každým naředěným vzorkem vzdálenost 3,32 cyklu ( $\log_{10} = 3,32$ ;  $y = -3.32x + 20$ ). Určíme-li sklon (parametr „slope“) křivky, vypočítáme účinnost dle vzorce  $E = (10^{(-1/\text{slope})})$ , odkud odečtením 1 a

vynásobením 100 získáme procenta (Pagliarani et al. 2013). Při E=2 bylo dosaženo 100% účinnosti.

Vyjde-li účinnost vyšší než 100%, spíše než o chybu měření se většinou jedná o důsledek inhibice polymerázy různými těžce odstranitelnými nečistotami (Bustin et al. 2002). Ty působí jako inhibitory pouze ve vyšších koncentracích a zvyšují tak Ct hodnoty nejméně naředěným vzorkům, zatímco na konci ředící řady se Ct již blíží normálu a nerovnoměrné rozdíly mezi jednotlivými Ct ředící řady tak způsobí abnormálně rovné standardní křivky.

Pro použití metody  $\Delta\Delta Ct$  je ještě akceptovatelné rozmezí 90 - 110 % (Bonab et al. 2015). Pro geny, které se do tohoto rozmezí nevejdou, je možné použít Pfafflovu metodu (Pfaffl et al. 2001). Jedná se o stejný vzorec, který se liší pouze dosazením stanovené účinnosti (E) místo čísla 2:

$$\text{Gene expression ratio} = \frac{(E_{GOI})^{\Delta Ct_{GOI}}}{(E_{HKG})^{\Delta Ct_{HKG}}}$$

Výpočet relativní genové exprese za použití více referenčních genů tímto vzorcem pomocí geometrického průměru udávají Hellemans et al. (2007).

$$\text{Gene expression ratio} = \frac{(E_{GOI})^{\Delta Ct_{GOI}}}{\text{GeoMean} \left[ (E_{HKG})^{\Delta Ct_{HKG}} \right]}$$

### 3.3.5.6. Statistické vyhodnocení dat

Cílem statistické analýzy je ověřit, zda naměřené rozdíly nejsou pouhým náhodným výkyvem do extrémních hodnot v rámci platnosti nulové hypotézy. Určitou pravděpodobnost tohoto jevu není možné vyloučit nikdy a proto jediným možným řešením je stanovit maximální míru této pravděpodobnosti, při které je ještě příklon k alternativní hypotéze možný. Konsenzus na maximum této hodnoty je = 0,05, což značí 5% pravděpodobnost (Hellemans et al. 2011). Dle požadavků oboru, množství testovaných hypotéz či záměru zvýšit průkaznost experimentu mohou být kritéria zvolena přísněji. Při analýze výsledků relativní kvantifikace qPCR mohou být vstupními daty  $\Delta\Delta Ct$  hodnoty a jejich směrodatné odchylky mezi různými vzorky, které jsou následně použity pro samotný test zmíněné pravděpodobnosti (Goni et al. 2009). Hellemans et al. (2011) uvádí, že běžnou praxí v biostatistice je převést data rovnou do logaritmického měřítka ( $2^{\Delta\Delta Ct}$ ). Testů je mnoho druhů z kategorií parametrických a neparametrických a volba vhodného testu se odvíjí od prokázané homogenity rozptylů, rozsahu datového souboru, vzájemného vztahu vzorků a požadavků experimentu na preciznost. Mezi široce používané testy patří párový nebo nepárový t-test, ANOVA, Mann-Whitneyův test, Wilcoxonův test a test Kruskal-Wallisův (Hellemans et al. 2011). V současné době se k tomuto účelu používají statistické programy, které disponují širokou škálou testovacích nástrojů, např. Dell Statistica,

SSPS nebo složitější software vyvíjený speciálně pro danou oblast, jako např. GeNorm (Zhu et al. 2019).

Velmi užitečným nástrojem pro zdárný návrh a průběh qPCR experimentu je MIQE checklist (<http://www.rdml.org/miqe.php>). Ten je součástí návodné publikace MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments), která shrnuje minimum požadavků, které musí splňovat každý experiment, aby byl co nejvíce relevantní, opakovatelný a mohl být správně interpretován (Bustin et al. 2009).

## 4. Materiál a metody

Ovoce bylo sklizeno v experimentálním sadu ve VÚŠO (Holovousy, ČR) v čase fyziologické zralosti. Pro izolaci RNA byly použity čtyři odrůdy, z toho dvě běžné ('Golden Delicious', 'Jonagold') a dvě nově vyšlechtěné a nedávno registrované české kultivary ('Flordika', 'Frosta'). Plody byly získány a zpracovány ihned po sklizni na podzim roku 2018. Celkem bylo odebráno 6 plodů z každé odrůdy a po třech použity pro tvorbu dvou biologických replikátů, nazvaných A a B.

Byly odebrány vzorky slupky rovnoměrným seškrábnutím po celém povrchu plodu, které byly ihned zpracovány drcením v třecí misce za přilévání tekutého dusíku. Celková RNA každého vzorku byla izolována z počátečních 100 mg slupky za použití kitu Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma) pomocí spinových kolonek dle příslušného protokolu. Pro zničení DNA byl izolát ošetřen DNázou, konkrétně On-Column DNase 1 Digest Set od firmy Sigma. Koncentrace purifikované RNA byla měřena spektrofotometricky přístrojem Nano Photometer (Implen) při 260 nm.

### 4.1 Příprava cDNA

cDNA byla syntetizována pomocí Transcription First Strand cDNA Synthesis kitu (Roche) z 0,25 ng RNA, dle instrukcí výrobce. Samotné vzorky byly nejprve inkubovány 10 minut při 60°C pro důslednou denaturaci sekundárních struktur. Po rychlém ochlazení byly přidány RT reagentie v množství udávaném protokolem a společně s oligo(DT)18 primery o koncentraci 2,5 μM byla směs inkubována 60 minut po dobu 50°C. K následné inaktivaci RNázy byly vzorky ponechány 5 minut při teplotě 85°C. Výsledná cDNA byla skladována při -80°C.

### 4.2 qPCR

Kvantitativní PCR probíhala dle Pagliarini et al.(2013) za použití kitu FastStart Essential DNA Green Master (Roche). Amplifikační mix o celkovém objemu 10 μl pro každou jamku na stripu sestával z 4 μl roztoku cDNA o koncentraci 0,25 ng/ μl, 0,5 μl příslušného F-primeru, 0,5 μl roztoku R-primeru a 5 μl Mastermixu obsahujícího směs Taq polymerázy, dNTP a barviva SYBR Green. Byly amplifikovány dva Mal d 1 geny (1.01 a 1.02 z podrodiny 1) a tři house-keepingové geny ve 2 biologických replikátech (A a B) odrůd 'Florina', 'Frosta', 'Golden Delicious' a 'Gala'. Z důvodu použití interkalačního barviva bylo nutné amplifikovat každý gen zvlášť v oddělené jamce. Každá reakce byla provedena ve tří technických replikátech. Primery na



izoalergeny Mal d 1.01 a Mal d 1.02 byly navrženy dle Pagliarani et al. (2013), primery pro ACT, UBC a GAPDH. Jejich sekvence jsou uvedeny v Tabulce 1.

**Tabulka 1. Primerové páry použité při qRT-PCR k amplifikaci vybraných úseků Mal d 1 izoform (Pagliarani et al. 2013) a referenčních genů (dle Zhu et al. 2018).**

Gen		Název primeru	5'-3' sekvence primeru
<b>Mal d 1.01</b>	F	qMd1.01/02F	GATTGAAGGAGATGCTTTGACA
	R	qMd1.01R	GTAATGACTGATGCTCTTGATGG
<b>Mal d 1.02</b>	F	qMd1.01/02F	GATTGAAGGAGATGCTTTGACA
	R	qMd1.02R	TTGGTGTGGTAGTGGCTGATA
<b>ACT7</b>	F		
	R		
<b>UBC (polyubiquitin-C)</b>	F		
	R		
<b>GAPDH</b>	F		
	R		

qPCR byla provedena pomocí LightCycler Nano Instrument (Roche), dle následujícího protokolu: prvotní denaturační krok na 95 °C na 10 minut, druhý krok sestávající ze 40 cyklů denaturace při 95°C na 20sekund, annealing při 61°C na 20 sekund a extending 72 °C na 20 sekund. Výsledné Ct hodnoty byly následně použity pro výpočet relativní exprese a statistickou analýzu.

#### 4.3 Stanovení relativní exprese

Z qPCR bylo získáno celkem 120 Ct hodnot. Ct hodnoty každých tří technických replikátů izoform Mal d 1.01 a Mal d 1.02 byly normalizovány k jednotlivým referenčním genům za použití kombinace jejich třech technických replikátů dle postupu Pagliarani et al. (2013) popsaného v kapitole 3.4.1. Celkem tak bylo získáno 144  $\Delta$ Ct hodnot: 3×3 z každého biologického replikátu 2×9 z každé izoformy 2×18 pro každou odrůdu a 4×36 pro každý referenční gen (ACT7, UBC, GAPDH).

Zunová (2017) prokázala, že amplifikační účinnost (efficiency) obou izoform nevykazuje významné rozdíly a je tak možné použít metodu  $\Delta\Delta$ Ct. Jako kalibrátor byl použit průměr  $\Delta$ Ct hodnot 3 technických replikátů odrůdy 'Golden Delicious'. Výsledné hodnoty pro každé tři technické replikáty byly zprůměrovány a dosazeny do vzorce pro výpočet relativní exprese  $R = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  dle Livak a Schmittgen (2001). Výsledné hodnoty byly zpracovány do

Tabulek 2 - 4 jako procentické vyjádření ( $\times 100$ ) míry exprese oproti kalibrátoru. Výpočty byly provedeny pomocí programu Microsoft Excel.

#### 4.4 Statistická analýza

Vstupními daty pro statistickou analýzu byly hodnoty  $\Delta\Delta Ct$  (referenční gen – sledovaný gen) - (referenční gen - kalibrátor). Byly vyhodnoceny rozdíly těchto hodnot mezi biologickým replikátem A a B.

Homogenita rozptylů diferencí mezi biologickými replikáty u jednotlivých referenčních genů byla hodnocena pomocí Levenova testu. Zjištěná nehomogenita rozptylů byla důvodem pro použití neparametrického testu umožňujícího porovnávat více nezávislých vzorků - Kruskal-Wallisova ANOVA a mediánový test. Následně bylo provedeno vícenásobné porovnání průměrného pořadí pro všechny skupiny. Výsledky byly vyhodnoceny rovněž pomocí krabicového grafu. Veškeré analýzy byly provedeny pomocí programu Dell Statistica v.13 (Dell Inc. 2015).

## 5. Výsledky

### 5.1 Relativní exprese

Tabulky 2 – 4 ukazují míru relativní exprese (R). Nejmenší rozdíly mezi biologickými replikáty napříč všemi odrůdami i izoformami byly zaznamenány u ACT7, následovaný UBC a GAPDH. Izoforma Mal d 1.02 vykazuje vyšší míru exprese než Mal d 1.01. Jako nejvíce alergenní odrůda se jeví 'Jonagold', zatímco nejnižších hodnot dosahuje odrůda 'Florina'.

**Tabulka 2. Tabulkové srovnání hodnot relativní exprese (R) genů Mal d 1.01 a 1.02 mezi dvěma biologickými replikáty u čtyř odrůd za použití normalizace k ACT7. Výsledky jsou znázorněny jako procentuální podíl míry relativní exprese oproti zvolenému kalibrátoru.**

<b>Referenční gen: ACT7</b>			
<b>Odrůda</b>	<b>Biologický replikát</b>	<b>Míra relativní exprese (R) genu Mal d 1.01 (v %)</b>	<b>Míra relativní exprese (R) genu Mal d 1.02 (v %)</b>
'Golden delicious'	A	100	147,82
'Golden delicious'	B	100,23	149,11
'Jonagold'	A	151,78	207,18
'Jonagold'	B	152,39	205,33
'Frosta'	A	73,12	119,78
'Frosta'	B	70,21	122,09

'Flordika'	A	46,31	74,23
'Flordika'	B	47,98	72,08

Tabulka 3. Tabulkové srovnání hodnot relativní exprese (R) genů Mal d 1.01 a 1.02 mezi dvěma biologickými replikáty u čtyř odrůd za použití normalizace k UBC.

<b>Referenční gen: UBC</b>			
Odrůda	Biologický replikát	Míra relativní exprese (R) genu Mal d 1.01	Míra relativní exprese (R) genu Mal d 1.02
'Golden delicious'	A	100	153,26
'Golden delicious'	B	107,46	148,11
'Jonagold'	A	142,57	211,23
'Jonagold'	B	148,08	208,66
'Frosta'	A	68,47	108,57
'Frosta'	B	73,85	114,86
'Flordika'	A	51,44	76,58
'Flordika'	B	48,34	74,28

Tabulka 4. Tabulkové srovnání hodnot relativní exprese (R) genů Mal d 1.01 a 1.02 mezi dvěma biologickými replikáty u čtyř odrůd za použití normalizace ke GAPDH.

<b>Referenční gen: GAPDH</b>			
Odrůda	Biologický replikát	Míra relativní exprese (R) genu Mal d 1.01	Míra relativní exprese (R) genu Mal d 1.02
'Golden delicious'	A	100	135,74
'Golden delicious'	B	86,12	151,89
'Jonagold'	A	141,68	201,45

'Jonagold'	B	161,14	217,35
'Frosta'	A	77,15	122,05
'Frosta'	B	68,52	102,58
'Flordika'	A	53,51	81,16
'Flordika'	B	42,89	72,02

## 5.2 Statistická analýza

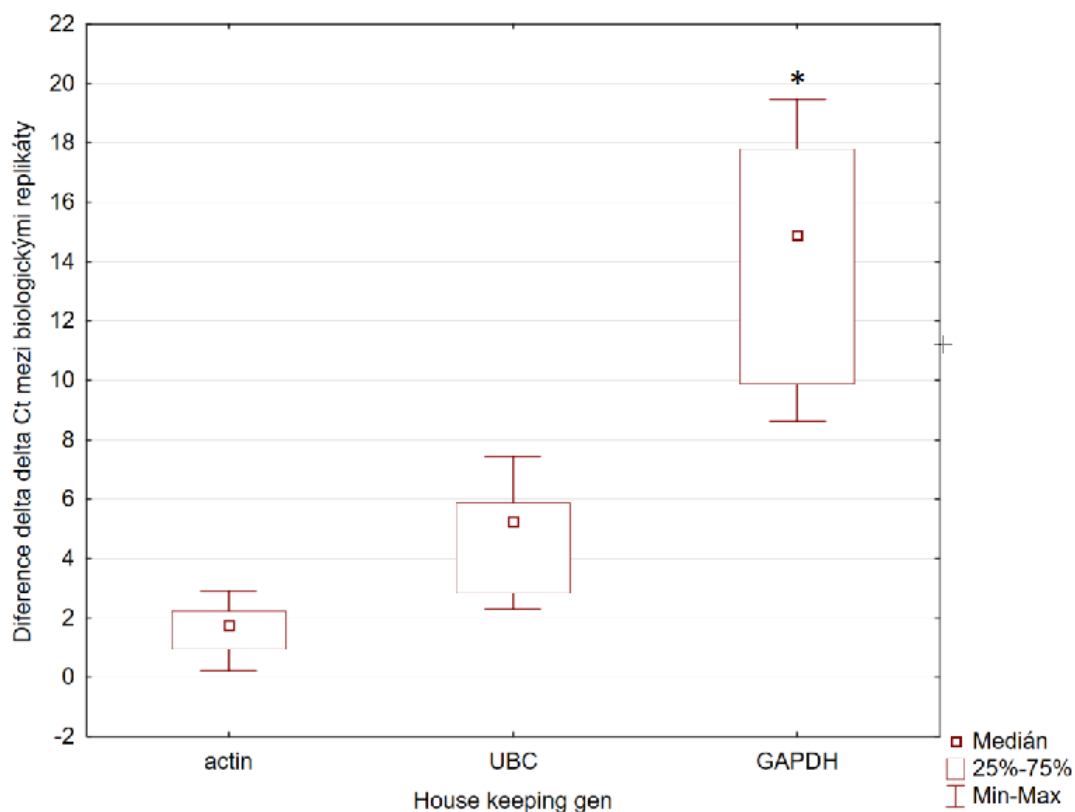
Jelikož Levenův test prokázal nehomogenitu rozptylů ( $p = 0,000\ 693$ ), nebylo možné provést další statistickou analýzu na bázi analýzy rozptylů a z tohoto důvodu byl zvolen neparametrický Kruskal-Wallisův test. Na hladině  $\alpha = < 0,0001$  byly prokázány statisticky významné rozdíly mezi biologickými replikáty při porovnání genů ACT a GAPDH, jak je patrné z Tabulky 5.

**Tabulka 5. Výsledky vícenásobného porovnání p-hodnot na základě Kruskal - Wallisova testu ( $H = 19,565$ ;  $p = 0,0001$ ). Červené hodnoty spadají do kategorie  $p < 0,0001$  indikující, že odchylky mezi biologickými replikáty těchto skupin jsou statisticky významné.**

**Hodnota R je součet všech pořadových čísel v rámci skupiny jednoho genu („ranks“), přiřazených každé hodnotě na základě pořadí diferencí všech tří skupin.**

Referenční gen	ACT (R = 4,875)	UBC (R = 12,125)	GAPDH (R = 20,500)
ACT		0,120 915	<b>0,000 030</b>
UBC	0,120 915		0,053 537
GAPDH	<b>0,000 030</b>	0,053 537	

Výsledky Kruskal Wallisovy ANOVY zobrazuje krabicový Graf 1.



**Graf 1. Krabicový graf ukazující rozdílně položené mediány diferencí  $\Delta\Delta C_t$  hodnot získaných normalizací ke třem různým referenčním genům. Obdélník zdola a shora ohraničuje oblast, ve které se nachází 25–75 % těchto hodnot. Délka chybových úseček pak vypovídá o celkové variabilitě naměřených hodnot.**

Diference  $\Delta\Delta C_t$  hodnot mezi dvojicemi biologických replikátů ukazují Tabulka 7.

**Tabulka 7. Absolutní hodnoty diferencí mezi biologickými replikáty A a B**

Referenční gen	Izoforma	Odrůda	Diference mezi A a B (absolutní hodnoty)
actin	Mald 1.01	'Golden Delicious'	0,230
actin	Mald 1.01	'Flordika'	1,670
actin	Mald 1.01	'Jonagold'	0,610
actin	Mald 1.01	'Frosta'	2,910
actin	Mald 1.02	'Golden Delicious'	1,290
actin	Mald 1.02	'Flordika'	2,150
actin	Mald 1.02	'Jonagold'	1,850

<b>actin</b>	Mald 1.02	'Frosta'	2,310
<b>UBC</b>	Mald 1.01	'Golden Delicious'	7,460
<b>UBC</b>	Mald 1.01	'Flordika'	3,100
<b>UBC</b>	Mald 1.01	'Jonagold'	5,510
<b>UBC</b>	Mald 1.01	'Frosta'	5,380
<b>UBC</b>	Mald 1.02	'Golden Delicious'	5,150
<b>UBC</b>	Mald 1.02	'Flordika'	2,300
<b>UBC</b>	Mald 1.02	'Jonagold'	2,570
<b>UBC</b>	Mald 1.02	'Frosta'	6,290
<b>GAPDH</b>	Mald 1.01	'Golden Delicious'	13,880
<b>GAPDH</b>	Mald 1.01	'Flordika'	10,620
<b>GAPDH</b>	Mald 1.01	'Jonagold'	19,460
<b>GAPDH</b>	Mald 1.01	'Frosta'	8,630
<b>GAPDH</b>	Mald 1.02	'Golden Delicious'	16,150
<b>GAPDH</b>	Mald 1.02	'Flordika'	9,140
<b>GAPDH</b>	Mald 1.02	'Jonagold'	15,900
<b>GAPDH</b>	Mald 1.02	'Frosta'	19,470

## 6. Diskuse

Správný výběr referenčního genu pro účely relativní kvantifikace je základním předpokladem pro správně provedený qPCR experiment tohoto druhu. Nevykazuje-li gen ve všech vzorcích stabilní expresi, jsou takto získaná data odsouzená k nepřesnosti a značnému zkreslení výsledků. Vzhledem k tomu, že univerzálně použitý referenční gen neexistuje, je nutné provést validaci pro každý zkoumaný organismus zvlášť a to včetně jednotlivých tkání a jejich vývojových stádií (Gutierrez et al. 2008).

V této práci, zaměřené na slupku jablka, byla qPCR metodou měřena exprese tří různých house-keepingových genů (ACT7, UBC, GAPDH) ve dvou biologických replikátech, k nimž byla následně normalizována data pro cílový gen Mal d 1, taktéž získaná v tomto qPCR experimentu. Pro získání vypovídajícího množství dat bylo měření opakováno pro dvě různé Mal d 1 izoformy (1.01 a 1.02) na čtyřech odrůdách ('Golden Delicious', 'Jonagold', 'Flordika' a 'Frosta'). Výsledky stanovení relativní exprese ukazují, že nejnižší variabilitu těchto hodnot mezi biologickými replikáty vykazují vzorky normalizované k aktinu. Na základě hodnocení diferencí mezi těmito replikáty byly prokázány statisticky významné rozdíly mezi aktinem a GAPDH, což indikuje že GAPDH pro svou transkripční nestabilitu není pro slupku vhodným referenčním genem.

Metoda tvorby směšného vzorku ze tří náhodně odebraných plodů byla provedena dle Táborské (2018), jejíž práce dokázala, že osluněnost plodů z různých míst koruny stromu a další případné lokální odlišnosti nejsou pro tuto analýzu významné.

Pro normalizaci k referenčním genům byly vybrány geny Mal d 1.01 a 1.02, které jsou nejvíce exprimovanými izoalergeny ve slupce i dužině jablka (Vegro et al. 2016; Pagliarani et al. 2013). Pro stanovení míry relativní exprese (R) byly použity hodnoty  $\Delta\Delta Ct$ . Mal d 1.02 vykazovala ve všech vzorcích vyšší expresi než izoforma 1.01, což je v souladu s Beuning et al. (2004) a Botton et al. (2009), zatímco Pagliarani et al. (2013) zmiňuje opačné pořadí. Zdaleka nejvyšší exprese obou izoform byla zaznamenána u odrůdy 'Jonagold', poté 'Golden Delicious', 'Frosta' a 'Flordika', nicméně data nebyla statisticky zpracována z důvodu použití různých referenčních genů a jejich očekávaných výchylek stability.

Diference sklonu standardní křivky mezi oběma geny a referenčním genem ACT7 se pohybují v intervalu od (-0,1) do 0,1 jak pro metodiku používanou v této práci prokázala Zunová (2017). Je možné tak srovnávat tyto geny pomocí  $\Delta\Delta Ct$  metody bez korekcí na účinnost (E). V práci Pagliarani et al. (2013) byly naopak v účinnosti (E) zaznamenány výraznější rozdíly, což může být způsobeno nesprávnou optimalizací PCR reakce.

Jako reportérové barvivo bylo v této práci použito interkalační barvivo SYBR® Green, které je široce užívanou a cenově dostupnější alternativou k fluorescenčním Taq Man sondám (Cao & Shockley 2012). SYBR® se váže nespecificky na dvouvláknovou DNA a každá reakce musí proto probíhat samostatně. Nevýhodou je citlivost na přítomnost primerových dimerů (Bonab et al. 2015).

Rozdíly mezi biologickými replikáty v hodnotách relativní exprese zobrazené v tabulkách 2 - 4 mezi jsou nejvíce patrné u GAPDH, následuje UBC a nejmenší výkyvy vykazuje aktin. Statisticky významné rozdíly mezi ACT a UBC, stejně jako UBC a GAPDH však nebyly potvrzeny - Kruskal Wallisův test připouští přijatelně velkou pravděpodobnost (12,091512 a

5,3537 %), že tyto výsledky byly způsobeny náhodným výkyvem směrem k extrému za předpokladu shodné stability těchto genů.

Porovnání této trojice genů ve slupce i v dužině u jiných dvou odrůd - 'Florina' a 'Gala' učinili v roce 2013 Pagliarani et al. Nejstabilnější napříč tkáněmi i kultivary se jevil aktin. Nejmenší rozdíly mezi geny byly zaznamenány právě ve slupce. U slupky odrůdy 'Florina' pořadí ACT - UBC - GAPDH odpovídá našemu pozorování, u odrůdy 'Gala' vykazuje GAPDH nižší rozdíly než UBC, ale nikoli statisticky významně. V dužině byly výkyvy GAPDH mnohem výraznější. Aktin je i některými dalšími autory označován jako stabilní (Li et al. 2016), zatímco Bowen et al. (2014) uvádí jeho značnou variabilitu napříč tkáněmi jablka, nicméně nerozlišuje mezi slupkou a dužinou a oba autoři používají jiné odrůdy. Rozdíl v expresi mezi listem a plodem (Bowen et al. 2014) by mohl činit problémy při jakémkoli srovnávání mezi těmito tkáněmi, např. ověřování úspěšnosti RNAi při tvorbě hypoalergenních odrůd, které uvádí např. Dubois et al. (2015). Tong et al. (2009) při validaci referenčních genů u broskve vyhodnotil jak aktin tak GAPDH jako spíše nevhodné.

Dalšími referenčními geny validovanými pro qPCR u jablka jsou PP2A a RPL2 (Kumar & Singh 2015). Komplexní porovnání 10 kandidátních genů pro slupku a dužinu jablka v různých vývojových stádiích provedl Zhu et al. (2019), jehož výsledky se s našimi shodují v případě aktinu, který byl po scelení výsledků tří nezávislých statistických programů vyhodnocen jako nejrelevantnější pro slupku společně s dalšími dvěma geny - WD40 a GAPDH. Statistické vyhodnocení GAPDH jako vhodného genu by mohlo být způsobeno použitím pouze jedné s námi shodné odrůdy ('Golden Delicious') a pěti odlišných ('Honey Crisp', 'Starking', 'Pinova', 'Gala', 'Hong-Xun') nebo použitím jiné statistické metodiky. Stabilitu GAPDH za různých stresových podmínek potvrzuje také Kumar & Singh (2015) na kultivaru 'Royal Delicious'.

Pro dužinu pak Zhu et al. (2019) doporučuje EF- $\alpha$ , CKL a opět WD40, který se tak jeví nejstabilnější napříč všemi kategoriemi, což potvrzuje také Perini et al. (2014), který ale zároveň hodnotí jako vysoce stabilní gen MDH, který u Zhu et al. (2019) dosahoval nejhorsích výsledků. Zhu et al. (2019) provedl také validaci kombinací těchto genů pro normalizaci za použití více genů dohromady, jak doporučuje MIQE (Bustin et al. 2009).

Zajímavým přístupem je využití dat z RNASeq knihoven dostupných pro mnohé odrůdy, tkáně i vývojová stádia v práci Bowen et al. (2014). Jejich srovnáním bylo pro qPCR analýzu vybráno deset genů vykazujících nejnižší variabilitu, z nichž většinu tvořily dosud nepopsané transkripty. Nejlépe dopadl MDP0000173025, k němuž byl nalezen LTP homolog v *Arabidopsis*. Je patrné, že uvedené výsledky mnoha autorů se navzájem liší. Ačkoli naše data jsou v tomto ohledu nevypovídající, je možné, že stabilita exprese house-keepingových genů může záviset na kultivaru. Bylo by vhodné provést rozsáhlejší analýzu napříč kultivary běžně dostupnými v obchodních řetězcích a provést porovnání také mezi starými a novými odrůdami.



## 7. Závěr

Na základě odborné literatury byla vypracována literární rešerše na téma „orální alergie člověka na alergeny v jablečné slupce“, jak je uvedeno v zadání cílů teoretické části práce. Klíčové poznatky je možné shrnout v několika následujících bodech:

- Vzrůstající prevalenci potravinových alergií není možné vysvětlit pouze pomocí hygienické hypotézy. Indukce Th2 odpovědi je způsobena změnou cytokinového prostředí způsobenou signalizací okolních buněk o přítomné hrozbě. Tyto signály je u geneticky predisponovaného jedince možné vyvolat i v případě kontaktu s neškodným antigenem a mohou být výrazně podpořeny faktory vnějšího prostředí jako znečištěné ovzduší nebo průmyslově zpracovaná strava. V posledních letech se ukazuje, že na udržování tolerance se pravděpodobně aktivně podílí střevní mikrobiom.
- Alergenní potenciál může mít pouze protein splňující pět základních požadavků - být zaregistrován antigen prezentujícími buňkami (imunogenicita), mít na svém povrchu T-ly a IgE epitopy, vykazovat přiměřenou stabilitu a uvolnit se ze zdroje v dostatečném množství. Také tyto vlastnosti mohou být pozitivně či negativně ovlivněny environmentálními faktory.
- Přemostění dvou Fc receptorů vazbou antigenu na dvě sousední protilátky je nezbytné pro uvolnění histaminu a dalších prozánětlivých mediátorů. Každý alergen tak musí mít na svém povrchu minimálně dva identické epitopy (být multivalentní) nebo tvořit dimery. Schopnost dimerizace některých Mal d 1 izoform však nebyla z hlediska alergenicity vyhodnocena jako důležitá. Žádný Bet v 1 homolog zatím nebyl krystalizován se dvěma Fab fragmenty monoklonálních protilátek a multivalence je tak pouhým předpokladem.
- Genová rodina Mal d 1 kóduje nejvýznamnější alergeny ve slupce i dužině jablka. Obsahuje celkem 31 genů, z nichž 10 je aktivně exprimováno s různou intenzitou v závislosti na kultivaru, konkrétním genotypu a stresových podmínkách. Nejvyšší expresi vykazují Mal d 1.01 a 1.02. s výjimkou některých hypoalergenních odrůd, kde převažuje Mal d 1.11A, který zároveň v IgE testech vyazuje velmi nízkou reaktivitu.
- V poslední dekádě bylo úspěšně docíleno umlčení některých alergenních izoform Mal d 1 pomocí RNA interference. Vzhledem k evropské legislativě nepřijímající genetickému inženýrství mimo laboratoře však tento přístup nemá příliš perspektivu. Alternativní metodou je tak screening mezi kultivary za účelem najít vhodné genotypy pro klasické šlechtění.
- Genovou expresi je možné zkoumat na transkripční (mRNA) a transkripční úrovni (protein). V případě kvantifikace proteinu není vhodné zaměřovat se na jeho celkový obsah ve vzorku, protože jednotlivé izoformy vykazují různou míru alergenicity. Samotné měření obsahu mRNA je technicky jednodušší, ale z hlediska alergenicity není

příliš vypovídající, není-li potvrzeno na základě korelace s množstvím proteinu či nejlépe s orálními provokačními testy na pacientech.

- Kvantifikace mRNA je standardně prováděna metodou qRT-PCR, která je založena na detekci genového produktu “v reálném čase” pomocí zaznamenávání intenzity fluorescence značených sond po každém amplifikačním cyklu. Výstupem je číslo cyklu (Ct hodnota) po kterém intenzita dosáhne nastavené prahové hodnoty. Běžně používaná strategie je založena na porovnání Ct hodnot sledovaného a referenčního genu. Pro slupku a dužinu jablka je nejpoužívanějším referenčním genem house-keepingový gen ACT7, který je však některými autory hodnocen jako transkripčně nestabilní.

Cílem experimentální části práce bylo provést porovnání vhodnosti tří běžně používaných referenčních genů (ACT7, GAPDH, UBC) pro účely relativní kvantifikace v jablečné slupce. Každé dva biologické replikáty byly odebrány ze stejného stromu a za předpokladu stability referenčního genu by rozdíly v expresi mezi těmito dvěma replikáty měly být minimální.

- Z porovnání vyšel nejlépe ACT7, jehož míra variability mezi replikáty byla v přijatelném rozmezí a mohl by tak být vhodným referenčním genem. GAPDH byl oproti tomu vyhodnocen jako nestabilní. Rozdíly UBC oproti oběma genům nebyly statisticky významné.
- Z diskuse nicméně vyplynula značná diverzita až protichůdnost výsledků napříč různými autory, což je pravděpodobně způsobeno vlivem ročníku a odrůdovou specifitou, která by stála za bližší prozkoumání.
- Data z RNA sekvenování odhalila několik dosud blíže nepopsaných genů, jejichž velmi stabilní exprese byla následně ověřena i pomocí RT-PCR. Pro účely diagnostiky alergenicity v českých podmínkách by bylo zajímavé provést validaci tohoto genu na větším vzorku odrůd zahrnující i místní tradiční kultivary a provést nové porovnání s ACT7 hodnoceným v této práci jako nejvhodnější.

## 8. Seznam literatury

- AAGAARD, Kjersti M. Mode of delivery and pondering potential sources of the neonatal microbiome. *EBioMedicine*, 2020, 51.
- ABBAS, Abul K., Andrew H. LICHTMAN a Shiv PILLAI. *Cellular and molecular immunology*. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, c2015. ISBN 978-0-323-22275-4.
- ABDEL-GADIR, Azza, et al. Microbiota therapy acts via a regulatory T cell MyD88/ROR $\gamma$ t pathway to suppress food allergy. *Nature Medicine*, 2019, 25.7: 1164-1174.
- ABRAHAMSSON, Thomas R.; WU, Richard You; JENMALM, Maria C. Gut microbiota and allergy: the importance of the pregnancy period. *Pediatric research*, 2015, 77.1-2: 214-219.
- AGLAS, Lorenz, et al. Ligand Binding of PR-10 Proteins with a Particular Focus on the Bet v 1 Allergen Family. *Current Allergy and Asthma Reports*, 2020, 20.7.
- AHAMMER, Linda, et al. Structure of the major apple allergen Mal d 1. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2017, 65.8: 1606-1612.
- AKIRA, Shizuo; UEMATSU, Satoshi; TAKEUCHI, Osamu. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006, 124.4: 783-801.
- ALBERTS, Bruce, Alexander JOHNSON, Julian LEWIS a David MORGAN. *Molecular Biology of the Cell*. 6, ilustrované vydání. Garland Science, 2017. ISBN 1317563751.
- ALI, Nasir, et al. Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics. *BioMed research international*, 2017, 2017. (Ali et al., 2017)
- ALLFAM - The Database of Allergen Families, 2020 [online]. Medical University of Vienna. [cit. 16.5.2020]. Dostupné z: <http://www.meduniwien.ac.at/allfam/>
- ARTIS, David; SPITS, Hergen. The biology of innate lymphoid cells. *Nature*, 2015, 517.7534: 293-301.
- ASERO, Riccardo, et al. Double-blind, placebo-controlled food challenge in adults in everyday clinical practice: a reappraisal of their limitations and real indications. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 2009, 9.4: 379-385.
- ASIF, Mehar, et al. Isolation of high-quality RNA from apple (*Malus domestica*) fruit. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2006, 54.15: 5227-5229.
- AZAD, Meghan B., et al. Infant gut microbiota and food sensitization: associations in the first year of life. *Clinical & Experimental Allergy*, 2015, 45.3: 632-643.
- BAERENFALLER, Katja, et al. Genome-scale proteomics reveals *Arabidopsis thaliana* gene models and proteome dynamics. *Science*, 2008, 320.5878: 938-941.

- BAI, Yang; DOUGHERTY, Laura; XU, Kenong. Towards an improved apple reference transcriptome using RNA-seq. *Molecular Genetics and Genomics*, 2014, 289.3: 427-438.
- BARNES, Kathleen C. Genomewide association studies in allergy and the influence of ethnicity. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 2010, 10.5: 427.
- BARTLETT, John MS; STIRLING, David. A short history of the polymerase chain reaction. In: *PCR protocols*. Humana Press, 2003. p. 3-6. (Bartlett & Stirling., 2003)
- BARTRA TOMÀS, Joan, et al. Air pollution and allergens. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 2007, vol. 17, num. supl. 2, p. 3-8, 2007.
- BEHRENDT, Heidrun; BECKER, Wolf-Meinhard. Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors. *Current opinion in immunology*, 2001, 13.6: 709-715.
- BENNICH, H. H., et al. Immunoglobulin E: a new class of human immunoglobulin. *Immunology*, 1968, 15.3: 323. (Bennich et al., 1968)
- BERENSMEIER, Sonja. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied microbiology and biotechnology*, 2006, 73.3: 495-504.
- BERES, Amy J., et al. CD8+ Foxp3+ regulatory T cells are induced during graft-versus-host disease and mitigate disease severity. *The Journal of Immunology*, 2012, 189.1: 464-474.
- BEUNING, Lesley, et al. Characterisation of Mal d 1-related genes in *Malus*. *Plant molecular biology*, 2004, 55.3: 369-388.
- BIEDERMANN, Tilo, et al. Birch pollen allergy in Europe. *Allergy*, 2019, 74.7: 1237-1248.
- BLOOMFIELD, Sall human microbiome, infectious disease prevention and the role of targeted hygiene. *Perspectively F., et al. Time to abandon the hygiene hypothesis: new perspectives on allergic disease, thes in public health*, 2016, 136.4: 213-224.
- BOCK, S. Allan, et al. Double-blind, placebo-controlled food challenge (DBPCFC) as an office procedure: a manual. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1988, 82.6: 986-997.
- BOHLE, Barbara. T-cell epitopes of food allergens. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 2006, 30.2: 97-108.
- BOJCUKOVA, Jana, et al. Comparison of two multiplex arrays in the diagnostics of allergy. *Clinical and Translational Allergy*, 2019, 9.1: 31.
- BOKSZCZANIN, Kamila Lucia, et al. Investigation of Mal d 1 Allelic variants and phylogenetic diversity in contemporary and historical Polish apple cultivars. *Journal of Agricultural Science*, 2015, 7.11: 115.
- BOLHAAR, S. T. H. P., et al. A mutant of the major apple allergen, Mal d 1, demonstrating hypo-allergenicity in the target organ by double-blind placebo-controlled food challenge. *Clinical & Experimental Allergy*, 2005, 35.12: 1638-1644.

- BONAB, M. M., et al. Real-time PCR handbook. Lab Chip [Internet], 2015, 4.2: 189-200. (dostupné z: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf>)
- BORRES, Magnus P., et al. Recent advances in component resolved diagnosis in food allergy. *Allergology International*, 2016, 65.4: 378-387.
- BOTTON, Alessandro, et al. Environmental factors affecting the expression of apple (*Malus domestica* L. Borkh) allergen-encoding genes. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2009, 84.6: 182-187.
- BOUSQUET, Jean, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. *New England Journal of Medicine*, 1990, 323.15: 1033-1039.
- BOWEN, Judith, et al. Selection of low-variance expressed *Malus x domestica* (apple) genes for use as quantitative PCR reference genes (housekeepers). *Tree Genetics & Genomes*, 2014, 10.3: 751-759.
- BOYCE, Joshua A., et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: summary of the NIAID-sponsored expert panel report. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2011, 64.1: 175-192.
- BOYER, Jeanelle; LIU, Rui Hai. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition journal*, 2004, 3.1: 5.
- BRANDTZAEG, Per. Immune functions of nasopharyngeal lymphoid tissue. In: *Recent Advances in Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airways*. Karger Publishers, 2011. p. 20-24.
- BREITENEDER, Heimo. Thaumatin-like proteins—a new family of pollen and fruit allergens. *Allergy*, 2004, 59.5: 479-481.
- BUNNEY, William E., et al. Microarray technology: a review of new strategies to discover candidate vulnerability genes in psychiatric disorders. *American Journal of Psychiatry*, 2003, 160.4: 657-666.
- BUSTIN, S. A. INVITED REVIEW Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology*, 2002, 29: 23-39.
- BUSTIN, Stephen A., et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. 2009.
- BUSTIN, Stephen A.; MUELLER, Reinhold. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science*, 2005, 109.4: 365-379.
- BUTLER, J. M. Chapter 3: DNA Quantitation. *Fundamentals of Forensic DNA Typing*, 2012.

- CANIS, Martin, et al. Recombinant marker allergens in diagnosis of patients with allergic rhinoconjunctivitis to tree and grass pollens. *American journal of rhinology & allergy*, 2011, 25.1: 36-39.
- CAO, Heping; SHOCKEY, Jay M. Comparison of TaqMan and SYBR Green qPCR methods for quantitative gene expression in tung tree tissues. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2012, 60.50: 12296-12303.
- CARLI, Marco De, et al. Review human Th1 and Th2 cells: functional properties, regulation of development and role in autoimmunity. *Autoimmunity*, 1994, 18.4: 301-308.
- CARLSON, Geoffrey; COOP, Christopher. Pollen food allergy syndrome (PFAS): A review of current available literature. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 2019, 123.4: 359-365.
- CASTELAIN, Michel. Globalisation and allergy. *European Journal of Dermatology*, 2011, 21.4: 472-478.
- CASTELAIN, Michel. Globalisation and allergy. *European Journal of Dermatology*, 2011, 21.4: 472-478.
- CDOLE, Jeremiah R., et al. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature*, 2012, 483.7389: 345-349.
- Codex alimentarius, 2018 [online]. FAO: [cit. 16.5.2020]. Dostupné z: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/en/>
- COCHRANE, S., et al. Factors influencing the incidence and prevalence of food allergy. *Allergy*, 2009, 64.9: 1246-1255.
- COCHRANE, S., et al. Factors influencing the incidence and prevalence of food allergy. *Allergy*, 2009, 64.9: 1246-1255.
- COLEBROOK, Leonard. Almroth Wright—pioneer in immunology. *British medical journal*, 1953, 2.4837: 635.
- COLLIN, Matthew; BIGLEY, Venetia. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*, 2018, 154.1: 3-20.
- COLLIN, Matthew; BIGLEY, Venetia. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*, 2018, 154.1: 3-20.
- COLLIN, Matthew; BIGLEY, Venetia. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*, 2018, 154.1: 3-20.
- COLLIN, Matthew; BIGLEY, Venetia. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*, 2018, 154.1: 3-20.
- CONSIDINE, Michael J., et al. Molecular genetic features of polyploidization and aneuploidization reveal unique patterns for genome duplication in diploid *Malus*. *PloS one*, 2012, 7.1: e29449.

- CROCKARD, A. D.; ENNIS, M. Basophil histamine release tests in the diagnosis of allergy and asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, 2001, 31.3: 345-350.
- CSAKO, Gyorgy. Present and future of rapid and/or high-throughput methods for nucleic acid testing. *Clinica Chimica Acta*, 2006, 363.1-2: 6-31.
- CURIN, Mirela; GARIB, Viktoriya; VALENTA, Rudolf. Single recombinant and purified major allergens and peptides: how they are made and how they change allergy diagnosis and treatment. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 2017, 119.3: 201-209.
- CZERNYSZWICZE Eugenia; Long-term trends in production and consumption of apples in Poland, Europe and worldwide. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus* 2016, 15.395–104.
- ČIHÁK, Radomír, GRIM, Miloš, ed. *Anatomie. 3., upr. a dopl. vyd.* Praha: Grada, 2016. ISBN 978-80-247-3817-8.
- DACCORD, Nicolas, et al. High-quality de novo assembly of the apple genome and methylome dynamics of early fruit development. *Nature genetics*, 2017, 49.7: 1099-1106.
- DAHM, Ralf. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Human genetics*, 2008, 122.6: 565-581.
- DALOD, Marc, et al. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *The EMBO journal*, 2014, 33.10: 1104-1116.
- D'AMATO, Gennaro, et al. Urban air pollution and climate change as environmental risk factors of respiratory allergy: an update. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 2010, 20.2: 95-102.
- DIAZ-PERALES, A., et al. cDNA cloning and heterologous expression of the major allergens from peach and apple belonging to the lipid-transfer protein family. *Clinical & Experimental Allergy*, 2002, 32.1: 87-92.
- DIEFENBACH, Andreas; COLONNA, Marco; ROMAGNANI, Chiara. The ILC world revisited. *Immunity*, 2017, 46.3: 327-332.
- DUAN, Naibin, et al. Genome re-sequencing reveals the history of apple and supports a two-stage model for fruit enlargement. *Nature Communications*, 2017, 8.1: 1-11.
- DUBOIS, Anthony EJ, et al. First successful reduction of clinical allergenicity of food by genetic modification: Mal d 1-silenced apples cause fewer allergy symptoms than the wild-type cultivar. *Allergy*, 2015, 70.11: 1406-1412.
- DUNN, S. Eliza, et al. The allergenicity of genetically modified foods from genetically engineered crops: a narrative and systematic review. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 2017, 119.3: 214-222. e3.
- EBNER, C., et al. Common epitopes of birch pollen and apples—studies by western and northern blot. *Journal of allergy and clinical immunology*, 1991, 88.4: 588-594.

- EDFORS, Fredrik, et al. Gene specific correlation of RNA and protein levels in human cells and tissues. *Molecular systems biology*, 2016, 12.10: 883.
- EGGER, Matthias, et al. Assessing protein immunogenicity with a dendritic cell line-derived endolysosomal degradome. *PLoS one*, 2011, 6.2.
- EHRT, Sabine; SCHNAPPINGER, Dirk. Isolation of plasmids from *E. coli* by alkaline lysis. In: *E. coli Plasmid Vectors*. Humana Press, 2003. p. 75-78.
- ELLEFSON, Jared W., et al. Synthetic evolutionary origin of a proofreading reverse transcriptase. *Science*, 2016, 352.6293: 1590-1593.
- ENRIQUEZ, Rachel, et al. The relationship between vaccine refusal and self-report of atopic disease in children. *Journal of allergy and clinical immunology*, 2005, 115.4: 737-744.
- ESPLEY, Richard V., et al. Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10. *The Plant Journal*, 2007, 49.3: 414-427. (Espley et al., 2007)
- FARNETI, Brian, et al. Is there room for improving the nutraceutical composition of apple?. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2015, 63.10: 2750-2759.
- FEEHLEY, Taylor, et al. Healthy infants harbor intestinal bacteria that protect against food allergy. *Nature medicine*, 2019, 25.3: 448. (19)
- FERNANDEZ-RIVAS, M.; CUEVAS, M. Peels of Rosaceae fruits have a higher allergenicity than pulps. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 1999, 29.9: 1239-1247.
- FERNÁNDEZ-RIVAS, Montserrat, et al. Apple allergy across Europe: how allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2006, 118.2: 481-488.
- FERREIRA, Fatima, et al. Purification of recombinant and birch pollen derived-Bet v I; comparison of immunological properties. In: *Molecular Biology and Immunology of Allergens*. CRC Press, 1993.
- FILIPENKO, E. A., et al. PR-proteins with ribonuclease activity and plant resistance against pathogenic fungi. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 2013, 3.6: 474-480.
- FINKELMAN, F. D., et al. IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. *The Journal of Immunology*, 1988, 141.7: 2335-2341.
- FORET, František, et al. Macrofluidic device for preparative concentration based on Electrophoresis. *Analytical chemistry*, 2019, 91.11: 7047-7053.
- FREI, Thomas; GASSNER, Ewald. Climate change and its impact on birch pollen quantities and the start of the pollen season an example from Switzerland for the period 1969–2006. *International Journal of Biometeorology*, 2008, 52.7: 667.
- FUCHS, Martin. *Potravinová alergie a intolerance*. Mladá fronta, 2016.



- GAIER, Sonja, et al. Purification and structural stability of the peach allergens Pru p 1 and Pru p 3. *Molecular nutrition & food research*, 2008, 52.S2: S220-S229.
- GAJHEDE, Michael, et al. X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. *Nature structural biology*, 1996, 3.12: 1040-1045.
- GAMBINO, Giorgio; PERRONE, Irene; GRIBAUDO, Ivana. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*, 2008, 19.6: 520-525.
- GAO, Z. S., et al. Genomic cloning and linkage mapping of the Mal d 1 (PR-10) gene family in apple (*Malus domestica*). *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 111.1: 171-183.
- GAO, Zhongshan, et al. Assessment of allelic diversity in intron-containing Mal d 1 genes and their association to apple allergenicity. *BMC Plant Biology*, 2008, 8.1: 116.
- GARCÍA-CASADO, G., et al. Rye flour allergens associated with baker's asthma. Correlation between in vivo and in vitro activities and comparison with their wheat and barley homologues. *Clinical & Experimental Allergy*, 1996, 26.4: 428-435.
- GARDNER, James M., et al. AIRE in the thymus and beyond. *Current opinion in immunology*, 2009, 21.6: 582-589.
- GASIC, Ksenija; HERNANDEZ, Alvaro; KORBAN, Schuyler S. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2004, 22.4: 437-438.
- GELL, P. G. H.; COOMBS, R. R. A. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. *Clinical aspects of immunology*, 1975, 2.
- GIERAS, Anna, et al. IgE epitope proximity determines immune complex shape and effector cell activation capacity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2016, 137.5: 1557-1565.
- GILISSEN, Luud JWJ, et al. Silencing the major apple allergen Mal d 1 by using the RNA interference approach. *Journal of allergy and clinical immunology*, 2005, 115.2: 364-369.
- GOH, Denise LM, et al. Edible “bird's nest”-induced anaphylaxis: An under-recognized entity?. *The Journal of pediatrics*, 2000, 137.2: 277-279.
- GOLEVA, Elena, et al. Epithelial barrier repair and prevention of allergy. *The Journal of clinical investigation*, 2019, 129.4: 1463-1474.
- GONI, Ramon; GARCÍA, Patricia; FOISSAC, Sylvain. The qPCR data statistical analysis. *Integromics White Paper*, 2009, 1: 1-9.
- GOOD-JACOBSON, Kim L. Strength in diversity: Phenotypic, functional, and molecular heterogeneity within the memory B cell repertoire. *Immunological reviews*, 2018, 284.1: 67-78.
- GOOTENBERG, Jonathan S., et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 2017, 356.6336: 438-442.

- GRICE, Elizabeth A., et al. A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome research*, 2008, 18.7: 1043-1050.
- GROSS, Briana L., et al. Genetic diversity in *Malus* × *domestica* (Rosaceae) through time in response to domestication. *American journal of botany*, 2014, 101.10: 1770-1779.
- GROTE, Monika; VALENTA, Rudolf; REICHEL, Rudolf. Abortive pollen germination: a mechanism of allergen release in birch, alder, and hazel revealed by immunogold electron microscopy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2003, 111.5: 1017-1023.
- GROTE, MONIKA; VRTALA, S.; VALENTA, R. Monitoring of two allergens, Bet v I and profilin, in dry and rehydrated birch pollen by immunogold electron microscopy and immunoblotting. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1993, 41.5: 745-750.
- GUTIERREZ, Laurent, et al. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant biotechnology journal*, 2008, 6.6: 609-618.
- GUTIERREZ, Laurent, et al. Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. *The Plant Cell*, 2008, 20.7: 1734-1735.
- HAMILTON, Robert G.; ADKINSON JR, N. Franklin. In vitro assays for the diagnosis of IgE-mediated disorders. *Journal of allergy and clinical immunology*, 2004, 114.2: 213-225.
- HARABUCHI, Yasuaki; HAYASHI, Tatsuya; KATADA, Akihiro (ed.). *Recent Advances in Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airways: Proceedings of the 7th International Symposium on Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airways, July 7-9, 2010, Asahikawa, Japan*. Karger Medical and Scientific Publishers, 2011.
- HARB, Hani; RENZ, Harald. Update on epigenetics in allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2015, 135.1: 15-24.
- HASEGAWA, Hitoshi; MATSUMOTO, Takuya. Mechanisms of tolerance induction by dendritic cells in vivo. *Frontiers in immunology*, 2018, 9: 350.
- HASHIMSHONY, Tamar, et al. CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification. *Cell reports*, 2012, 2.3: 666-673.
- HECKER, J., et al. An IgE epitope of Bet v 1 and fagales PR10 proteins as defined by a human monoclonal IgE. *Allergy*, 2012, 67.12: 1530-1537.
- HELLEMANS, Jan, et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome biology*, 2007, 8.2: 1-14.
- HELLEMANS, Jan; VANDESOMPELE, Jo. qPCR data analysis-unlocking the secret to successful results. *PCR troubleshooting and optimization: the essential guide*, 2011, 1: 13.
- HELLER, Ryan C., et al. Engineering of a thermostable viral polymerase using metagenome-derived diversity for highly sensitive and specific RT-PCR. *Nucleic acids research*, 2019, 47.7: 3619-3630.

- HEO, Yong; SAXON, Andrew; HANKINSON, Oliver. Effect of diesel exhaust particles and their components on the allergen-specific IgE and IgG1 response in mice. *Toxicology*, 2001, 159.3: 143-158.
- HERNDL, Anita, et al. Mapping of *Malus domestica* allergens by 2-D electrophoresis and IgE-reactivity. *Electrophoresis*, 2007, 28.3: 437-448.
- HILZ, Helmuth; WIEGERS, Ulrich; ADAMIETZ, Peter. Stimulation of proteinase K action by denaturing agents: application to the isolation of nucleic acids and the degradation of 'masked' proteins. *European Journal of Biochemistry*, 1975, 56.1: 103-108.
- HOFFMANN-SOMMERGRUBER, Karin, et al. Genomic characterization of members of the Bet v 1 family: genes coding for allergens and pathogenesis-related proteins share intron positions. *Gene*, 1997, 197.1-2: 91-100.
- HOLM, J., et al. Molecular basis of allergic cross-reactivity between group 1 major allergens from birch and apple. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2001, 756.1-2: 307-313.
- HOLM, Jens, et al. Epitope grafting, re-creating a conformational Bet v 1 antibody epitope on the surface of the homologous apple allergen Mal d 1. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286.20: 17569-17578.
- HOLT, C., et al. Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods. *Journal of dairy science*, 2013, 96.10: 6127-6146.
- HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTUŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK. *Základy imunologie*. 6., aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3.
- HUANG, Jianjian, et al. Application of in vitro and in vivo models in the study of food allergy. *Food Science and Human Wellness*, 2018, 7.4: 235-243.
- CHEN, Chun-Yu, et al. Induction of interleukin-9-producing mucosal mast cells promotes susceptibility to IgE-mediated experimental food allergy. *Immunity*, 2015, 43.4: 788-802.
- CHEN, Ying, et al. Artemisia Pollen Extracts Exposed to Diesel Exhaust Enhance Airway Inflammation and Immunological Imbalance in Asthmatic Mice Model. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2020, 181.5: 342-352.
- CHEROUTRE, Hilde; LAMBOLEZ, Florence; MUCIDA, Daniel. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*, 2011, 11.7: 445-456.
- CHINTHRAJAH, R. Sharon, et al. Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2016, 137.4: 984-997.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Reagent for the single step simultaneous isolation of RNA. *Anal Biochem*, 1987, 162: 536-7.

- CHORNY, Alejo; PUGA, Irene; CERUTTI, Andrea. Innate signaling networks in mucosal IgA class switching. In: *Advances in immunology*. Academic Press, 2010. p. 31-69.
- CHOUSTERMAN, Benjamin G.; SWIRSKI, Filip K.; WEBER, Georg F. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. In: *Seminars in immunopathology*. Springer Berlin Heidelberg, 2017. p. 517-528.
- IORIO, Rosa Anna, et al. Simulated environmental criticalities affect transglutaminase of *Malus* and *Corylus pollens* having different allergenic potential. *Amino Acids*, 2012, 42.2-3: 1007-1024.
- ISHIZAKA, Teruko, et al. A new concept of triggering mechanisms of IgE-mediated histamine release. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1978, 61.5: 320-330.
- JANSSON, Linda; HEDMAN, Johannes. Challenging the proposed causes of the PCR plateau phase. *Biomolecular Detection and Quantification*, 2019, 17: 100082..
- JANSSON, Linda; HEDMAN, Johannes. Challenging the proposed causes of the PCR plateau
- JOHANSSON, S. G. O., et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *Journal of allergy and clinical immunology*, 2004, 113.5: 832-836.
- JOHANSSON-LINDBOM, Bengt; AGACE, William W. Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa. *Immunological reviews*, 2007, 215.1: 226-242.
- JOINT FAO/WHO CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION; JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME; WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Codex Alimentarius: General requirements (food hygiene)*. Food & Agriculture Org., 2018.
- KARLSSON, Caroline LJ, et al. The pioneer gut microbiota in human neonates vaginally born at term—a pilot study. *Pediatric research*, 2011, 70.3: 282-286.
- KATIFORI, Eleni, et al. Foldable structures and the natural design of pollen grains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107.17: 7635-7639.
- KIEWNING, Daniela; SCHMITZ-EIBERGER, Michaela. Effects of long-term storage on Mal d 1 content of four apple cultivars with initial low Mal d 1 content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2014, 94.4: 798-802.
- KIMBER, I., et al. Classification of contact allergens according to potency: proposals. *Food and Chemical toxicology*, 2003, 41.12: 1799-1809.
- KING, T. P., et al. Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. *International archives of allergy and immunology*, 1994, 105.3: 224.
- KITZMÜLLER, C., et al. A hypoallergenic variant of the major birch pollen allergen shows distinct characteristics in antigen processing and T-cell activation. *Allergy*, 2012, 67.11: 1375-1382.

- KNOX, R. B., et al. Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution. *Clinical & Experimental Allergy*, 1997, 27.3: 246-251.
- KOFLER, Stefan, et al. Crystallographically mapped ligand binding differs in high and low IgE binding isoforms of birch pollen allergen bet v 1. *Journal of molecular biology*, 2012, 422.1: 109-123.
- KOFLER, Stefan, et al. Stabilization of the dimeric birch pollen allergen Bet v 1 impacts its immunological properties. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289.1: 540-551.
- KOOTSTRA, Helmi S.; Vlieg-Boerstra, Berber J.; Dubois, Anthony EJ. Assessment of the reduced allergenic properties of the Santana apple. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 2007, 99.6: 522-525.
- KOPELETOVÁ, Eliška, et al. Potravinové alergie z pohledu alergologa. *Medicína pro praxi*, 2016, 13.5: 242-247.
- KRATH, Britta Naimi, et al. Development of hypo-allergenic apples: silencing of the major allergen Mal d 1 gene in 'Elstar' apple and the effect of grafting. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2009, 84.6: 52-57.
- KREBITZ, Monika, et al. Plant-based heterologous expression of Mal d 2, a thaumatin-like protein and allergen of apple (*Malus domestica*), and its characterization as an antifungal protein. *Journal of molecular biology*, 2003, 329.4: 721-730.
- KSCHONSEK, Josephine, et al. Polyphenolic compounds analysis of old and new apple cultivars and contribution of polyphenolic profile to the in vitro antioxidant capacity. *Antioxidants*, 2018, 7.1: 20.
- KUBINAK, Jason L., et al. MyD88 signaling in T cells directs IgA-mediated control of the microbiota to promote health. *Cell host & microbe*, 2015, 17.2: 153-163
- KUKA, Mirela; Iannaccone, Matteo. The role of lymph node sinus macrophages in host defense. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2014, 1319.1: 38-46.
- KUMAR, Gulshan; Singh, Anil Kumar. Reference gene validation for qRT-PCR based gene expression studies in different developmental stages and under biotic stress in apple. *Scientia Horticulturae*, 2015, 197: 597-606.
- KUO, Chang-Hung, et al. Early life exposure to antibiotics and the risk of childhood allergic diseases: an update from the perspective of the hygiene hypothesis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2013, 46.5: 320-329.
- KURIYAN, John; Eisenberg, David. The origin of protein interactions and allostery in colocalization. *Nature*, 2007, 450.7172: 983-990.
- LEMIRE, Karissa A.; Rodriguez, Yelitza Y.; McIntosh, Michael T. Alkaline hydrolysis to remove potentially infectious viral RNA contaminants from DNA. *Virology journal*, 2016, 13.1: 88.

- LEUNG, Agnes SY; WONG, Gary WK; TANG, Mimi LK. Food allergy in the developing world. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2018, 141.1: 76-78. e1.
- LEYVA-CASTILLO, Juan Manuel, et al. Skin thymic stromal lymphopoietin initiates Th2 responses through an orchestrated immune cascade. *Nature communications*, 2013, 4.1: 1-12.
- LI M, et al. (2008) Crystal structure of a dimerized cockroach allergen Bla g 2 complexed with a monoclonal antibody. *J Biol Chem* 283:22806–22814
- LI, J. Y., et al. Selection of reference genes for real-time quantitative PCR in apples (*Malus domestica*) in vitro. *Journal of Fruit Science*, 2016, 33.9: 1033-1042.
- LIEW, Woei Kang, et al. Paediatric anaphylaxis in a Singaporean children cohort: changing food allergy triggers over time. *Asia Pacific Allergy*, 2013, 3.1: 29-34.
- LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *methods*, 2001, 25.4: 402-408. (Livak & Schmittgen, 2001)
- LLEWELYN, Meirion B.; HAWKINS, Robert E.; RUSSELL, Stephen J. Discovery of antibodies. *British Medical Journal*, 1992, 305.6864: 1269-1272.
- LOH, Wenyin; TANG, Mimi LK. The epidemiology of food allergy in the global context. *International journal of environmental research and public health*, 2018, 15.9: 2043.
- LOMBARDERO, M., et al. Prevalence of sensitization to *Artemisia* allergens Art v 1, Art v 3 and Art v 60 kDa. Cross-reactivity among Art v 3 and other relevant lipid-transfer protein allergens. *Clinical & experimental allergy*, 2004, 34.9: 1415-1421.
- LOZANO-OJALVO, D.; BERIN, C.; TORDESILLAS, L. Immune Basis of Allergic Reactions to Food. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*, 2019, 29.1: 1-14.)
- MA, Y., et al. Amino acid positions involved in the formation of IgE-binding epitopes of Mal d 1, the major apple allergen. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2006, 53-62.
- MA, Yan, et al. Mutational analysis of amino acid positions crucial for IgE-binding epitopes of the major apple (*Malus domestica*) allergen, Mal d 1. *International archives of allergy and immunology*, 2006, 139.1: 53-62.
- MA, Ying Jun, et al. RNase protection assay. *Methods*, 1996, 10.3: 273-278.
- MALBOEUF, Christine M., et al. Thermal effects on reverse transcription: improvement of accuracy and processivity in cDNA synthesis. *Biotechniques*, 2001, 30.5: 1074-1084.
- MAN, Wing Ho; DE STEENHUIJSEN PETERS, Wouter AA; BOGAERT, Debby. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15.5: 259.
- MARINI, Richard P.; FAZIO, Gennaro. Apple rootstocks: history, physiology, management, and breeding. *Hortic Rev*, 2018, 45: 197-312.

- MARTIN, P. E., et al. Which infants with eczema are at risk of food allergy? Results from a population-based cohort. *Clinical & Experimental Allergy*, 2015, 45.1: 255-264.
- MARZBAN, Gorji, et al. Conformational changes of Mal d 2, a thaumatin-like apple allergen, induced by food processing. *Food Chemistry*, 2009, 112.4: 803-811.
- MARZBAN, Gorji, et al. Localisation and distribution of the major allergens in apple fruits. *Plant Science*, 2005, 169.2: 387-394.
- MASON, P. E., et al. The hydration structure of guanidinium and thiocyanate ions: implications for protein stability in aqueous solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100.8: 4557-4561.
- MATTHES, Anne; SCHMITZ-EIBERGER, Michaela. Apple (*Malus domestica* L. Borkh.) allergen Mal d 1: effect of cultivar, cultivation system, and storage conditions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2009, 57.22: 10548-10553.
- MCCLAIN, Scott, et al. Allergic sensitization: food-and protein-related factors. *Clinical and translational allergy*, 2014, 4.1: 11.
- MCDOLE, Jeremiah R., et al. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature*, 2012, 483.7389: 345-349.
- MEHL, A., et al. Utility of the ratio of food-specific IgE/total IgE in predicting symptomatic food allergy in children. *Allergy*, 2005, 60.8: 1034-1039.
- MEISEL, Lee, et al. A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus persica*) for functional genomics analyses. *Biological research*, 2005, 38.1: 83-88.
- MESTAS, Javier; HUGHES, Christopher CW. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *The Journal of Immunology*, 2004, 172.5: 2731-2738.
- Ministerstvo zemědělství České republiky, 2019 [online]. MZČR. [cit. 16.5.2020]. Dostupné z: [http://eagri.cz/public/web/file/643716/SVZ\\_Ovoce\\_12\\_2019.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/643716/SVZ_Ovoce_12_2019.pdf)
- MIRZA, Osman, et al. Dominant epitopes and allergic cross-reactivity: complex formation between a Fab fragment of a monoclonal murine IgG antibody and the major allergen from birch pollen Bet v 1. *The Journal of Immunology*, 2000, 165.1: 331-338.
- MITRA, Deepali; KOOTSTRA, Arend. Isolation of RNA from apple skin. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1993, 11.4: 326.
- MITROPOULOU, Alkistis N., et al. Structure of a patient-derived antibody in complex with allergen reveals simultaneous conventional and superantigen-like recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, 115.37: E8707-E8716.
- MONTILLA, N. Aguilera, et al. Mucosal immune system: a brief review. *Immunologia*, 2004, 23.2: 207-216.

- MORISSET, Dany, et al. Alternative DNA amplification methods to PCR and their application in GMO detection: a review. *European Food Research and Technology*, 2008, 227.5: 1287-1297.
- MOWAT, Allan McI. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews Immunology*, 2003, 3.4: 331-341.
- MULLIS, Kary, et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986. p. 263-273. (Mullis et al., 1986).
- MURPHY, Kenneth a Casey WEAVER. *Janeway's Immunobiology*. 9th edition. New York: Garland Science, [2016]. ISBN 978-0-8153-4551-0.
- NAZ, Rajesh K.; MENGE, Alan C. Antisperm antibodies: origin, regulation, and sperm reactivity in human infertility. *Fertility and sterility*, 1994, 61.6: 1001-1013.
- NEGRINI, A. C.; TROISE, C.; VOLTOLINI, S. ELISA in diagnosis of respiratory allergy: a comparison with RAST and skin tests. *Allergy*, 1985, 40.4: 238-241.
- NIEMI, Merja H., et al. Dimerization of lipocalin allergens. *Scientific reports*, 2015, 5: 13841.
- NIGGEMANN, B.; BEYER, K. Pitfalls in double-blind, placebo-controlled oral food challenges. *Allergy*, 2007, 62.7: 729-732.
- NICHOLAS, M. W.; NELSON, Kelly. North, south, or east? Blotting techniques. *The Journal of investigative dermatology*, 2013, 133.7: e10.
- NOOREN, Irene MA; THORNTON, Janet M. Structural characterisation and functional significance of transient protein–protein interactions. *Journal of molecular biology*, 2003, 325.5: 991-1018.
- NOTHEGGER, Bettina, et al. Allergen-specific immunotherapy with apples: selected cultivars could be a promising tool for birch pollen allergy. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2020.
- OBERHUBER, Christina, et al. Purification and characterisation of relevant natural and recombinant apple allergens. *Molecular nutrition & food research*, 2008, 52.S2: S208-S219.
- ORTOLANI, C. I. M. P., et al. The oral allergy syndrome. *Annals of allergy*, 1988, 61.6 Pt 2: 47-52.
- PAGLIARANI, G., et al. Cloning and expression of the major allergen genes in apple fruit. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2009, 84.6: 176-181.
- PAGLIARANI, Giulia, et al. A qRT-PCR assay for the expression of all Mal d 1 isoallergen genes. *BMC plant biology*, 2013, 13.1: 51.
- PARIS, Roberta, et al. ( tž Savazzini) Comparative analysis of allergen genes and pro-inflammatory factors in pollen and fruit of apple varieties. *Plant Science*, 2017, 264: 57-68.



- PARK, Eun Jeong, et al. Exosomal regulation of lymphocyte homing to the gut. *Blood advances*, 2019, 3.1: 1-11.
- PASQUATO, Nicola, et al. Crystal structure of peach Pru p 3, the prototypic member of the family of plant non-specific lipid transfer protein pan-allergens. *Journal of molecular biology*, 2006, 356.3: 684-694.
- PASTORELLO, Elide A., et al. Wheat IgE-mediated food allergy in European patients:  $\alpha$ -amylase inhibitors, lipid transfer proteins and low-molecular-weight glutenins. *International archives of allergy and immunology*, 2007, 144.1: 10-22.
- PASTORELLO, Elide A.; ROBINO, Anna M. Clinical role of lipid transfer proteins in food allergy. *Molecular nutrition & food research*, 2004, 48.5: 356-362.
- PEACE, Cameron P., et al. Apple whole genome sequences: recent advances and new prospects. *Horticulture research*, 2019, 6.1: 1-24.
- PEKAR, Judith; RET, Davide; UNTERSMAYR, Eva. Stability of allergens. *Molecular immunology*, 2018, 100: 14-20.
- PEREIRA-LORENZO, Santiago, et al. Apple (*Malus spp.*) breeding: present and future. In: *Advances in plant breeding strategies: fruits*. Springer, Cham, 2018. p. 3-29.
- PERINI, Pâmela, et al. Reference genes for transcriptional analysis of flowering and fruit ripening stages in apple (*Malus× domestica* Borkh.). *Molecular Breeding*, 2014, 34.3: 829-842.
- PERRY, Tamara T., et al. Risk of oral food challenges. *Journal of allergy and clinical immunology*, 2004, 114.5: 1164-1168.
- PFAFFL, Michael W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic acids research*, 2001, 29.9: e45-e45.
- PFAFFL, Michael W., et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters*, 2004, 26.6: 509-515.
- PIKUNOVA, A. V., et al. Microsatellite Loci Polymorphism of Apple (*Malus domestica* Borkh.) Genotypes with Different Ploidy Level. *Russian Journal of Genetics*, 2018, 54.4: 442-450.
- POMÉS, Anna, et al. WHO/IUIS Allergen Nomenclature: Providing a common language. *Molecular immunology*, 2018, 100: 3-13.
- PONT-LEZICA, Rafael F. Localizing proteins by tissue printing. In: *Western Blotting*. Humana Press, New York, NY, 2015. p. 93-104.
- PRESCOTT, Susan L., et al. A global survey of changing patterns of food allergy burden in children. *World Allergy Organization Journal*, 2013, 6.1: 1-12.
- PRESCOTT, Susan; ALLEN, Katrina J. Food allergy: riding the second wave of the allergy epidemic. *Pediatric allergy and immunology*, 2011, 22.2: 155-160.

- PROŠKOVÁ, A., et al. Allergen Mal d1 in apple cultivars. *Vědecké Práce Ovocnářské*, 2013, 23: 27-36.
- PUHRINGER, Helene Maria, et al. MdAP, a novel protein in apple, is associated with the major allergen Mal d 1. *Gene*, 2003, 321: 173-183.
- PÜHRINGER, Helene, et al. The promoter of an apple Ypr10 gene, encoding the major allergen Mal d 1, is stress-and pathogen-inducible. *Plant Science*, 2000, 152.1: 35-50.
- QUARESMA, Juarez Antonio Simões. Organization of the skin Immune system and compartmentalized immune responses in infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 2019, 32.4: e00034-18.
- RADAUER, Christian; LACKNER, Peter; BREITENEDER, Heimo. The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. *BMC evolutionary biology*, 2008, 8.1: 286.
- RAJAN, T. V. The Gell–Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *TRENDS in Immunology*, 2003, 24.7: 376-379.
- RAMASAMY, Ranjan; MUNRO, Alan; MILSTEIN, CESAR. Possible role for the Fc receptor on B lymphocytes. *Nature*, 1974, 249.5457: 573-574.
- RAO, Xiayu, et al. An improvement of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics*, 2013, 3.3: 71.
- RICCI, Giampaolo, et al. 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*, 2010, 45.7: 1517-1523
- RIVAS, Magali Noval, et al. Regulatory T cell reprogramming toward a Th2-cell-like lineage impairs oral tolerance and promotes food allergy. *Immunity*, 2015, 42.3: 512-523.
- ROMER, Emilia, et al. Tiered approach for the identification of Mal d 1 reduced, well tolerated apple genotypes. *Scientific Reports*, 2020, 10.1: 1-13.
- ROULIAS, Anargyros, et al. Differences in the intrinsic immunogenicity and allergenicity of B et v 1 and related food allergens revealed by site-directed mutagenesis. *Allergy*, 2014, 69.2: 208-215.
- ROUVINEN, Juha, et al. Transient dimers of allergens. *PLoS One*, 2010, 5.2.
- RUSZKOWSKI, M., et al. The landscape of cytokinin binding by a plant nodulin. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2013, 69.12: 2365-2380.
- SAHASRABUDHE, K. S., et al. Expression of the antimicrobial peptide, human  $\beta$ -defensin 1, in duct cells of minor salivary glands and detection in saliva. *Journal of dental research*, 2000, 79.9: 1669-1674.

- SAIKI, Randall K., et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988, 239.4839: 487-491.
- SALLÉS, Fernando J.; STRICKLAND, Sidney. Analysis of poly (A) tail lengths by PCR: the PAT assay. In: *RNA-Protein Interaction Protocols*. Humana Press, 1999. p. 441-448.
- SALVI, Giovanni; DE LOS RIOS, Paolo; VENDRUSCOLO, Michele. Effective interactions between chaotropic agents and proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2005, 61.3: 492-499.
- SAMBROOK, Joseph; RUSSELL, David W. Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006, 2006.1: pdb. prot4455. (Sambrook & Russel et al., 2006)
- SANCHO, Ana I., et al. Effect of postharvest storage on the expression of the apple allergen Mal d 1. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2006, 54.16: 5917-5923.
- SANCHO, Ana I., et al. Maturity and storage influence on the apple (*Malus domestica*) allergen Mal d 3, a nonspecific lipid transfer protein. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2006, 54.14: 5098-5104.
- SANSAVINI, Silvano, et al. 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*, 2004, 12.Spec. ed. 2: 13-52.
- SAVAZZINI, Federica, et al. Immunological characterization of recombinant Mal d 1, the main allergen from apple (*Malus x domestica* L. Borkh). *Scientia Horticulturae*, 2020, 261: 108926.
- SAVAZZINI, Federica; RICCI, Giampaolo; TARTARINI, Stefano. Apple allergens genomics and biotechnology: Unravelling the determinants of apple allergenicity. In: *Applied Plant Genomics and Biotechnology*. Woodhead Publishing, 2015. p. 35-54.
- SELLNER, L. N.; COELEN, R. J.; MACKENZIE, J. S. Reverse transcriptase inhibits Taq polymerase activity. *Nucleic acids research*, 1992, 20.7: 1487-1490.
- SENDER, Ron; FUCHS, Shai; MILO, Ron. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS biology*, 2016, 14.8: e1002533.
- SÉNÉCHAL, Hélène, et al. A new allergen family involved in pollen food-associated syndrome: Snakin/gibberellin-regulated proteins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2018, 141.1: 411-414. e4.
- SENGHOR, Bruno, et al. Gut microbiota diversity according to dietary habits and geographical provenance. *Human Microbiome Journal*, 2018, 7: 1-9.
- SEONG, Seung-Yong; MATZINGER, Polly. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 2004, 4.6: 469-478.

- SEUTTER VON LOETZEN, Christian, et al. Ligand recognition of the major birch pollen allergen bet v 1 is isoform dependent. *PloS one*, 2015, 10.6: e0128677.
- SHI, Geng-Xian, et al. RGS13 regulates germinal center B lymphocytes responsiveness to CXC chemokine ligand (CXCL) 12 and CXCL13. *The Journal of Immunology*, 2002, 169.5: 2507-2515.
- SCHMITTGEN, Thomas D.; LIVAK, Kenneth J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. *Nature protocols*, 2008, 3.6: 1101. (Schmittgen & Livak, 2008).
- SCHNEIDERBAUER, Alois; SANDERMANN JR, Heinrich; ERNST, Dieter. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds. *Analytical Biochemistry*, 1991, 197.1: 91-95. (Schneiderbauer et al., 1991)
- SCHÖLL, Isabella, et al. Dimerization of the major birch pollen allergen Bet v 1 is important for its in vivo IgE-cross-linking potential in mice. *The Journal of Immunology*, 2005, 175.10: 6645-6650.
- SICHERER, Scott H. Food allergy: when and how to perform oral food challenges. *Pediatric Allergy and Immunology*, 1999, 10.4: 226-234.
- SILVA, Gustavo Monteiro; VOGEL, Christine. Quantifying gene expression: the importance of being subtle. *Molecular systems biology*, 2016, 12.10: 885.
- SILVA, Gustavo Monteiro; VOGEL, Christine. Quantifying gene expression: the importance of being subtle. *Molecular systems biology*, 2016, 12.10: 885.
- SILVERSTEIN, Arthur M. Anti-antibodies and anti-idiotypic immunoregulation, 1899–1904: the inexorable logic of Paul Ehrlich. *Cellular immunology*, 1986, 99.2: 507-522.
- SIRAGANIAN, Reuben P.; HAZARD, Kimberley A. Mechanisms of mouse mast cell activation and inactivation for IgE-mediated histamine release. *The Journal of Immunology*, 1979, 122.5: 1719-1725.
- SMITH, Peter K., et al. The false alarm hypothesis: Food allergy is associated with high dietary advanced glycation end-products and proglycating dietary sugars that mimic alarmins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2017, 139.2: 429-437.
- SON, D. Y., et al. Pollen-related food allergy: cloning and immunological analysis of isoforms and mutants of Mal d 1, the major apple allergen, and Bet v 1, the major birch pollen allergen. *European Journal of Nutrition*, 1999, 38.4: 201-215.
- SOROOSH, Pejman; DOHERTY, Taylor A. Th9 and allergic disease. *Immunology*, 2009, 127.4: 450-458.
- SOUNDARARAJAN, Prabhakaran; WON, So Youn; KIM, Jung Sun. Insight on Rosaceae Family with Genome Sequencing and Functional Genomics Perspective. *BioMed research international*, 2019, 2019.

STAHLBERG, Anders, et al. Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clinical chemistry*, 2004, 50.3: 509-515.

STEPHEN-VICTOR, Emmanuel; CHATILA, Talal A. Regulation of oral immune tolerance by the microbiome in food allergy. *Current opinion in immunology*, 2019, 60: 141-147.

STRACHAN, David P. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ: British Medical Journal*, 1989, 299.6710: 1259.

SUGITA, Kazunari, et al. Type 2 innate lymphoid cells disrupt bronchial epithelial barrier integrity by targeting tight junctions through IL-13 in asthmatic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2018, 141.1: 300-310. E11.

SUKOVÁ, I. Polyfenoly v ovoci a zelenině. Internetový portál bezpečnosti potravin - [online]. Copyright © 2018 [cit. 17.07.2020]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/polyfenoly-v-ovoci-a-zelenine.aspx>

SUN, Jie, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2002, 50.25: 7449-7454.

SUNDARAM, Venkat Krishnan, et al. Optimal use of statistical methods to validate reference gene stability in longitudinal studies. *PloS one*, 2019, 14.7: e0219440.

SUPHIOGLU, Cenk. Thunderstorm asthma due to grass pollen. *International archives of allergy and immunology*, 1998, 116.4: 253-260.

SUSLOV, Oleg; STEINDLER, Dennis A. PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency. *Nucleic acids research*, 2005, 33.20: e181-e181.

SUSLOV, Oleg; STEINDLER, Dennis A. PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency. *Nucleic acids research*, 2005, 33.20: e181-e181.

SWIFT, ELAINE E. VAUGHAN, WILLEM M. DE VOS, Simon. Quorum sensing within the gut ecosystem. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2000, 12.2: 81-92.

SWOBODA, Ines, et al. Bet v 1 proteins, the major birch pollen allergens and members of a family of conserved pathogenesis-related proteins, show ribonuclease activity in vitro. *Physiologia Plantarum*, 1996, 96.3: 433-438.

SZAMOS, J., et al. Purification of natural Mal d 1 and Mal d 2 allergens and monitoring of their expression levels during ripening in Golden Delicious apple. *Food research international*, 2011, 44.9: 2674-2678.

TÁBORSKÁ, Anna. Vliv odrůdy a skladování plodů na expresi izoalergenů Mal d 1 ve slupce a dužnině jablek Prague, 2018. [MSc. Thesis]. Czech University of Life Sciences Prague. Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl.

- TACHDJIAN, Raffi, et al. In vivo regulation of the allergic response by the IL-4 receptor  $\alpha$  chain immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010, 125.5: 1128-1136. e8.
- TAKETOMI, Ernesto Akio, et al. Pollen allergic disease: pollens and its major allergens. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 2006, 72.4: 562-567.
- TETTAMANTI, L., et al. IL-33 mediates allergy through mast cell activation: potential inhibitory effect of certain cytokines. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, 2018, 32.5: 1061-1065.
- THOMAS, Carissa M.; VERSALOVIC, James. Probiotics-host communication: modulation of signaling pathways in the intestine. *Gut microbes*, 2010, 1.3: 148-163.
- THOMPSON, Matthew D., et al. In vitro measures used to predict anticancer activity of apple cultivars and their comparison to outcomes from a rat model of experimentally induced breast cancer. *Nutrition and cancer*, 2009, 61.4: 510-517.
- TIAN, Wei, et al. Comparison of Methods for Total RNA Extraction from Apple Tissues [J]. *Journal of Qingdao Agricultural University (Natural Science)*, 2010, 2: 011.
- TONG, Zhaoguo, et al. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC molecular biology*, 2009, 10.1: 71.
- TORGERSON, Troy R., et al. Severe food allergy as a variant of IPEX syndrome caused by a deletion in a noncoding region of the FOXP3 gene. *Gastroenterology*, 2007, 132.5: 1705-1717.
- TURLAND, Nick J., et al. International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Shenzhen Code) adopted by the Nineteenth International Botanical Congress Shenzhen, China, July 2017. Koeltz Botanical Books, 2018.
- UEHARA, Motoharu, et al. Sequential IgE epitope analysis of a birch pollen allergen (Bet v1) and an apple allergen (Mal d1). *Allergology International*, 2001, 50.1: 57-62.
- VAFA, Mohammad Reza, et al. Effects of apple consumption on lipid profile of hyperlipidemic and overweight men. *International journal of preventive medicine*, 2011, 2.2: 94.
- VALENTA, Rudolf, et al. Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *The Journal of experimental medicine*, 1992, 175.2: 377-385.
- VAN DER VELDE, Jantina L., et al. Food allergy-related quality of life after double-blind, placebo-controlled food challenges in adults, adolescents, and children. *Journal of allergy and clinical immunology*, 2012, 130.5: 1136-1143. e2.
- VAN HAGE, Marianne; HAMSTEN, Carl; VALENTA, Rudolf. ImmunoCAP assays: Pros and cons in allergology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2017, 140.4: 974-977.
- VAN LOON, Leendert C.; REP, Martijn; PIETERSE, Corné MJ. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2006, 44: 135-162.

- VANDESOMPELE, Jo, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 2002, 3.7: research0034. 1.
- VANEK-KREBITZ, M. Hoffmann-Sommergruber K, Laimer da C amara Machado M, et al. Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*), and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 2.14: 538-551.
- VEGRO, Mara, et al. (těž savazzini) Old apple (*Malus domestica* L. Borkh) varieties with hypoallergenic properties: an integrated approach for studying apple allergenicity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2016, 64.48: 9224-9236.
- VELASCO, Riccardo, et al. The genome of the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh.). *Nature genetics*, 2010, 42.10: 833-839.
- VILLALBA, Ana; COLL, Olga; GEBAUER, Fátima. Cytoplasmic polyadenylation and translational control. *Current opinion in genetics & development*, 2011, 21.4: 452-457.
- VILLANI, Alexandra-Chloé, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science*, 2017, 356.6335.
- VLIEG-BOERSTRA, B. J., et al. Identification of low allergenic apple cultivars using skin prick tests and oral food challenges. *Allergy*, 2011, 66.4: 491-498.
- VRTALA, Susanne, et al. Genetic engineering of a hypoallergenic trimer of the major birch pollen allergen Bet v. *The FASEB Journal*, 2001, 15.11: 2045-2047.
- WALLNER, Michael, et al. Reshaping the Bet v 1 fold modulates TH polarization. *Journal of allergy and clinical immunology*, 2011, 127.6: 1571-1578. e9.
- WANG Na, WOLF Joost, Et al.;Towards sustainable intensification of apple production in China—Yield gaps and nutrient use efficiency in apple farming systems. *Journal of integrative agriculture* 2016, 15.4: 716-725.
- WANG, Shuyi, et al. Transgenic rice seeds accumulating recombinant hypoallergenic birch pollen allergen Bet v 1 generate giant protein bodies. *Plant and cell physiology*, 2013, 54.6: 917-933.
- WAŚIK, Magdalena, et al. Delayed-Type Hypersensitivity Underlying Casein Allergy Is Suppressed by Extracellular Vesicles Carrying miRNA-150. *Nutrients*, 2019, 11.4: 907.
- WEBER, Constanze A., et al. T cell epitope: friend or foe? Immunogenicity of biologics in context. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, 61.11: 965-976.
- WEINBERG, Eugene G. The WAO white book on allergy 2011-2012. *Current Allergy & Clinical Immunology*, 2011, 24.3: 156-157
- WHO | Tisková zpráva. WHO | Světová zdravotnická organizace [online]. Copyright © [cit. 02.06.2020]. Dostupné z:[https://www.who.int/whr/1996/media\\_centre/press\\_release/en/](https://www.who.int/whr/1996/media_centre/press_release/en/)

- WIJESINHA-BETTONI, Ramani, et al. The structural characteristics of nonspecific lipid transfer proteins explain their resistance to gastroduodenal proteolysis. *Biochemistry*, 2010, 49.10: 2130-2139.
- WONG, Marisa L.; MEDRANO, Juan F. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 2005, 39.1: 75-85.
- WU, Rui-Qing, et al. The mucosal immune system in the oral cavity—an orchestra of T cell diversity. *International journal of oral science*, 2014, 6.3: 125-132.
- WÜTHRICH, Brunello. History of food allergy. In: *History of Allergy*. Karger Publishers, 2014. p. 109-119.
- YAGAMI, Akiko; EBISAWA, Motohiro. New findings, pathophysiology, and antigen analysis in pollen-food allergy syndrome. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 2019, 19.3: 218-223.
- YAN Zhen, ZHENG Li-jing, et al.; Evaluation indices of sour flavor for apple fruit and grading standards. *Journal of integrative agriculture* 2018, 17.5: 994-1002.
- YANG, B. H., et al. Foxp3<sup>+</sup> T cells expressing ROR $\gamma$ t represent a stable regulatory T-cell effector lineage with enhanced suppressive capacity during intestinal inflammation. *Mucosal immunology*, 2016, 9.2: 444-457.
- YANG, XiaoTang, et al. Allergen related gene expression in apple fruit is differentially controlled by ethylene during ripening. *Postharvest biology and technology*, 2012, 63.1: 40-49.
- YUN, J.; KATELARIS, C. H. Food allergy in adolescents and adults. *Internal medicine journal*, 2009, 39.7: 475-478.
- ZABORSKY, Nadja, et al. Antigen aggregation decides the fate of the allergic immune response. *The journal of immunology*, 2010, 184.2: 725-735.
- ZEITZ, M., et al. Phenotype and function of lamina propria T lymphocytes. *Immunologic research*, 1991, 10.3-4: 199.
- ZHANG, Liyi, et al. A high-quality apple genome assembly reveals the association of a retrotransposon and red fruit colour. *Nature communications*, 2019, 10.1: 1-13.
- ZHANG, Shoudong; SUN, Li; KRAGLER, Friedrich. The phloem-delivered RNA pool contains small noncoding RNAs and interferes with translation. *Plant physiology*, 2009, 150.1: 378-387.
- ZHANG, Shu-Dong, et al. Diversification of Rosaceae since the Late Cretaceous based on plastid phylogenomics. *New Phytologist*, 2017, 214.3: 1355-1367.
- ZHU, Lifang, et al. Validation of reference genes for qRT-PCR analysis in peel and flesh of six apple cultivars (*Malus domestica*) at diverse stages of fruit development. *Scientia Horticulturae*, 2019, 244: 165-171.



ZIPPER, Hubert, et al. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic acids research*, 2004, 32.12: e103-e103.

ZUNOVÁ, Tereza. *Expres isoalergenů Mal d 1 ve slupce a dužnině jablek u plodů získaných z obchodních řetězců v České republice*. Prague, 2018. [MSc. Thesis]. Czech University of Life Sciences Prague. Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl.

ŽIAROVSKÁ, Jana, et al. RESTRICTION POLYMORPHISM OF Mal d 1 ALLERGEN PROMOTOR IN APPLE VARIETIES. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2019, 2019: 1217-1219.