

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie

CHARAKTERIZACE A IDENTIFIKACE
PŠENIČNÝCH ALERGENŮ Z POTRAVIN
OBSAHUJÍCÍCH PŠENICI

Characterization and Identification of Wheat Allergens
from Foodstuffs Containing Wheat

Diplomová práce

Studijního oboru imunologie

Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i.

Sektor imunologie a gnotobiologie

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitelky doc. RNDr. Ludmily Tučkové, DrSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

V Praze dne 3. května 2010.

Na prvním místě bych chtěl poděkovat své školitelce docentce RNDr. Ludmile Tučkové, DrSc. za její odborné vedení mé diplomové práce, ale i za její cenné rady a pomoc při řešení zadaných úkolů.

Dále bych chtěl poděkovat svým spolupracovníkům RNDr. Petru Šotkovskému, MUDr. Andreje Kainarové a Mgr. Anetě Pekárikové za praktickou pomoc při řešení své diplomové práce a za vytvoření příjemného pracovního prostředí v laboratoři.

V neposlední řadě bych také rád poděkoval své nejbližší rodině, která mě podporovala během celého mého studia.

Obsah

Seznam použitých zkratk	6
Abstrakt	7
1 Úvod	8
2 Přehled literatury	10
2.1 Alergie	10
2.2 Orální tolerance a její význam v prevenci alergií	11
2.3 Alergie a kojení	13
2.4 Alergie a „Hygienická hypotéza“	13
2.5 Diagnostika alergie	14
2.6 Léčba alergie	16
2.7 Potravinová alergie a pšenice	17
2.7.1 Charakterizace potravinové alergie	17
2.7.2 Vliv různých procesů zpracování a trávicích enzymů na stabilitu potravinových alergenů	18
2.7.3 Pšenice jako alergen	19
2.7.4 Způsoby projevů pšeničné alergie	20
2.8 Křížová reaktivita	23
2.9 Proteiny z obilok pšenice a jejich rozdělení	23
2.10 Pšeničné alergeny ze syrové mouky	25
3 Metody a materiál	27
3.1 Vzorky hotových produktů obsahujících pšenici	27
3.2 Pacientská séra	27
3.3 Příprava pšeničných extraktů	28
3.3.1 Extrakce v PBS pufru	28
3.3.2 Následná extrakce v SDS pufru	28
3.4 Stanovení koncentrace proteinů v extraktech	29

3.5	Zakoncentrování proteinů pomocí acetonu.....	30
3.6	Štěpení vzorků pepsinem	30
3.7	Štěpení vzorků pankreatinem	31
3.8	Jednorozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.....	31
3.9	Dvourozměrná elektroforéza	33
3.10	Barvení gelu pomocí Coomassie® Brilliant Blue R-250, odbarvování, uchovávání a případné sušení gelu.....	36
3.11	Western blot.....	37
3.12	Příprava vzorků proteinů pro hmotnostní spektrometrii.....	38
3.13	Použité chemikálie	40
3.14	Použité kity, standardy a protilátky	40
3.15	Použité přístroje a software.....	41
4	Výsledky.....	43
4.1	Vliv tepelného zpracování na IgE reaktivitu bílkovin v pšeničných produktech.....	43
4.1.1	Příprava extraktů a stanovení koncentrace proteinů.....	43
4.1.2	Analýza extrahovaných proteinů v pšeničných produktech	44
4.1.3	Rozdělení patientských sér podle IgE reaktivity s pšeničnými proteiny	48
4.2	Vliv enzymatického opracování na alergenicitu pšeničných produktů.....	52
4.3	Identifikace IgE vázajících pšeničných proteinů metodami hmotnostní spektrometrie.....	55
4.3.1	Příprava pšeničných proteinů pro hmotnostní spektrometrii z jednorozměrné elektroforézy	55
4.3.2	Příprava pšeničných proteinů pro hmotnostní spektrometrii z dvourozměrné elektroforézy	56
4.3.3	Proteiny identifikované hmotnostní spektrometrii.....	59
5	Diskuze	61
6	Závěr.....	64
	Použitá literatura	66

Seznam použitých zkratek

APC	antigen prezentující buňka
APS	persíran amonný
APT	epikutánní atopický test (z anglického Atopic Patch Test)
BAT	test aktivace bazofilů (z anglického Basophil Activation Test)
DTT	dithiotreitol
ECL	chemiluminiscence
GIT	gastrointestinální trakt
IgA	imunoglobulin A
IgE	imunoglobulin E
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PBS	fosfáty pufovaný fyziologický roztok (z anglického Phosphate Buffered Saline)
PBS-T	Tween ředěný v PBS
RPM	počet otáček za minutu (z anglického Round Per Minut)
RTS-D	rehydratační roztok
SDS	dodecylsulfát sodný
SPT	kožní „prick“ test (z anglického Skin Prick Test)
TCA	trichloroctová kyselina
TCEP	trikarboxylethylfosfin
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin
T _{H1}	pomocné T lymfocyty typu 1
T _{H2}	pomocné T lymfocyty typu 2
T _{reg}	regulační T lymfocyty
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	kyselinou chlorovodíkovou upravený roztok Trisu

Abstrakt

Běžně přijímaná potrava může za specifických podmínek u některých lidí vyvolat nežádoucí klinické příznaky způsobené přecitlivělostí na určitou složku potravy. Tato nežádoucí reakce na přijatou potravu se nazývá potravinová alergie a v posledních letech má ve světové populaci stoupající tendenci, přičemž postihuje zejména děti, ale i dospělé. Významnou úlohu v potravinové alergii má pšenice a potraviny, které obsahují pšeničné složky. Pšeničné alergeny z mouky už jsou docela dobře známi, avšak člověk přijímá pšenici v potravě v upravené podobě (tepelně upravené potraviny), čím se může alergenicita alergenů vytratit nebo také zvýšit. Kromě toho, enzymy v trávicí soustavě člověka mohou mít také vliv na alergenicitu pšeničných alergenů. Cílem této práce je charakterizovat pšeničné alergeny přítomné v tepelně upravených potravinách a jejich změny po působení enzymů přítomných v trávicí soustavě člověka. Charakterizace těchto pozměněných a nově alergenů může napomoci k nalezení lepších diagnostických přístupů, zvýšit specifitu detekce IgE protilátek, umožnit cílenou léčbu pacientů.

In some cases, ordinarily accepted food can evoke harmful clinical symptoms which are brought on by sensitivity on specific component of foodstuff. This harmful reaction on accepted food is called food allergy and it tends to go up in the world's population in last years. The food allergy affects especially children as well as adults. The important role in the food allergy plays wheat and foodstuff containing components of wheat. Wheat allergens from flour is already well-known, but man accepts wheat in food in the treated form (heat treated food) what can decrease or increase allergenicity. Moreover, enzymes presented in gastrointestinal tract of man can influence allergenicity of wheat allergens too. The goal of this thesis is characterization of allergens presented in heat treated wheat foodstuff and in wheat foodstuff digested by enzymes in gastrointestinal tract of man. Characterization of these altered and newly produced allergens can help find better diagnostic techniques, increase specificity of detection of IgE antibodies, enable pointed therapy of allergic patients or find and apply new and suitable diet.

1 Úvod

Běžně přijímaná potrava nevyvolává u zdravých lidí imunitní reakci v trávicím traktu díky ustálení orální tolerance. Za určitých podmínek vznikají u některých lidí nežádoucí klinické příznaky způsobené přecitlivělostí (tzv. hypersenzitivitou) na různé složky potravy. Tato nežádoucí reakce na přijatou potravu se nazývá potravinová alergie, která má v posledních třech desetiletích ve světové populaci rostoucí tendenci a postihuje zejména děti a v menší míře i dospělí. Z tohoto důvodu je důležité dělat intenzivní výzkum v oblasti stanovení a charakterizace hlavních imunogenních složek potravy, které způsobují potravinovou alergii.

Cílem předkládané diplomové práce je charakterizace alergenů v pšeničné mouce a ve výrobcích z ní (mouka, chléb, rohlík a jejich různá úprava), které způsobují vznik IgE odpovědi pacienta na tento druh potravin. V dosavadní diagnostice alergie na pšenici se běžně používá solný extrakt pšeničné mouky. Nízká specifita této detekce může být způsobena i tím, že jako u jiných potravinových alergenů byl popsán vliv tepelného zpracování potravin a následného působení enzymů v zažívacím traktu na množství a specifitu IgE protilátek. Diplomová práce se zaměřuje na možný vliv enzymatické a tepelné úpravy při přípravě a zpracování různých výrobků z pšenice (mouka, těsto, samotný chléb a rohlík) na zvýšení, resp. snížení alergenicity (vznik nových antigenních epitopů) produktů ve srovnání se samotnou pšeničnou moukou.

Právě stanovení a charakterizace nových alergenů může u atopických pacientů napomoci zvýšit specifitu detekce IgE protilátek a umožnit cílenou léčbu pacientů, popřípadě nalézt a aplikovat novou vhodnější dietu.

Diplomová práce má stanovené tyto cíle:

1. připravit extrakty z výchozí pšeničné mouky, těsta a samotných pšeničných produktů a stanovit v nich koncentraci proteinů,
2. enzymaticky naštěpit vybrané extrakty pomocí pepsinu a pankreatinu,
3. elektroforeticky rozdělit pšeničné bílkoviny z jednotlivých připravených extraktů a zjistit jejich přibližnou molekulovou hmotnost,

4. charakterizovat pšeničné bílkoviny reagující s IgE protilátkami ze sér jednotlivých alergických pacientů,
5. určit pšeničné bílkoviny vázající IgE pacientů pomocí hmotnostní spektrometrie,
6. zhodnotit vliv tepelného a enzymatického opracování na charakter a množství IgE vázajících pšeničných alergenů.

2 Přehled literatury

2.1 Alergie

Člověk může na některé složky životního prostředí ve svém okolí, se kterými se dostane do styku prostřednictvím pokožky nebo sliznice dýchacího, resp. gastrointestinálního traktu, reagovat přehnanou (hypersenzitivní) alergickou reakcí (JOHANSSON et al. 2001). Osoba, která takto reaguje i na malé množství v podstatě neškodných látek (antigenů) a má sklon k tvorbě IgE protilátek proti těmto látkám, se označuje jako atopik. Antigen vyvolávající alergickou reakci se označuje jako alergen a je definován, jako látka schopná vyvolat mohutnou odpověď pomocných T_H2 lymfocytů, která směřuje k tvorbě IgE protilátek. Tyto alergeny mohou pocházet z různých přírodních zdrojů, jako jsou rostliny (stromy, traviny), houby, hmyz, roztoči, ale i větší zvířata (pes, kočka, kráva). Alergeny se liší svojí strukturou a molekulovou hmotností, ve většině případů jsou to bílkoviny (WILLS-KARP et al. 2010).

Typická alergická reakce vzniká mechanismy prvního (anafylaktického) a čtvrtého (opožděného) typu imunopatologické reakce podle Coombsa a Gella. Přehled typů imunopatologických (hypersenzitivních) reakcí je shrnutý v tabulce 2.1. Jak je patrné z tabulky 2.1, alergická reakce může být zprostředkována buď protilátkami typu IgE nebo i buněčně, a to T_H1 lymfocyty a makrofágy (FERENČÍK et al. 2005).

Při alergické reakci zprostředkované protilátkami se po vystavení organismu určitému alergenu, na který je osoba alergická, vytvářejí protilátky IgE. U zdravých osob jsou IgE protilátky součástí imunitní odpovědi na parazitární infekci (MILLS a BREITENEDER 2005). U senzitivních jedinců se IgE protilátky, vyprodukované při prvním kontaktu organismu s alergenem, naváží na vysoko afinitní $Fc\epsilon RII$ receptory přítomné na žírných buňkách a bazofilech. Tomuto ději se říká senzibilizace. Při druhém setkání organismu se stejným alergenem dojde k navázání alergenu na IgE protilátky navázané na $Fc\epsilon RII$ receptory, čímž dojde k vzájemnému přiblížení těchto receptorů (jejich prokřížení), následkem čeho nastává buněčná signalizace. Jejím důsledkem dojde v časně fázi imunitní odpovědi (během několika minut) k degranulaci buněčných váčků a k uvolnění mediátorů (hl. histaminu a heparinu). V druhé, opožděné

fázi imunitní odpovědi (nastupuje i po několika hodinách), se spouští metabolismus kyseliny arachidonové, následkem toho se uvolňují produkty jako prostaglandiny, leukotrieny apod., což napomáhá k dalšímu rozvoji alergické reakce.

Při buněčně zprostředkované alergické reakci dochází ke vzniku zánětu, na kterém se podílejí specifické T_H1 lymfocyty a makrofágy, které se vzájemně ovlivňují. V tomto případě nedochází k tvorbě protilátek a tato reakce se označuje i jako přecitlivělost oddáleného typu (ABBAS et al. 2007; MURPHY et al. 2008; PAUL 2008).

Tabulka 2.1 Přehled typů imunopatologických reakcí (FERENČÍK et al. 2005).

Typ přecitlivělosti	Vyvolávající faktor	Zprostředkující faktor	Choroby
I. anafylaktický (časný)	alergen	protilátky IgE	alergické
II. cytotoxický	nerozpustný autoantigen	protilátky IgG	autoimunitní
III. imunokomplexový	rozpustné cizí nebo vlastní antigeny	protilátky IgG, IgM, popř. IgA	Imunokomplexové (autoimunitní nebo alergické)
IV. opožděný	antigen nebo alergen	buňky (hl. T _H 1 lymfocyty a makrofágy)	autoimunitní, alergické
V. stimulační, resp. inhibiční	antigen v buněčných receptorech	protilátky IgG, IgM	autoimunitní

2.2 Orální tolerance a její význam v prevenci alergií

Významnou úlohu v předcházení vzniku alergie sehraávají mukózní sliznice dýchacího a gastrointestinálního traktu (GIT) (MACDONALD a MONTELEONE 2005). U zdravého organismu se ve střevní tkáni vytváří tzv. orální tolerance, při které jsou zralé lymfocyty utlumeny po setkání s buňkou prezentující antigen (APC), která předtím zpracovala antigen právě ze slizničních povrchů (STROBEL a MOWAT 1998). Tato specifická tolerance běžných alergenů chrání organismus před vznikem alergického onemocnění. Na vytvoření této tolerance mají vliv jak imunologické tak i genetické

faktory, schopné udržet buňky odpovídající alergickou reakci v anergii anebo je odstranit navozením apoptotické smrti. Při potlačení vzniku alergií a astmatu hrají významnou úlohu subpopulace regulačních T lymfocytů (T_{reg}), které aktivně tlumí antigenně specifickou odpověď lymfocytů (produkci IL-10 a TGF- β), resp. vedou k jejich odstranění (UMETSU a DEKRUYFF 2006).

Slizniční povrch GIT je tvořený jednou vrstvou epitelálních buněk, pod kterou se nachází volná pojivová tkáň, extracelulární matrix, osídlená lymfocyty. Tkáň GIT je denně vystavená působení řady bakterií a obrovské škále různých strávených i nestrávených bílkovin potravy. Kromě toho, střevní epitelální vrstva není vždy úplně nepropustná a nechrání organismus před prostupem bílkovin a peptidů z potravy a bakteriálních komponent. Antigeny mohou procházet přes těsné spoje, například v oblasti vrcholků klků, kde jsou epitelální buňky odlupovány (NEUTRA et al. 2001). Významnou úlohu mají v GIT M buňky, které transcytózou transportují makromolekuly (i alergeny) z lumen střeva do supepitelální tkáně, kde jsou takto transportovány molekuly zpracovány antigen prezentujícími buňkami (APC) (ABBAS et al. 2007). A navíc, dendritické buňky jsou jako APC buňky schopné vystrkovat panožky mezi střevními epitelálními buňkami bez porušení těsných spojů a tak mohou zachytit a zpracovat antigeny přímo z lumen střeva (RESCIGNO et al. 2001; NIESS et al. 2005). APC buňkami po zpracování antigenu napomáhají aktivovat T_{reg} lymfocyty, co následně vede k utlumení imunitní odpovědi vůči těmto látkám a navození orální tolerance (BURKS et al. 2008). Významnou úlohu při stimulaci vývoje imunitního systému, hlavně u novorozenců mají komenzální bakterie, které kromě metabolického zpracování potravy, mají také stimulační vliv na vývoj imunitních odpovědí. Tato lokální, resp. systémová imunitní odpověď je později utlumena indukci orální tolerance (TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ et al. 2002). Na druhou stranu, patogenní mikroorganismy nebo poškozené střevo může zvyšovat reaktivitu mastocytů vůči alergenům. Vysvětluje to, proč střetnutí zdravého jedince s bakteriemi vede k obraně před vznikem alergie („hygienická hypotéza“), zatímco střetnutí alergického jedince s bakteriemi zhoršuje alergickou odpověď na alergen (BISCHOFF a KRÄMER 2007; ABECK a MEMPEL 1998).

2.3 Alergie a kojení

Už dlouho se zkoumá vliv kojení mateřským mlékem na správný vývoj imunitního systému dítěte. V posledních letech se hovoří i o ochranném účinku kojení před vznikem alergických onemocnění. Některé studie dokazují, že kojení snižuje riziko vzniku bronchitidy u atopických kojenců (WILSON et al. 1998). Zabránění vývoje alergického onemocnění kojením dítěte je pravděpodobně možné díky vlivu složek mateřského mléka, případně omezením příjmu vysokých dávek bílkovin z kravského mléka u kojenců, kteří jsou, resp. byli často kravským mlékem dokrmováni (MURARO et al. 2004). Časný začátek krmení kojenců kravským mlékem má velký vliv na vznik atopického ekzému u dětí (WILSON et al. 1998). Naopak, dlouhodobé kojení by mělo bránit rozvoji tohoto onemocnění (KULL et al. 2005). Jiné studie však toto tvrzení vylučují a ukazují, že kojení mateřským mlékem a dokonce i prodloužené kojení, kterým se vyloučí příjem kravského mléka, pravděpodobně přispívá ke vzniku atopického ekzému hlavně u neatopických dětí (MIYAKE et al. 2003; LOWE et al. 2006; MIYAKE et al. 2007). I když neexistují jednoznačné důkazy o výhodách, resp. nevýhodách kojení, obecně se dá říci, že mateřské mléko obsahuje důležité cytokiny, a celou řadu jiných látek, které pomáhají dítěti při vývoji jeho imunitního systému a orální toleranci (KALLIOMÄKI et al. 1999; BÖTTCHER et al. 2000; ODDY a ROSALES 2010). Pod vlivem těchto cytokinů a dalších látek se vytváří protilátky IgA třídy, které přispívají k mechanismům vedoucím k osidlování střeva komenzálními bakteriemi a k maturaci imunitního systému (O'FARRELLY 1998; KUKKONEN et al. 2010).

2.4 Alergie a „Hygienická hypotéza“

Již dlouhou dobu se spojují různé vlivy životního prostředí s rozvojem astmatu a alergií. Je obecně známo, že za posledních dvacet až třicet let se dramaticky zvýšilo rozšíření těchto onemocnění, zejména ve vyspělých zemích. Souběžně s těmito jevy se snížil dopad některých infekčních onemocnění. Jejich výskyt výrazně snižoval riziko vývoje

astmatu a alergií u lidí, tím, že pozitivně zvyšoval vývoj obranné imunity i vůči různým alergenům (UMETSU a DEKRUYFF 2006).

Toto vedlo k vytvoření tzv. „Hygienické hypotézy“, která nám říká, že zvýšené hygienické návyky společně se zvýšenou zdravotní péčí využívající vakcíny a antibiotika, snižují výskyt infekčních onemocnění, která by mohla stimulovat imunitní systém a tím výrazně snižovat výskyt astmatu a různých alergií (STRACHAN 1989).

Hygienickou hypotézu potvrzuje také jev, že u rodin, ve kterých je více dětí, je menší riziko vzniku astmatu ve vyšším věku (VON MUTIUS et al. 1994). Návštěva předškolských zařízení má podobný vliv jako větší počet sourozenců (BALL et al. 2000). Riziko astmatu a alergické rinitidy se snižuje u dětí, které často přicházejí do styku s hospodářskými zvířaty, protože mají větší možnost střetnout se s různými bakteriemi a jejich toxiny (RIEDLER et al. 2001; EDUARD et al. 2004). Obdobně kontakt s domácími „mazlíčky“ (pes, kočka), umožňuje časný styk dětí s různými alergeny, a může následně snižovat výskyt astmatu a alergií u těchto dětí (OWNBY et al. 2002). Jiné studie dokazují, že vystavení dítěte v raném věku antibiotikům vede k poklesu infekčních onemocnění a ke zvýšení vzniku alergií (MCKEEVER et al. 2002).

Významnou úlohu v prevenci vzniku alergií mohou mít i bakterie životního prostředí a hlavně komenzální bakterie v mikrofloře GIT, jejichž složky mohou aktivovat imunitní systém prostřednictvím signalizace přes Toll-like receptory (SUDO et al. 1997; PRIOULT a NAGLER-ANDERSON 2005).

2.5 Diagnostika alergie

V praxi nejčastěji využívaným *in vivo* vyšetřením u pacientů s alergií, vyvolanou IgE protilátkami, je kožní „prick“ test (SPT). Při tomto testu se aplikuje tenkou jehlou malé množství alergenu do kůže. Je-li testovaný pacient citlivý, vzniká velká červená skvrna o průměru 3 mm, která potvrzuje reakci na alergen. Pro srovnání se v SPT testu používá negativní kontrola, zpravidla fyziologický roztok, a pozitivní kontrola histamin. Problémem SPT testu je, že uspokojivých výsledků se dosahuje jen u negativního testování, kdy jedinec na vpíchnutou látku nereaguje (předpovědní hodnota je 95

procentní). V případě pozitivních testů, kdy se u testovaného pacienta objeví zčervenání v místě vpichu, může být předpovědní hodnota i nižší než 50 procent (SAMPSON 1999). Z toho důvodu není SPT testování vždy spolehlivou diagnostickou metodou (nedá se použít při kožních nemocech, jako je třeba atopická dermatitida). Vysvětlováno je to tím, že při testování alergie na pšenici se používají komerční směsi ve vodě rozpustných proteinů s nedostatečným obsahem složek (např. gliadinu), které jsou ve vodě nerozpustné. Navíc zjištěna křížová reaktivita mezi alergeny potravin, které se rozpouští ve vodě, a některých pylů může zvyšovat pozitivitu SPT testů (PALOSUO 2003).

Další diagnostickou metodou je epikutánní atopický test (APT), který slouží hlavně ke diagnostice alergické kontaktní dermatitidy, ale má uplatnění i v diagnostice potravinové alergie u některých dětí s atopickou dermatitidou. Diagnostika pomocí APT spočívá v aplikaci alergenu na kůži zad v podobě kapky (50 μ l) ve Finnových komůrkách na dobu 48 hodin. Následně se náplast s komůrkou odstraní a je kontrolováno zčervenání kůže. Kůže se znovu kontroluje po dalších 24 hodinách, kdy je možné pozorovat pozdní alergickou reakci (DARSOW et al. 1995; HEINEMANN et al. 2002; MEHL et al. 2006).

K častým diagnostickým testům patří tzv. dvojité slepá, placebem kontrolovaná, studie (DBPCFC – Double-Blind, Placebo-Controlled Food Challenge). Tato metoda se označuje i jako „zlatý standard“ v diagnostice potravinových alergií (SAMPSON 2001b; SCIBILIA et al. 2006; WEICHEL et al. 2006b). Při tomto testu se pacientovi podává dávka, ve které alergen může, ale také nemusí být přítomný. Po podání testované látky se sleduje vznik případných příznaků. Je samozřejmé, že v průběhu testování pacient a ani osoba podávající testovanou látku, nevědí, zda je alergen přítomný. Důvodem je vyloučit subjektivní pocity pacienta, kterými je častokrát alergická reakce ovlivněná. Případný negativní výsledek se musí potvrdit tak, že se pacientovi podá známá potravina, která obsahuje alergen a ta nevyvolá alergickou reakci (SAMPSON 1999).

V *in vitro* podmínkách se používají dva testy, které slouží na stanovení specifických IgE protilátek v sérech pacientů. K měření se používá tzv. radioalergosorbentní test (RAST), který se principiálně shoduje s druhou metodou (ELISA). Vysoká hladina specifických IgE protilátek poukazuje až do 95% pravděpodobnost alergické reakce u pacienta, který snědl určitou potravinu (SAMPSON 2001b). Další z *in vitro* diagnostických metod IgE zprostředkované alergické reakce je

test aktivace bazofilů (BAT). Při BAT testování se měří exprese hlavních znaků aktivovaných bazofilů CD63 a CD203c, které se objevují na membráně těchto buněk *de novo* během jejich aktivace. Stanovení BAT se dělá v plné krvi pomocí průtokového cytometru (BOUMIZA et al. 2003; EBERLEIN-KÖNIG et al. 2006).

Použití konvenčních metod (jako například SPT testování) v diagnostice IgE zprostředkované alergické reakce se ukazuje nedostatečné u pacientů alergických na potraviny obsahující pšeničné složky (SIMONATO et al. 2001a).

2.6 Léčba alergie

Když byla pacientovi diagnostikována potravinová alergie, tak je jako jedna z dobře ověřených terapií nejvhodnější přísná eliminační dieta. Tato léčba se zakládá na vyloučení problematického alergenu ve všech jeho formách z potravy pacienta, což často přináší komplikace v způsobu jeho života (LAU 2005).

Dalším způsobem léčby potravinové alergie je podávání léků na základě antihistaminik a kortikosteroidů (HRUBIŠKO et al. 2003). Avšak tyto léky mají častokrát i nežádoucí účinky (TOOGOOD 1998).

Pro léčbu potravinových alergií se zdá být v některých případech výhodné využít alergenové imunoterapie, při které se pacientovi podávají zvyšující se dávky alergenové vakcíny, což nakonec vede k postupnému snižování příznaků alergie po setkání pacienta s tímto alergenem (VALENTA et al. 1999; SAMPSON 2001a; LEUNG et al. 2003).

Novou formou pro diagnostiku mohou být rekombinantní alergeny, které jsou vyrobené na základě znalosti primární struktury (aminokyselinového pořadí) alergenu (VALENTA et al. 2010).

2.7 Potravinová alergie a pšenice

2.7.1 Charakterizace potravinové alergie

Patologická reakce na potraviny se může projevovat u člověka buď jako potravinová nesnášenlivost (intolerance) nebo jako hypersenzitivita (alergie). Potravinová nesnášenlivost je opakovatelná neimunologická reakce, u které se mohou symptomy projevovat ihned po požití potravy anebo až po nějakém čase (MILLS a BREITENEDER 2005; CIANFERONI a SPERGEL 2009). Tento druh nesnášenlivosti potravy může být způsobený buď samotnou potravinou anebo potravinovými přísadami, které mohou mít farmakologické (tyramin ve starých sýrech) a toxické (histamin – jed mořských ryb) vlastnosti (SAMPSON 2003; RAMESH 2008). Potravinová nesnášenlivost patří podle všeho k největšímu procentu negativních reakcí na potraviny. Až 20 % dospělé populace vykazuje nesnášenlivost k určitému druhu potravy, ale mylně se domnívají, že mají na danou potravinu alergii (CHAPEL et al. 2006; SEITZ et al. 2008). Příčinou potravinové nesnášenlivosti mohou být metabolické poruchy nebo se jedná o fyziologickou odpověď na toxickou látku v potravě.

Potravinová alergie je definovaná jako reakce na potravu spojená s imunologickým mechanismem (BJÖRKSTÉN 2001). Podle imunologického mechanismu se alergická reakce na potraviny popisuje jako:

- a) IgE zprostředkovaná, při které se tvoří IgE protilátky a patří k nejlépe popsatelným alergickým reakcím na potraviny,
- b) buněčně zprostředkovaná, při které za imunitní reakci zodpovídá buněčná složka imunitního systému většinou spojená s GIT,
- c) smíšená IgE a buněčně zprostředkovaná (CIANFERONI a SPERGEL 2009).

Potravinová alergie se nejčastěji vyskytuje v prvních letech života (6 procent dětské populace). Přibližně 2,5 procenta novorozenců má v prvním roce života alergii na kravské mléko, ale až 80 procent z nich z této alergie vyroste (SAMPSON 2003). U kojenců je snižena kyselost žaludečných šťáv a povrch střevní sliznice má vysokou prostupnost ve srovnání s dospělými, obě tyto skutečnosti se mohou podílet na větším výskytu potravinové alergie u dětí (EIGENMANN 2009). Zajímavé však je, že kojenci,

kteří trpí potravinovou alergií, mají až dvakrát vyšší šanci vyrůst z alergie než děti, které onemocní alergií ve vyšším věku (BJÖRKSTÉN 2001). Potravinovou alergií jsou nejvíce ohrožené děti, které trpí atopickou dermatitidou. Výskyt potravinové alergie u těchto dětí je v rozmezí 20 až 80 procent podle různých studií, ale průměr je okolo 30 procent (OEHLING et al. 1998; WERFEL a BREUER 2004). U dospělých lidí se potravinová alergie vyskytuje kolem 0,3 procent.

Alergeny způsobující potravinovou alergii mohou být živočišného (kravské mléko, ryby, koryši, vajíčka, atd.) nebo rostlinného (luštěniny, ořechy, obiloviny, ovoce a zelenina) původu a jsou bílkovinné povahy (MILLS a BREITENEDER 2005). Tyto rostlinné a živočišné potravinové alergeny patří do malé rodiny molekul, což ukazuje, že určité vývojově zakonzervované struktury hrají významnou roli v alergických vlastnostech těchto látek (COCHRANE et al. 2009). Je zajímavé, že pacient, který má alergii na jednu potravinu, má častokrát alergii na minimálně ještě jednu jinou potravinu (KANAGAWA et al. 2009).

Potravinová alergie se projevuje jako systémová reakce, ke které dochází během 30 minut od požití potravy, která obsahuje alergen. Tato reakce může vést k život ohrožujícímu anafylaktickému šoku. Často se však objevují lokální symptomy, u kterých jsou hlavními cílovými orgány kůže, respirační cesty a GIT (BURKS et al. 1998; KULIG et al. 1998).

2.7.2 Vliv různých procesů zpracování a trávicích enzymů na stabilitu potravinových alergenů

Různé způsoby zpracování potravin (vaření, pečení, klíčení, fermentace, apod.) mohou výrazně ovlivnit alergickou reakci u pacientů (SATHE et al. 2005; MILLS a MACKIE 2008). Zahřátí ryb při konzervování má výrazný vliv na pokles alergenicity výsledného produktu. Také zahřívání kiwi a následná homogenizace snižuje alergenicitu potravin obsahujících kiwi (FIOCCHI et al. 2004). V tepelně upraveném broskvovém džusu se jeho alergenicita snížila až po jeho filtrování (BRENNAN et al. 2000).

Dalším způsobem úpravy je pečení, které snižuje alergenicitu například u lískových oříšků (HANSEN et al. 2003). U výrobků ze pšenice se také potvrdilo, že

mají nižší alergenicitu než syrová mouka (DE GREGORIO et al. 2009). Na druhé straně, pečením jiných potravin, jako jsou například arašídů, se alergenicita vůbec nesnižuje (NOWAK-WEGRZYN a FIOCCHI 2009).

Zajímavými vlivy, které by mohli snižovat alergenicitu, jsou klíčení a kvašení rostlinných produktů. Při klíčení dochází ke změně zásobních proteinů katalytickými enzymy (proteinázy a amylázy), čím se mohou měnit epitopy těchto proteinů natolik, že se může snížit jejich alergenicita. Při kvašení se dokázalo, že u sojových bobů dochází k zachování alergenicity (HEFLE et al. 2005), ale toto zachování alergenicity nemusí platit u všech rostlinných plodin.

Jiným vlivem, který může změnit alergenicitu potravin, je opracování proteinů potravin trávicími enzymy. V některých studiích se sledoval vliv pepsinu a pankreatinu na ve vodě rozpustné a nerozpustné pšeničné proteiny z mouky, resp. různých částí již hotových výrobků z pšeničné mouky (PASINI et al. 2001; MESA-DEL-CASTILLO et al. 2004).

2.7.3 Pšenice jako alergen

Pšenice patří spolu s rýží a kukuřicí mezi tři nejdůležitější zemědělské plodiny ve světě. Její světová produkce dosahuje více než 600 milionů tun za rok. Pšenice je důležitou obilovinou hlavně v Evropě a Americe, kde se využívá k výrobě různých druhů potravin z pšeničné mouky, ale značná část pšenice se využívá i při výrobě nápojů. Právě toto vysoké zastoupení pšenice v potravě způsobuje v těchto oblastech u některých skupin populace zvýšený výskyt alergických reakcí (SHEWRY 2009; INOMATA 2009). Pšenice se řadí mezi šest potravin, které nejčastěji způsobují alergii u citlivých osob; mezi ně patří: mléko (HOST et al. 1995), vajíčka (BEMHISEL-BROADBENT et al. 1994), sója, ořechy (BURKS et al. 1992) a ryby (BERNHISEL-BROADBENT et al. 1992). Tyto potraviny a jejich alergeny jsou zodpovědné za přibližně 90 % alergických reakcí u dětí (ELLMAN et al. 2002).

2.7.4 Způsoby projevů pšeničné alergie

Podle místa a způsobu vstupu alergenu do organismu a také podle účasti imunologických mechanismů se může alergie na pšenici projevit jako potravinová alergie, postihující GIT; nebo kůži, kde mezi projevy patří urtikarie (kopřivka) a atopický ekzém (dermatitida); nebo dýchací trakt, s projevy astmatu či rinitidy. Dále se potravinová alergie může projevovat angioedémem (otokem obličeje, rtů, jazyka a hrtanu), ale i zvracením, křečím a v krajním případě až anafylaktickým šokem. U pozdního typu alergické reakce se příznaky objevují po 24 hodinách od požití potravy a zahrnují hlavně střevní problémy a u malých dětí vznik atopické dermatitidy (VARJONEN et al. 2000; PALOSUO et al. 2001).

Dalším druhem alergické reakce na pšenici je případ astmatu plynoucího z pracovní činnosti pacienta. Jedná se o tzv. pekařské astma, které se vyskytuje přibližně u 10 z 1000 pracovníků pekáren (CULLINAN et al. 1994; BRANT 2007). Avšak toto onemocnění se objevuje i u dalších osob, které pracují s moukou nebo těstem (BRISMAN et al. 2000). Onemocnění je způsobeno zvýšenou prašností mouky na pracovišti, u vnímavých jedinců vede opakovaný vstup alergenu přes dýchací trakt ke vzniku IgE protilátek proti pšeničným proteinům. U pacientů se objevují potíže s dýcháním, které často doprovází rinitida a urtikarie. Zajímavé je, že většina pacientů s tímto druhem astmatu nemá alergické příznaky po podání potravin obsahující pšeničné proteiny (BRISMAN 2002). Riziko projevení se této choroby vzrůstá u atopických lidí pohybujících se v prostředí se zvýšenou koncentrací pšeničných alergenů v ovzduší (CONSTANTIN et al. 2008; JACOBS et al. 2008).

Speciálním druhem pšeničné alergie je cvičením indukovaná anafylaxe, při které konzumace potravy obsahující složky pšenice, po které následuje fyzická zátěž, může způsobit anafylaktickou reakci (GALL et al. 2000). Jako příznaky se mohou projevit angioedém, kopřivka, ale i nízký krevní tlak, kašel, problémy s dýcháním, které mohou vyústit až do šokových stavů (AIHARA et al. 2002; SCHWARTZ et al. 2008). Diagnostika tohoto onemocnění je dost obtížná a to hlavně u dětí, protože u různých jedinců se liší množství snědené pšenice a míra námahy potřebná k vyvolání příznaků (TEWARI et al. 2006; DU TOIT 2007).

Kontaktní dermatitida je dalším druhem alergické reakce, který postihuje kůži po přímém kontaktu pokožky s alergenem. Alergeny, které tuto reakci vyvolávají, patří mezi nízkomolekulární chemické látky. Imunologický mechanismus při vyvolání reakce je založený na T_H1 lymfocytech a v tomto případě mluvíme o alergické kontaktní dermatitidě (JOHANSSON et al. 2001). Mezi časté alergeny vyvolávající toto onemocnění patří i pšeničné proteiny přítomné v kosmetických přípravcích (GÓMEZ VÁZQUEZ et al. 2002; LAURIÈRE et al. 2006).

Potravinové alergie, mechanismus jejich vzniku a jejich projevy jsou zobrazeny v tabulkách 2.2, 2.3 a 2.4 (SAMPSON 2003).

Tabulka 2.2 Kožní alergické reakce.

Onemocnění	Mechanismus	Projevy
Akutní kopřivka a angioedém	IgE	svědění, vyrážka, otok
Chronická kopřivka a angioedém	IgE	svědění, vyrážka, otok trvající déle než 6 týdnů
Atopická dermatitida	IgE a buňky	svědění, ekzém
Kontaktní dermatitida	buňky	svědění, ekzém
Dermatitis herpetiformis	buňky	svědění, vyrážka po celém těle nebo hýždích

Tabulka 2.3 Alergické reakce v dýchacích cestách.

Onemocnění	Mechanismus	Projevy
Astma	IgE a buňky	kašel, dýchavičnost, pískání
Alergická rinokonjunktivita	IgE	svědění očí, nadměrné slzení, zarudnutí spojivek, ucpaný nos, výtok z nosu, kýchání

Tabulka 2.4 Alergické reakce v gastrointestinálním traktu.

Onemocnění	Mechanismus	Projevy
Orální alergický syndrom	IgE	slabé svědění, brnění a otok rtů, patra nebo jazyka, pocit ztuhlosti krku
Gastrointestinální anafylaxe	IgE	pocit zvracení, bolesti břicha, křeče, zvracení, průjem, postižení také kůže a dýchacího traktu
Alergická eozinofilní ezofagitida	IgE a buňky	reflex, nadměrné slinění, dávení, obtížné polykání, občasné bolesti břicha, podrážděnost
Alergická eozinofilní gastroenteritida	IgE a buňky	časté bolesti břicha, podrážděnost, pocit přesycení, občasné zvracení, hubnutí
Potravinovými proteiny indukovaná proktokolitida	buňky	krev ve stolici
Potravinovými proteiny indukovaná enterokolitida	buňky	časté zvracení, které trvá 1 až 3 hodiny po jídle, průjem, dehydratace

2.8 Křížová reaktivita

Velké množství rostlinných a zvířecích proteinů, které se projevují jako alergeny, se strukturálně podobají jiným rostlinným a zvířecím alergenům. Shoda je hlavně v primární struktuře proteinů (shodné sekvence aminokyselin). Avšak u globulárních proteinů, které patří k nejběžnějším alergenům, nepostačuje shoda v primární struktuře, ale je třeba alespoň částečná, shoda v poskládání proteinů do trojrozměrné struktury (FRITSCH et al. 1997).

Tato strukturální podobnost proteinů z různých potravin může zapříčinit křížovou alergickou reakci u pacienta alergického na jednu z těchto navzájem podobných potravin. Tak například burské oříšky jsou schopné vyvolat křížovou alergickou reakci například na zeleninu. Jiným příkladem může být jablko, které i když samo nevyvolá alergickou reakci, může na základě křížové reaktivity s některými pyly (například břízy) alergickou reakci vyvolat. Obdobné příklady se dají najít i u potravinových proteinů zvířat (SICHERER 2001).

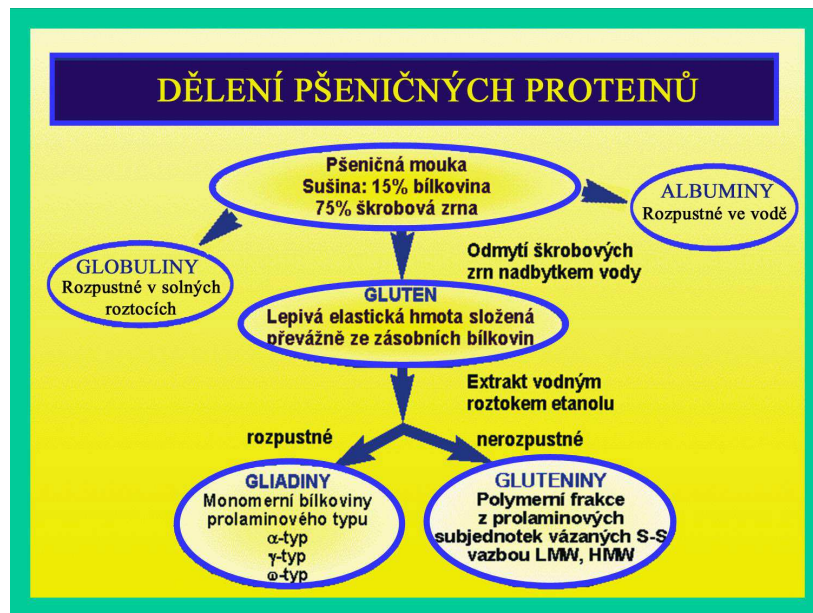
Další vysvětlení vzniku křížové alergické reaktivity se může skrývat ve vlastnostech specifických IgE protilátek, které mohou vázat strukturálně podobné epitopy na rozdílných alergenech (AALBERSE et al. 2001; WEICHEL et al. 2006a).

2.9 Proteiny z obilok pšenice a jejich rozdělení

Pšenice setá (*Triticum aestivum*) patří mezi velkou skupinu trav patřících do čeledi Lipnicovité (*Poaceae*). Jejími plody jsou obilky, které obsahují přibližně 75 % škrobu a zbytek tvoří bílkoviny. Právě bílkoviny jsou převážně zodpovědné za vyvolání alergické reakce na potraviny obsahující pšenici.

Obilka pšenice je tvořena třemi částmi. První část se označuje jako ektosperm. Druhá hlavní část je endosperm a třetí je klíček. Endosperm je tvořen převážně škrobem a přibližně 15% jeho sušiny tvoří bílkoviny. Odhaduje se, že v pšeničném endospermu dochází k expresi 4500 až 8000 různých genů (CLARKE et al. 2000). Hlavními proteiny endospermu pšenice jsou albuminy, globuliny a lepek (gluten). Lepek je ještě

tvořen proteiny: gliadiny (monomerní bílkoviny patřící do rodiny prolaminů) a gluteniny (polymerní frakce patřící rovněž do rodiny prolaminů). Gliadinu bývá v pšeničném lepku od 28 do 69 %, gluteninu pak zbytek, ale jenom výjimečně až 72 %. Obě bílkoviny jsou zásobními pro zrna pšenice (FUCHS 2005). Obrázek 2.1 zobrazuje rozdělení pšeničných proteinů.



Obrázek 2.1 Rozdělení pšeničných proteinů; zkratky: LMW jsou proteinové složky s nízkou molekulovou hmotností a HMW jsou proteinové složky s vysokou molekulovou hmotností.

Bílkoviny z pšeničných obil je možné dělit i podle jejich rozpustnosti do čtyř skupin. Albuminy patří mezi proteiny ve vodě velmi dobře rozpustné, globuliny jsou dobře rozpustné v solných roztocích ($0,5 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$). Další skupinu tvoří ve vodě ani v solných roztocích nerozpustné monomerní gliadiny, které jsou rozpustné v alkoholu. Poslední skupinou jsou polymerní gluteniny rozpustné v kyselině octové (SIMONATO et al. 2001a).

Mezi hlavní bílkoviny, které způsobují alergickou reakci na pšenici, patří ve vodě rozpustné bílkoviny, albuminy a globuliny (MORENO a CLEMENTE 2008). Tyto bílkoviny jsou kromě klasické potravinové alergie na pšenici také spojovány i se vznikem pekařského astmatu a atopické dermatitidy. Mezi alergeny, které byly určeny, patří proteiny z rozsáhlé rodiny inhibitorů α -amylázy a trypsinu (SANDER et al. 2000; SALT et al. 2005), rodina proteinů regulujících fyziologické procesy u živočichů i

rostlin, která se označuje jako serpinové inhibitory (ROSENKRANDS et al. 1994; ØSTERGAARD et al. 2000) a řada dalších enzymů jako je peroxidáza a inhibitorů proteáz (YAMASHITA et al. 2002; HAUSER et al. 2008). Dále do této skupiny patří i proteiny vážící lipidy (DOULIEZ et al. 2000; SALCEDO et al. 2004), ze kterých je nejznámější například lipid transferový protein (LTP). V solných extraktech pšeničné mouky byly popsány potenciálně alergenní proteiny, které mají podobnou strukturu jako globuliny ječmene.

Dobře je známo složení a struktury gliadinů a gluteninů. Gliadiny jsou monomerní proteiny, které se dělí podle jejich sekvencí a elektroforetické pohyblivosti do různých tříd, jako jsou α -, β -, γ - a ω -gliadiny (BATTAIS et al. 2005; DAENGSUWAN et al. 2005). Na rozdíl od gliadinů, jsou gluteniny polymerní proteiny s četnými mezimolekulovými S-S můstky a jsou složeny z jedné malé (LMW, z anglického Low Molecular Weight) a jedné velké (HMW, z anglického High Molecular Weight) podjednotky (PASTORELLO et al. 2007; TATHAM a SHEWRY 2008).

2.10 Pšeničné alergeny ze syrové mouky

IgE vážící proteiny v syrové pšeničné mouce jsou označeny Tri a následované číslem. Tyto proteiny jsou neustále doplňovány a jejich přehled je zobrazen v tabulce 2.5. V naší laboratoři jsme přispěli k identifikaci některých pšeničných alergenů uvedených v tabulce. Některé námi identifikované proteiny dosud nebyly zařazeny. Mezi nezařazené pšeničné proteiny, které vážou specifické IgE protilátky ze sér pacientů alergických na pšenici, patří například: prekurzor α -amyláza/trypsin inhibitor CM3, prekurzor α -amyláza/trypsin inhibitor CM16, α -amylasa inhibitor CIII, β -amyláza, β -D-glukan exohydroláza atd. Pak byly identifikovány alergeny jako cytoplazmatický protein cyklofilin a peroxidáza 1 (ŠOTKOVSKÝ et al. 2008).

Na druhé straně, jenom málo se ví o nových alergenech, které mohou vznikat tepelnou úpravou potravin obsahujících pšeničnou mouku a následným natrávením proteinů v těchto potravinách trávicími enzymy. V této oblasti identifikace pozměněných a nově vznikajících alergenů z tepelně upravených potravinových produktů obsahujících pšenici je stále ještě mnoho práce. Identifikace těchto alergenů

by měla pomoci k lepším diagnostickým a terapeutickým postupům. Přispět k tomuto cíli má za účel i tato diplomová práce.

Tabulka 2.5 Zobrazení některých popsaných alergenů ze syrové pšeničné mouky (zdroj www.allergome.org).

jméno alergenu	název alergenu	kód alergenu	jméno alergenu	název alergenu	kód alergenu
Tri a 1	Expansin	769	Tri a 3	Expansin C-konec	725
Tri a 10kDa	–	5862	Tri a 4	Barberine bridging enzym(BBE)	831
Tri a 12	Profilin, aktin vázající protein	767	Tri a 4.0101	Izoforma BBE	2786
Tri a 12.0101	Izoforma profilinu	3498	Tri a 4.0201	Izoforma BBE	2787
Tri a 12.0102	Izoforma profilinu	3499	Tri a 5	Pylový alergen 5. sk.	745
Tri a 12.0103	Izoforma profilinu	3500	Tri a 7	Polcalcein	1396
Tri a 13	Polygalaktouronaza	2529	Tri a α/β gliadin	–	3994
Tri a 14	LTP	1059	Tri a α -gliadin	–	3682
Tri a 14.0101	Izoforma LTP	3610	Tri a Bd36K	peroxidáza	985
Tri a 18	Aglutinin	650	Tri a β -gliadin	–	3683
Tri a 18.0101	Izoforma aglutininu	3501	Tri a chitinase	Chitinaza I třídy	1274
Tri a 19	ω -5 gliadin/gluten	3677	Tri a γ -gliadin	–	3678
Tri a 19.0101	Izoforma ω -5 gliadin/gluten	3502	Tri a Germin	Germin	778
Tri a 2	Expansin	768	Tri a Gliadin	–	651
Tri a 25	Thioredoxin	2683	Tri a ω 2-gliadin	–	3681
Tri a 25.0101	Izoforma Thioredoxinu	3503	Tri a Peroxidase	Peroxidáza	1474
Tri a 26	Gluteniny	2898	Tri a Serpin	Serpiny	5724

3 Metody a materiál

3.1 Vzorčky hotových produktů obsahujících pšenici

Všechny vzorky mouky a produktů obsahujících pšenici zabezpečila MUDr. Andrea Kainarová. Chléb a rohlíky byly připravené v Michelské pekárně (Praha) podle běžných výrobních postupů. Chléb byl vyroben ze směsné mouky, obsahující pšenici a žito, z vody, soli, kmínu a byl pečen při teplotě 290 °C po dobu 55 minut. Rohlíky byly vyrobeny z běžné bílé mouky, vody, soli, kvasnic a byly pečeny při teplotě 270 °C po dobu 11 minut. Kromě těchto finálních výrobků byly vzorky odebrané v různých stadiích zpracování – syrové těsto pro výrobu chleba i rohlíků, vařené těsto pro výrobu chleba i rohlíků. Navíc z hotového chleba byly připraveny ještě vzorky samotné kůrky a samotné dřeně z chleba. Všechny tyto vzorky byly sušeny při laboratorní teplotě, pak byly pomlety na jemný prášek a před použitím byly skladovány při teplotě –20 °C.

3.2 Pacientská séra

Vzorky pacientských sér byly poskytnuté v rámci spolupráce s MUDr. Ivanou Šetinovou z imunologického centra Synlab – Imumed. Séra pocházejí z krve pacientů, kteří trpí alergickými nemocemi. Odebraná krev se nechala srazit přibližně jednu hodinu, pak byla stočená na centrifuze při 2000 g po dobu 10 minut. Následně se odebralo sérum a na přístroji Immulite 2000 (DPC, USA) se zjistila hladina specifických IgE protilátek proti proteinům pšeničné mouky rozpuštěných ve vodných roztocích. Koncentrace byla uvedená v jednotkách U ml⁻¹ (1U IgE = 2,4 ng IgE). Uvedená metoda se jmenuje CAP System FEIA-fluorescent-enzyme immunoassay (Pharmacia & Upjohn, USA).

Séra byla skladována při teplotě –20 °C. Každé sérum bylo rozděleno do několika zkumavek v objemu, který se po rozmražení použil právě na jeden pokus. Opakované

zmrazování a rozmrazování totiž snižuje hladinu IgE protilátek. Před každým použitím byla séra rozmražena a stočena na centrifuze při otáčkách 10000 RPM po dobu 10 minut. Pracovalo se s 22 séry pacientů, kteří měli atopický ekzém a zvýšené specifické IgE protilátky proti pšeničným proteinům v rozsahu $0,7 \text{ U ml}^{-1}$ (středně zvýšená hodnota) až 72 U ml^{-1} (výrazně zvýšená hodnota specifických IgE protilátek).

3.3 Příprava pšeničných extraktů

Při přípravě extraktů se vycházelo z odpovídající pšeničné mouky používané pro přípravu chleba nebo rohlíků. Extrakty byly připravené z mouky samotné, ze syrového těsta, vařeného těsta a hotových produktů, chleba, resp. rohlíku.

3.3.1 Extrakce v PBS pufru

3 g mouky/těsta/produktu se smíchaly s 30 ml PBS a směs se nechala třepat na třepačce přes noc při teplotě $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Pak se roztok ultrasonikoval v ledové drti po dobu 15 minut. Následně se roztok stočil na centrifuze při 1200 RPM (20000 g) při teplotě $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 20 minut. Supernatant se odebral a uskladnil se při teplotě $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.2 Následná extrakce v SDS pufru

K peletám (sedimentům), které zůstaly po extrakci PBS, se přidalo 15 ml SDS pufru. Směs se promíchala a nechala se třepat na třepačce s vodní lázní vytemperované na $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 2 hodin. Pak se roztok stočil na centrifuze při 1200 RPM (20000 g) při teplotě $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 20 minut. Supernatant se odebral a uskladnil se při teplotě $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Roztok PBS se připravil smícháním následujících látek:

90 g NaCl

2 g NaH₂PO₄ x 2H₂O

12 g NaHPO₄ x 12H₂O

doplnit do objemu 1 l vodou a následně upravit pH na 7,2 až 7,4 roztokem NaOH o koncentraci 1 mol dm⁻³.

Roztok SDS pufru se připravil smícháním následujících látek:

1,15 g SDS

378 mg Tris

5 ml glycerol

2,5 ml β-merkaptoethanol

1,25 ml bromfenolové modři rozpuštěné v 1% roztoku methanolu

doplnit do objemu 50 ml vodou.

3.4 Stanovení koncentrace proteinů v extraktech

Koncentrace proteinů byla u PBS extraktů stanovena u každého vzorku v 96 jamkové destičce (MaxiSorp Nunc-Immuno Plate). Vzorky extraktů se ředily 0x, 10x, 50x a 100x ve sterilní vodě. Jednotlivé jamky se naplnily 10 μl roztoku se vzorky extrahovaných proteinů. K nim se přidalo 200 μl roztoku komerčního kitu BCA (Pierce Rockford, USA). Takto obsazená destička se nechala inkubovat 30 minut při teplotě 37 °C. Pak byla měřena optická denzita při 540 nm na přístroji Absorbance Microplate Reader ELx800TM (BioTek, USA), ze které byla vypočtena koncentrace proteinů ve vzorcích PBS extraktů v jednotkách mg ml⁻¹.

Koncentrace proteinů byla u SDS extraktů stanovena u každého vzorku v 96 jamkové destičce (MaxiSorp Nunc-Immuno Plate). Vzorky extraktů jsme ředili 0x, 10x a 20x ve sterilní vodě. Jednotlivé jamky se naplnily 160 μl roztoku extrahovaných proteinů. K nim se přidalo 40 μl naředěného komerčního činidla (1 díl barviva se

smíchalo 4 díly vody). Takto obsazená destička se nechala inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě. Potom se měřila optická denzita při 590 nm na přístroji Absorbance Microplate Reader ELx800TM (BioTek, USA), ze které byla vypočtena koncentrace proteinů ve vzorcích SDS extraktů v jednotkách mg ml⁻¹.

3.5 Zakoncentrování proteinů pomocí acetonu

Roztok s proteiny se rozmrazil a následně se nechal třepat na třepačce (TTS 3 digital, IKA Works, USA) při otáčkách 3000 RPM po dobu 10 minut. Po míchání se roztok s proteiny stočil na centrifuze při otáčkách 18000 RPM po dobu 10 minut. Po stočení se odebral supernatant a k ekvivalentu 1 objemové jednotky supernatantu se přidaly 4 objemové jednotky acetonu o teplotě -20 °C. Tato směs se promíchala a nechala se v mrazničce při teplotě -20 °C po dobu 20 minut. Potom se směs stočila na centrifuze při otáčkách 4000 RPM, teplotě 4 °C 15 minut. Opatrně se odebral supernatant tak, aby zůstal neporušený sediment na dně centrifugační zkumavky (Corning, USA). Centrifugační zkumavka s usazeným vzorkem se vysušila od zbytků acetonu a usazený vzorek se pak rozpustil v roztoku vzorkového redukujícího pufru. Rozpouštění se urychlilo třepáním na třepačce při 3000 RPM.

Redukující vzorkový pufr se připravil z 2,5 ml roztoku Tris-HCl o koncentraci 0,5 mol dm⁻³ pH 6,8, ke kterému se přidalo 0,8 g SDS, 4 ml glycerolu, 0,771 g DTT a 2 mg bromfenolové modři. Roztok se nakonec doplnil do objemu 10 ml vodou. Takto připravený roztok byl čtyřikrát koncentrován a před použitím ho bylo potřeba naředit.

3.6 Štěpení vzorků pepsinem

Vysušený a namletý pšeničný produkt (rohlík) o hmotnosti 1 g se smíchal s roztokem, který obsahoval 10 ml PBS o pH 2,0 (upraveno HCl) a 1 mg pepsinu. Pak se tento roztok inkuboval za intenzivního třepání na třepačce při 37 °C po dobu 15, 30, nebo 45 minut. Po uplynutí inkubační doby se trávení pepsinem zastavilo neutralizací pH

pomocí roztoku 10 mol dm^{-3} NaOH. Následně se roztok třepal na třepačce při teplotě $37 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 1 hodiny. Roztok se pak stočil na centrifuze při 4000 RPM , $4 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 20 minut. Odebral se supernatant a nechal se zamrazit při teplotě $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Usazená peleta se rozpustila v roztoku SDS pufru (složení SDS pufru jako při extrakci, viz podkapitolu 3.3.2) za intenzivního třepání na třepačce s vodní lázní vytemperovanou na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 2 hodin. Pak se roztok stočil na centrifuze při 1200 RPM (20000 g), teplotě $20 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 20 minut. Nakonec se odebral supernatant a dal se zamrazit při teplotě $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Před použitím se změřila koncentrace proteinů ve vzorku natráveném pepsinem pomocí BCA kitu (viz podkapitola 3.4).

3.7 Štěpení vzorků pankreatinem

Před samotným trávením pankreatinem se připravil roztok pankreatinu v H_3BO_3 o koncentraci 1 mol dm^{-3} a NaOH o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ a HCl se upravilo pH na 6,8. K tomuto roztoku se přidal pankreatin tak, aby jeho koncentrace byla $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ a roztok se důkladně promíchal.

K 1 ml extraktu vzorku (hotový rohlík) se přidalo $250 \text{ } \mu\text{l}$ roztoku pankreatinu. Tento roztok se nechal inkubovat za stálého třepání na třepačce při teplotě $37 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 30, 60, 90 minut. Po ukončení reakce se přidal roztok proteazového inhibitoru (identifikační kód P2714) v množství $100 \text{ } \mu\text{l}$ zásobního roztoku na 1 mg pankreatinu. Pak se roztok stočil na centrifuze při 1200 RPM (20000 g), teplotě $20 \text{ }^\circ\text{C}$, 20 minut. Nakonec se odebral supernatant a dal se zamrazit na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Před použitím se změřila koncentrace proteinů ve vzorku natráveném pankreatinem pomocí BCA kitu (viz podkapitola 3.4).

3.8 Jednorozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Jednorozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu obsahujícím anionický detergent SDS probíhala ve vertikálním uspořádání na $0,75 \text{ mm}$ tenkém gelu podle

modifikované metody Laemmeliho a Favreho. Jednotlivé vzorky byly upraveny přidáním redukujícího vzorkového pufru v poměru 1:1 (redukující pufr byl namíchaný tak, aby jeho složení bylo: $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl o pH 6,8, 10% roztok SDS, 20% glycerol, 5% β -merkapt ethanol, 0,01% bromfenolová modř). Před nanesením vzorků do jamek v zaostřovacím gelu, se vzorky povařily po dobu 5 minut, a potom se stočily na centrifuze při 10000 RPM po dobu 5 minut. Vzorky se nanášely do jamek zaostřovacího gelu zalitých elektrodoým pufrem ($0,25 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris, $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ glycin, 0,1% SDS). Po nanesení vzorků do jamek byla spuštěna elektroforéza, která běžela v elektrodoým pufru na aparatuře Bio-Rad Mini-PROTEAN®II se zdrojem napětí CONSORT E844 (Scie-Plas, UK) za konstantního proudu 35 mA (70 V). Elektroforéza byla ukončena, když čelo bromfenolové modři dosáhlo konce gelu. Pro přibližné určení molekulové hmotnosti rozdělených proteinů byly použity standardy Prestained SDS-PAGE Standards s rozsahem molekulových hmotností od 6 do 198 kDa.

Dělicí polyakrylamidový gradientový gelu se připravil smícháním 5% a 20% gelu podle návodu, který je zobrazený v tabulce 3.1.

Tabulka 3.1 Příprava dělicího polyakrylamidového gradientového gelu.

	5% gel [μl]	20% gel [μl]
H ₂ O	5700	750
$1,5 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl (pH 8,8)	2500	2500
10% SDS	100	100
30% akrylamid	1650	6600
10% APS	50	50
TEMED	5	5

Gradientu bylo dosaženo pomocí dvoukomorového systému spojených nádob (Gradient Maker SG 15, Hoefer, USA) a peristaltické pumpy (Pump P-1, GE Healthcare, USA). Na jeden gel se použilo 2,3 ml 5% a 1,8 ml 20% gelu.

Zaostřovací gel se připravil podle návodu, který je zobrazený v tabulce 3.2.

Tabulka 3.2 Příprava zaostřovacího gelu.

	V [μ l]
H ₂ O	6100
0,5 mol dm ⁻³ Tris-HCl (pH 6,8)	2500
10% SDS	100
30% akrylamid	1300
10% APS	50
TEMED	10

Po nalití horního gelu se aparatura s oběma gely nechala pro lepší polymeraci přes noc v lednici. Potom se nanasly vzorky.

3.9 Dvourozměrná elektroforéza

Na začátku se stanovila koncentrace proteinů ve vzorku pomocí BCA kitu (viz podkapitulu 3.4). Po stanovení koncentrace proteinů se vzorky vysrážely roztokem s obsahem 20 % TCA a 0,2 % DTT v acetonu o teplotě -20 °C. Na 1 ml vzorku se přidávalo 8 ml tohoto srážecího roztoku. Tato směs se ponechala srážet přes noc při teplotě -20 °C. Pak se směs stočila na centrifuze při teplotě 4 °C a 12000 RPM po dobu 15 minut, supernatant se vylil a k usazeným proteinům se přidalo 8 ml roztoku obsahujícího 0,2 % DTT v acetonu o teplotě -20 °C. Směs se promíchala, následně se stočila na centrifuze při teplotě 4 °C a 12000 RPM po dobu 15 minut. Supernatant se

vyžil a sediment s proteiny se rozpustil v rehydratačním roztoku RTS-D, jehož příprava a složení je zobrazená v tabulce 3.3.

Tabulka 3.3 Složení rehydratačního roztoku RTS-D pro přípravu 5 ml tohoto roztoku.

látko	množství
močovina [6 mol dm ⁻³]	1800 mg
thiomočovina [2 mol dm ⁻³]	760 mg
CHAPS [4 %]	200 mg
Tris [40 mmol dm ⁻³]	24,25 mg
DeStreak	60 µl
bromfenolová modř	30 µl
Pharmalyte	9,3 µl

Po rozpuštění proteinů v rehydratačním roztoku RTS-D v objemu, který byl třikrát menší než původní objem vzorku, se tento roztok nechal stát při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny. Potom se roztok stočil na centrifuze při teplotě 15 °C a 27000 RPM 60 minut a odebral se supernatant s rozpuštěnými proteiny. Před nanášením vzorků proteinů na stripy (GE Healthcare, USA), s rozsahem pH v rozmezí 3 až 10, a spuštěním prvního rozměru elektroforézy (izoelektrická fokusace) se nejdříve upravila koncentrace proteinů ve vzorcích přidáním roztoku RTS-D tak, aby výsledná koncentrace proteinů v nanášeném objemu byla 200 µg a celkový objem vzorku byl 350 µl. Tento objem vzorku se následně nanas do žlábků, do kterého se vložil strip a to gelem dolu. Žlábků se stripů se pak zalily parafinovým olejem (2 ml na velký strip). Následně se žlábků přikryly a nechaly rehydratovat 17 hodin při teplotě 20 °C. Po rehydrataci se stripů vytáhly z jamek, opláchly se vodou a osušily. Pak se stripů umístily do středu jamky ve fokusačním přístroji a to gelem nahoru a v směru plus na gelu na plus na přístroji. Na kraje stripů se ještě položily ve vodě navlhčené čtverečky speciálního papírku tak, aby přesahovaly šířkou gel. Pak se na ně přiložil umělohmotný žlábek s platinovým drátkem. Do žlábků se nalilo přibližně 220 ml parafinového oleje a potom se zapnul

přístroj na izoelektrickou fokusaci. Izoelektrická fokusace probíhala za podmínek uvedených v tabulce 3.4.

Tabulka 3.4 Postupné zvyšování napětí při izoelektrické fokusaci velkých stripů (18 cm) v rozpětí pH 3 až 10 a při maximálním nastavení 6mA, 15 W a 20 °C.

napětí [V]	čas [hodina]
300	0,5
600	0,5
1000	0,5
2000	0,5
2500	0,5
3000	0,5
3500	21,0

Po ukončení izoelektrické fokusace se parafinový olej vylil, stripy se vybraly a vložily se do skleněných zkumavek. Ke stripům ve zkumavkách se pak přidalo po 9 ml ekvilibračního roztoku, připraveného z 9 ml zásobního roztoku, ke kterému se přidalo 0,5 g DTT. Zásobní roztok obsahoval 36 g močoviny; 2 g SDS; 30 ml glycerolu; 3,34 ml 1,5 mol dm⁻³ Tris-HCl (pH 8,8) a celá tato směs se rozpustila a pak doplnila vodou do konečného objemu 100 ml. Po nalití ekvilibračního roztoku do skleněných zkumavek se nechaly zkumavky třepat na třepačce po dobu 15 minut. Roztok se následně vylil a do zkumavek se nalilo po 9 ml druhého ekvilibračního roztoku, který se připravil z 9 ml zásobního roztoku, ke kterému se přidalo 0,36 g iodoacetamidu a 50 µl bromfenolové modři. Po 15 minutovém třepání na třepačce se stripy vytáhly ze zkumavek, opláchly vodou, osušily a vložily se mezi skla s 12% SDS akrylamidovým gelem (příprava akrylamidového gelu na dvourozměrnou elektroforézu je uvedena v tabulce 3.5). Mezi skla se ještě vložil čtvereček filtračního papírku (1 x 1 cm), na kterém byl nanesený standard o objemu 4 µl. Strip a čtvereček se standardem se hned zalil horkou agarózou (0,5% agaróza v elektrodovém pufru, který se použil i u jednorozměrné elektroforézy).

Po ztuhnutí agarózy se spustil druhý rozměr v akrylamidovém gelu, který se nechal běžet nejdříve 1 hodinu při 10 mA, 500 V a 100 W. Pak elektroforéza běžela 5 hodin při 80 mA, 500 V a 100 W. Po doběhnutí druhého rozměru elektroforézy se gel buď obarvil v Coomassie® Brilliant Blue R-250 nebo se přebloval.

Tabulka 3.5 Příprava 12% akrylamidového gelu použitého při dvourozměrné elektroforéze.

látka	V [ml]
voda	33,5
1 mol dm ⁻³ Tris-HCl (pH 8,8)	25
10% SDS	1
akrylamid	40
10% APS	0,5
TEMED	0,050

3.10 Barvení gelu pomocí Coomassie® Brilliant Blue R-250, odbarvování, uchovávání a případné sušení gelu

Po elektroforetickém rozdělení se bílkoviny na gel obarvily na třepačce v roztoku Coomassie® Brilliant Blue R-250 po dobu 30 minut. Pak se gel několikrát promyl v odbarvovacím roztoku a v případě potřeby se mohl gel uchovávat v 2% roztoku kyseliny octové pro další práci. Gel se mohl také usušit v celofánu po předchozím promytí v sušícím roztoku.

Barvicí roztok Coomassie® Brilliant Blue R-250 se připravil tak, že navážka 1,25 g pevného barviva se rozpustila v roztoku o složení: 225 ml methanolu, 50 ml kyseliny octové a 225 ml vody.

Odbarvovací roztok se připravil smícháním methanolu s vodou a s kyselinou octovou ve vzájemném poměru 4:5:1.

Sušící roztok obsahoval 140 ml vody, 50 ml methanolu a 10 ml glycerolu.

3.11 Western blot

Proteiny rozdělené v polyakrylamidovém gelu byly přeneseny na nitrocelulózovou membránu (nitrocellulose membrane NC2, Serva, SRN) za použití aparatury trans-Blot® (Bio-Rad, USA) připojené ke zdroji CONSORT E844 za konstantního proudu 250 mA. Přenos probíhal v blotovacím pufru, který obsahoval 25 mmol dm⁻³ Tris, 192 mmol dm⁻³ glycinu a 20% methanolu. Blotování probíhalo po dobu 1 hodiny. Nitrocelulózová membrána s přenesenými proteiny se nechala vyschnout za laboratorní teploty minimálně do příštího dne.

Suchá nitrocelulózová membrána se barvila Ponceau S červení (0,1% roztok) po dobu 1 minuty, pak byla odbarvena v 0,1% roztoku PBS-T. Následně se nitrocelulózová membrána nastříhala na asi 3 mm proužky, na kterých se blokovala volná místa bez proteinů 0,5% roztokem PBS-T po dobu 1 hodiny. Po blokování se proužky třikrát promyly 0,1% roztokem PBS-T, přičemž jedno promytí trvalo 5 minut. Pak se proužky inkubovaly přes noc za stálého třepání na třepačce při teplotě 4 °C s patientským sérem ředěným v poměru 1:10 v blokačním 0,5% roztoku PBS-T. Po inkubaci se proužky membrány promyly třikrát v 0,1% roztoku PBS-T po 5 minutách. Potom se k proužkům přidala peroxidázou značená sekundární ovčí anti-lidská IgE protilátka ředěná v poměru 1:1000 v blokačním 0,5% roztoku PBS-T. Inkubace se sekundární protilátkou probíhala za stálého třepání na třepačce při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny. Po inkubaci se sekundární protilátkou se proužky opět promyly v 0,1% roztoku PBS-T a to čtyřikrát po 5 minut. Po promytí se na proužky nanasla směs roztoků A a B na ECL, které se smíchaly v poměru 1:1. Poté se provedla detekce v temné komoře na rentgenových filmech (MXB Film, Kodak, USA). Délka expozice byla v časových intervalech 30 sekund, 1 minuta a 5 minut, po které následovalo vyvolání filmů na přístroji Optimax (Fomei, Rumunsko).

Roztok 0,1% Ponceau S červení se připravil rozpuštěním odpovídajícího množství pevného prášku Ponceau S v odpovídajícím objemu 5% kyselině octové.

Roztok A se připravil smícháním 18 ml vody; 2 ml 1 mol dm^{-3} Tris-HCl o pH 8,5; 90 μl kyseliny kumarové a 200 μl luminolu. Roztok B se připravil smícháním 18 ml vody; 2 ml 1 mol dm^{-3} Tris-HCl o pH 8,5 a 12 μl H_2O_2 .

Pro přenesení proteinů z gelu na nitrocelulózovou membránu po dvourozměrné elektroforéze se použil western blot v provedení semi-dry (TE70X Semi-dry Blotters, Hoefer, USA). Při skládání blotovací aparatury se suchá nitrocelulózová membrána navlhčila blotovacím pufrům. Po poskládání blotovací aparatury se spustilo blotování, přičemž přenos probíhal při podmínkách 250 mA po dobu 1 hodiny a 40 minut.

Po přenesení proteinů se nitrocelulózová membrána nechala vyschnout za laboratorní teploty minimálně do příštího dne. Po vysušení nitrocelulózové membrány se s ní dále postupovalo obdobně jako u nitrocelulózové membrány z jednorozměrné elektroforézy, avšak nitrocelulózová membrána se nebarvila Ponceau S červení (0,1% roztok).

3.12 Příprava vzorků proteinů pro hmotnostní spektrometrii

Gel s proužky, obsahujícími pro nás zajímavý protein, se nejdříve vyřezaly z gelu. Vyřezaný proužek gelu se pak nasekal skalpelem na malé částičky. Takto nasekaný gel s proteiny se odbarvoval přemýváním roztoky 4-ethylmorfolinovým pufrům o koncentraci 100 mmol dm^{-3} a pH 8,3; a roztokem acetonitrilu, které byly smíchané v poměru 3:2. Nejdříve se přidalo 300 μl roztoku 4-ethylmorfolinového pufru a poté 200 μl acetonitrilu. Pufr slouží k rehydrataci gelu a acetonitril odbarvuje gel. Směs gelu se vzorkem a oběma roztoky se chvíli míchalo na vortexu, pak se nechala 3 minuty sonikovat (Bandelin Sonorex, UK) při teplotě 50 °C. Následně se tato směs stočila na centrifuze při 13400 RPM po dobu 15 sekund. Roztok supernatantu se odebral a celý proces se opakoval znovu, dokud se gel se vzorkem neodbarvil. Po odbarvení se gel vysušil a to tak, že se odlil roztok supernatantu (směs roztoků 4-ethyl-morfolinového pufru a acetonitrilu) a k sedimentu se přidal samotný acetonitril. Směs se chvíli vortexovala a pak se 3 minuty sonikovala. Po sonikaci se odebral acetonitril a ve vysušeném gelu se ve vzorku následně redukovaly S-S můstky přidáním redukčního činidla trikarboxy-ethylfosfinu (TCEP) o koncentraci 100 mmol dm^{-3} . Roztok TCEP o

dané koncentraci se připravil tak, že se naředil v poměru 1:10 s 4-ethylmorfolinovým pufrům. Ke gelu se vzorkem se pak přidalo 90 μl tohoto roztoku. Následně se směs vortexovala, pak se 15 minut sonikovala při teplotě 70 $^{\circ}\text{C}$, přičemž se každých 5 minut směs znovu chvíli vortexovala. Po sonikaci se směs stočila na centrifuze při 13400 RPM po dobu 15 sekund. Supernatant se odebral, přidalo se 200 μl vody, směs se chvíli vortexovala, stočila se na centrifuze při 13400 RPM po dobu 15 sekund a supernatant se odebral. Ke gelu se vzorkem se potom přidal acetonitril, směs se chvíli vortexovala a pak sonikovala po dobu 1 minuty. Nakonec se odebral acetonitril a ke gelu se vzorkem se přidalo alkylační činidlo (iodoacetamid rozpuštěný v 4-ethylmorfolinovém pufru) o objemu 90 μl . Směs se chvíli vortexovala a potom se nechala alkylovat ve tmě po dobu 30 minut. Po alkylování se směs stočila na centrifuze při 13400 RPM po dobu 15 sekund, odebralo se alkylační činidlo a gel se vzorkem se následně důkladně promyl a to tak, že se ke gelu přidalo 400 μl acetonitrilu, směs se chvíli vortexovala a pak se odebral acetonitril. Následně se ke gelu přidalo 400 μl vody, směs se chvíli vortexovala a pak se sonikovala při 50 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut a nakonec se voda odebrala. Celý proces se opakoval třikrát. Při posledním kroku se po sonikaci směs stočila na centrifuze při 13400 RPM po dobu 15 sekund, důkladně se odebrala voda a ke gelu se vzorkem se přidalo 300 μl vody a 200 μl acetonitrilu. Směs se opět chvíli vortexovala, sonikovala při 50 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 3 minuty a potom se odebrala kapalná složka. Gel se vzorkem se důkladně vysušil na „speedvaku“ (Sevant SPD 121P, Thermo, USA) po dobu 20 minut. Výhodou sušení gelu se vzorkem tímto způsobem je, že gel se vysušuje postupně, přičemž se zachová velikost pórů, čím se umožní lepší působení trypsinu. Po vysušení gelu se vzorkem se k němu přidal roztok trypsinu rozpuštěným ve směsi roztoků 4-ethylmorfolinový pufr a acetonitril tak, aby konečná koncentrace trypsinu byla 10 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$. Ke gelu se vzorkem se přidalo 20 μl tohoto roztoku, počkalo se 10 minut až gel nabobtnal a pak se směs gelu se vzorkem a tímto roztokem inkubovala při teplotě 37 $^{\circ}\text{C}$ přes noc. Roztok trypsinu se připravil smícháním 90 μl 4-ethylmorfolinového pufru o koncentraci 50 mmol dm^{-3} a 10 μl acetonitrilu. Zásobní roztok trypsinu byl připraven rozpuštěním trypsinu v 1% kyselině octové.

Další manipulace s gelem, ale i příprava matrice a samotné měření na hmotnostním spektrometru MALDI-FTMS APEX-Ultra (Bruker Daltonics, SRN) se dělalo pod záštitou vyškolených pracovníků pro hmotnostní spektrometrii.

3.13 Použité chemikálie

V práci byly použité tyto chemikálie: 1 mol dm⁻³ Tris-HCl o pH 6,8 (Applichem, SRN), 1,5 mol dm⁻³ Tris-HCl o pH 8,8 (Bio-Rad, USA), 4-ethylmorfolin (Fluka, Švýcarsko), aceton (Lachner, ČR), acetonitril (Merck, SRN), agaróza (Lachema, ČR), akrylamid (Bio-Rad, USA), bromfenolová modř (Lachema, ČR), CHAPS (Sigma, USA), Coomassie[®] Brilliant Blue R-250 (Serva, SRN), DeStreak (Amersham Biosciences, USA), dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Lachema, ČR), dithiotreitol (DTT, Sigma, USA), dodecylsulfát sodný (SDS, Serva, SRN), glycerol (Lachema, ČR), glycin (Serva, SRN), hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Lachema, ČR), hydroxid sodný (Lachner, ČR), chlorid sodný (Lachner, ČR), iodoacetamid (Sigma, USA), kyselina boritá (Lachema, ČR), kyselina chlorovodíková (Lachema, ČR), kyselina kumarová (Sigma, USA), kyselina octová (Lachner, ČR), kyselina trichloroctová (TCA, Sigma, USA), luminol (Sigma, USA), methanol (Lachner, ČR), močovina (Sigma, USA), pankreatin (Sigma, USA), parafinový olej (Merck, SRN), pepsin (Sigma, USA), peroxid vodíku (Lachner, ČR), persíran amonný (Lachema, ČR), pharmalyte (Amersham Biosciences, USA), Ponceau S (Serva, SRN), roztok proteazového inhibitoru P2714 (Sigma, USA), thiomčovina (Sigma, USA), tris-(2-karboxyethyl)fosfin (Sigma, USA), tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris, Serva, SRN), N,N,N',N'-tetramethylethylen-diamin (TEMED, Bio-Rad, USA), trypsin (Sigma, USA), Tween 20 (Duchefa Biochemie, SRN), β -merkaptóethanol (Serva, SRN).

3.14 Použité kity, standardy a protilátky

- BCA[™] kit Protein Assay Kit (Pierce, USA)
- kit pro stanovení koncentrace proteinů Bredfordovou metodou (Bio-Rad, USA)
- sekundární protilátka (Sheep-Anti-Human IgE peroxidase conjugate, The Binding Site, UK)
- standard Prestained SDS-PAGE Standards (Bio-Rad, USA), pre jednorozměrnou elektroforézu

- standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, USA), pre dvourozměrnou elektroforézu

3.15 Použité přístroje a software

- blotovací jednotka Mini Trans-Blot® (Bio-Rad, USA)
- blotovací jednotka TE70X Semi-dry Blotters (Hoefler, USA)
- dvoukomůrková aparatura na přípravu gradientového gelu (Gradient Maker SG15, Hoefler, USA)
- centrifuga EBA 12 (Hettich Zentrifugen, SRN)
- centrifuga Jouan BR4i (Jouan, Francie)
- elektroforetická jednotka Mini-PROTEAN® II (Bio-Rad, USA)
- hmotnostní spektrometr Voyager DE STR (Perseptive Biosystems, USA)
- lékařské rentgenové filmy (MXB Film, Kodak, USA)
- nádoba s jamky pro stripy Multiphor II (Pharmacia Biotech, Švédsko)
- nádoby pro gradientový gel (Gradient former, model 385, Bio-Rad, USA)
- peristaltická pumpa Pump P-1 (GE Healthcare, USA)
- přístroj na měření optické denzity (Absorbance Microplate Reader ELx800™, BioTek, USA)
- sonikátor (Bandelin Sonorex, UK)
- „speedvak“ (Sevant SPD 121 P, Thermo Scientific, USA)
- termostat na udržování teploty při běhu dvourozměrné elektroforézy RCB-20 (Hoefler, USA)
- třepačka TTS 3 digital (IKA Works, USA)
- třepačka OS-10 Orbital Shaker (Biosan, USA)
- ultrasonikátor (Tesla, ČSSR)
- vortex WX (Velp Scientifica, Itálie)
- vyvolání filmů – Optimax (Fomei, Rumunsko)
- zdroj napětí CONSORT E844 (Scie-Plas, UK)
- zdroj napětí EPS 3501 XL (Amersham Biosciences, USA)

Na zpracování výsledků, které byly získané při měření optické denzity, byl použitý software Gen5TM (BioTek, USA). Na úpravu obrázku byl použitý software na zpracování fotografií Adobe Photoshop[®] CS4 Version 11.0 (Adobe, USA).

4 Výsledky

4.1 Vliv tepelného zpracování na IgE reaktivitu bílkovin v pšeničných produktech

4.1.1 Příprava extraktů a stanovení koncentrace proteinů

Využitím extrakčních metod vypracovaných v laboratoři MUDr. Kainarovou, které jsou popsány v podkapitole 3.3, jsme připravili PBS extrakty (frakce proteinů dobře rozpustné v solných roztocích) a SDS extrakty (málo rozpustné frakce proteinů) z pšeničných produktů a technologických meziproduktů chleba (výchozí mouka, syrové těsto, vařené těsto, kůrka a dřev) a rohlíku (výchozí mouka, syrové těsto, vařené těsto a hotový rohlík).

V každém z PBS extraktů jsme stanovili koncentraci pšeničných proteinů pomocí komerčního kitu BCA. U SDS extraktů jsme stanovili koncentraci pšeničných proteinů pomocí Bredfordové metody. Koncentrace všech extraktů je znázorněna v tabulce 4.1.

Tabulka 4.1 Koncentrace jednotlivých extraktů z různých produktů obsahujících pšenici stanovená pomocí BCA kitu u PBS extraktů a pomocí Bredfordové metody u SDS extraktů.

Produkt	c [mg ml ⁻¹]	
	PBS extrakty	SDS extrakty
chléb – mouka	2,390	1,775
chléb – syrové těsto	1,930	1,239
chléb – vařené těsto	1,024	1,271
chléb – kůrka	1,470	1,004
chléb – dřev	1,210	1,523
rohlík – mouka	1,990	1,381
rohlík – syrové těsto	1,960	1,062
rohlík – vařené těsto	0,881	1,366
rohlík	1,030	1,280

Stanovenou koncentraci v PBS i SDS extraktech jsme následně upravili tak, aby jejich konečná koncentrace byla 2 mg ml^{-1} . Extrakty s nízkou koncentrací jsme zkoncentrovali pomocí acetonu a extrakty s vysokou koncentrací jsme naředili redukcujícím vzorkovým pufrem (viz podkapitola 3.5).

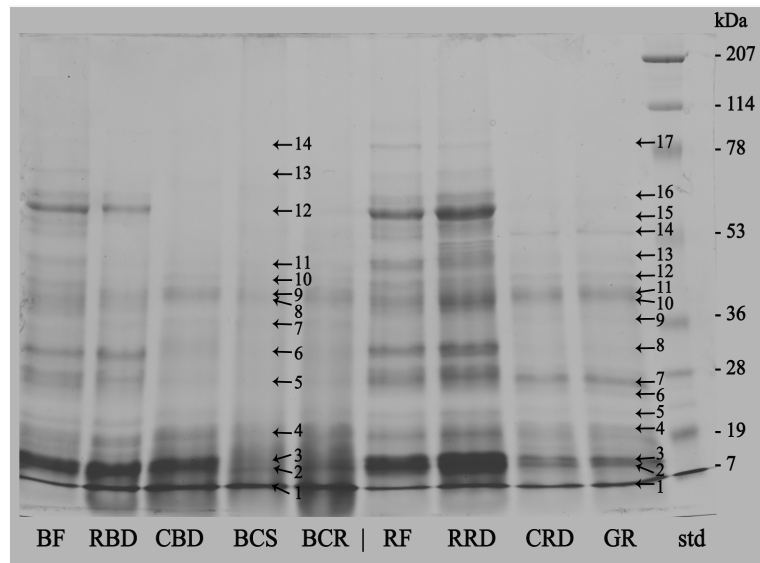
4.1.2 Analýza extrahovaných proteinů v pšeničných produktech

Pomocí jednorozměrné SDS-PAGE elektroforézy, v gradientovém gelu (5% až 20%) za redukčních podmínek, jsme rozdělili pšeničné proteiny PBS a SDS extraktů získaných z jednotlivých stupňů technologické přípravy pšeničných výrobků:

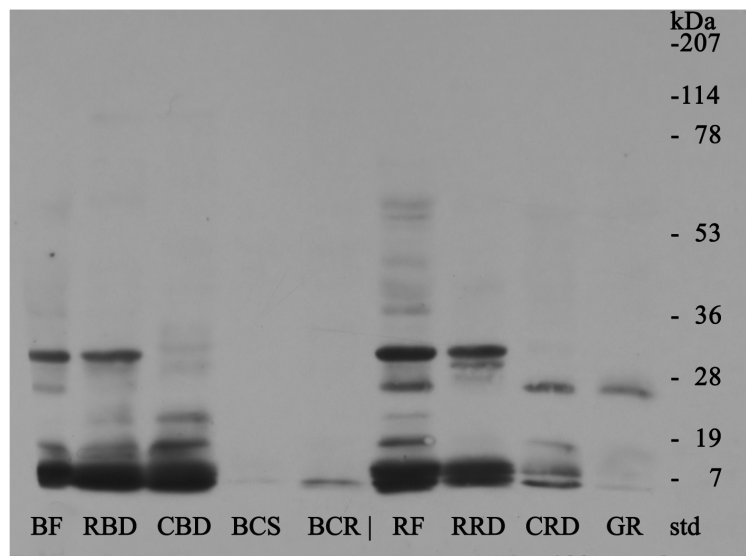
- a) při výrobě chleba – mouka (BF), syrové těsto (RBD), vařené těsto (CBD), kůrka (BCS), střídka (BCR);
- b) při výrobě rohlíku – mouka (RF), syrové těsto (RRD), vařené těsto (CRD) a rohlík (GR). Po rozdělení jsme proteiny v gelech buď obarvili pomocí Coomassie® Brilliant Blue R-250 (viz podkapitola 3.10), nebo jsme je analyzovali pomocí metody western blotu přebílením na nitrocelulózovou membránu a detekovali IgE vázající proteiny se séry jednotlivých pacientů (viz podkapitola 3.11). Tyto IgE vázající proteiny byly pak zviditelněny na RTG filmech jako proužky.

Na obrázku 4.1 je ukázaný obarvený gel s rozdělenými proteiny z PBS extraktů vzorků získaných při výrobě chleba a rohlíku, přičemž rozdělené proteiny jsme očíslovali v PBS extraktech chleba (1 až 14) a rohlíku (1 až 17). Na tomto obrázku je dobře vidět změny ve složení extrahovaných proteinů, které nastaly v průběhu technologického opracování. Mezi ně patří změny v rozpustnosti extrahovaných proteinů, především po tepelné úpravě. Také je vidět, že změny jsou větší u produktech chleba než u produktech rohlíku.

Na obrázku 4.2 je na imunoblotu jako příklad znázorněná specifická IgE reaktivita jednoho pacienta (P4) s proteiny z PBS extraktů chleba a rohlíku. Tento obrázek dokumentuje změny schopnosti rozdělených proteinů vázat IgE protilátky v různých fázích technologického opracování pšeničných proteinů.



Obrázek 4.1 Gel po elektroforetickém rozdělení proteinů z jednotlivých vzorků PBS extraktů chleba a rohlíku; BF – mouka pro výrobu chleba, RBD – syrové těsto pro výrobu chleba, CBD – vařené těsto pro výrobu chleba, BCS – kůrka z chleba, BCR – střídka z chleba, RF – mouka pro výrobu rohlíku, RRD – syrové těsto pro výrobu rohlíku, CRD – vařené těsto pro výrobu rohlíku, GR – hotový namletý rohlík, std – standard.

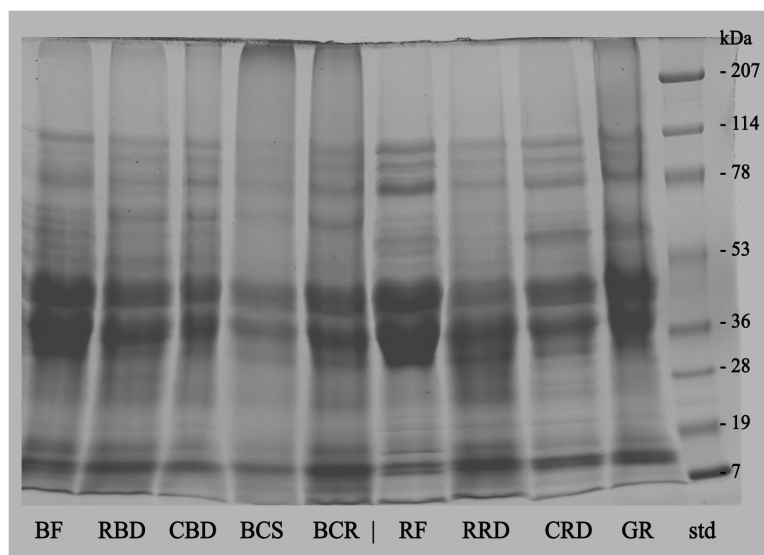


Obrázek 4.2 Imunoblot zobrazující specifickou IgE reaktivitu jednoho pacienta (P4) s proteiny z PBS extraktů chleba a rohlíku; BF – mouka pro výrobu chleba, RBD – syrové těsto pro výrobu chleba, CBD – vařené těsto pro výrobu chleba, BCS – kůrka z chleba, BCR – střídka z chleba, RF – mouka pro výrobu rohlíku, RRD – syrové těsto pro výrobu rohlíku, CRD – vařené těsto pro výrobu rohlíku, GR – hotový namletý rohlík, std – standard.

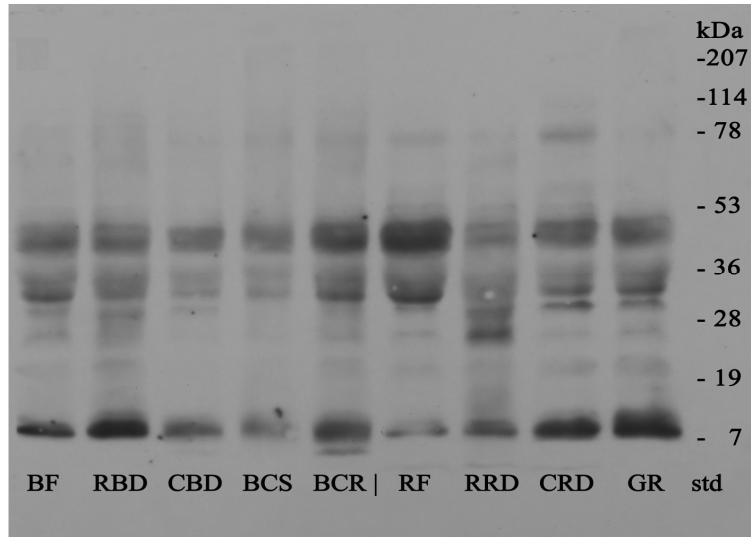
Reakce IgE protilátek ze sér pacientů s pšeničnými proteiny v PBS extraktech chleba a rohlíku se výrazně lišila. V PBS extraktech chleba je vidět, že rozdělené proteiny z mouky (BF) a syrového těsta (RBD) vykazují silnou IgE reaktivitu v oblasti kolem 30 kDa. Tato reaktivita již chybí u proteinů z vařeného těsta (CBD), kůrky (BCS) a střídky (BCR). V oblasti kolem 7 kDa je u mouky (BF), syrového těsta (RBD) a vařeného těsta (CBD) vidět vysokou IgE reaktivitu, zatímco u střídky (BCR) je síla reaktivity slabá a u kůrky (BCS) tato reaktivita chybí. U PBS extraktů rohlíku je vidět IgE reaktivitu s proteiny v oblasti 30 kDa u mouky (RF) a syrového těsta (RRD). V dalších extraktech, vařeného těsta (CRD) a rohlíku (GR), však tato IgE reaktivita mizí podobně jako u chleba. V oblasti kolem 7 kDa je vysoká IgE reaktivita u mouky (RF) a syrového těsta (RRD). Extrakt vařeného těsta (CRD) reagoval s menší intenzitou. U rohlíku se proteiny s touto nízkou molekulovou hmotností vyskytují jen v malém množství. Z toho plyne, že tepelné opracování snižuje rozpustnost i IgE vaznost v PBS extraktech chleba a rohlíku.

Následně po PBS extraktech ze vzorků chleba a rohlíku jsme extrahovali málo rozpustné proteiny do SDS roztoků. Na obrázku 4.3 je zobrazená analýza vzorků po elektroforetickém rozdělení proteinů po technologickém opracování v SDS extraktech chleba a rohlíku. V porovnání s PBS extrakty je vidět, že změny ve složení proteinů po technologickém opracování jsou u SDS extraktů menší. Jediná výrazná změna je viditelná jenom u kůrky chleba, u které došlo k poklesu extrahovaných proteinů v oblasti mezi molekulovými hmotnostmi 36 kDa až 53 kDa.

Na obrázku 4.4 je zobrazená ukázka imunoblotu dokumentující reakci jednoho pacienta (P4) s proteiny z SDS extraktů chleba a rohlíku. Z tohoto obrázku je vidět, že v SDS extraktech rozpustné proteinové komponenty nepodléhají při technologickém opracování významným změnám ve svém složení a do značné míry zůstává také zachována stabilita vazby IgE protilátek a jejich spektrum.



Obrázek 4.3 Gel po elektroforetickém rozdělení proteinů z jednotlivých vzorků SDS extraktů chleba a rohlíku; BF – mouka pro výrobu chleba, RBD – syrové těsto pro výrobu chleba, CBD – vařené těsto pro výrobu chleba, BCS – kůrka z chleba, BCR – střídka z chleba, RF – mouka pro výrobu rohlíku, RRD – syrové těsto pro výrobu rohlíku, CRD – vařené těsto pro výrobu rohlíku, GR – hotový namletý rohlík, std – standard.



Obrázek 4.4 Imunoblot zobrazující specifickou IgE reaktivitu jednoho pacienta (P4) s proteiny z SDS extraktů všech vzorek chleba a rohlíku; BF – mouka pro výrobu chleba, RBD – syrové těsto pro výrobu chleba, CBD – vařené těsto pro výrobu chleba, BCS – kůrka z chleba, BCR – střídka z chleba, RF – mouka pro výrobu rohlíku, RRD – syrové těsto pro výrobu rohlíku, CRD – vařené těsto pro výrobu rohlíku, GR – hotový namletý rohlík, std – standard.

4.1.3 Rozdělení patientských sér podle IgE reaktivity s pšeničnými proteiny

V následujících pokusech jsme se zaměřili na podrobnou analýzu změn reaktivity souborů patientských sér s dobře rozpustnými proteiny v PBS extraktech. Na základě srovnání počtu proužků rozdělených proteinů na obarveném gelu (obrázek 4.1) s filmy imunoblotů zobrazujících IgE reaktivity patientských sér jsme vyhodnotili počty vazebných komponent a sílu specifické interakce. Tak jsme mohli určit individuální rozdíly mezi jednotlivými séry pacientů a současně charakterizovat nejčastěji rozpoznávané, dominantní IgE vázající pšeničné proteiny, rezistentní vůči tepelnému opracování.

Tímto způsobem jsme vyhodnotili IgE reaktivitu v celém souboru 22 pacientů s proteiny chleba (14 proužku s rozdělenými proteiny; obrázek 4.1) a s proteiny rohlíku (17 proužku s rozdělenými proteiny; obrázek 4.1). Jednotlivá patientská séra reagovala s různým počtem proteinů ve vzorcích PBS extraktů pšeničných výrobků. Intenzitu reakce specifických IgE protilátek jednotlivých patientských sér s rozdělenými proteiny jsme vyhodnotili číselnými hodnotami v rozmezí 0 až 3, kde nedetekovaná intenzita byla 0, slabá byla 1, střední byla 2 a silná intenzita byla 3.

Přehled IgE reaktivity sér jednotlivých pacientů s rozdělenými pšeničnými proteiny je znázorněný v tabulce 4.2 pro PBS extrakt z chleba a pro PBS extrakt z rohlíku je znázorněný v tabulce 4.3.

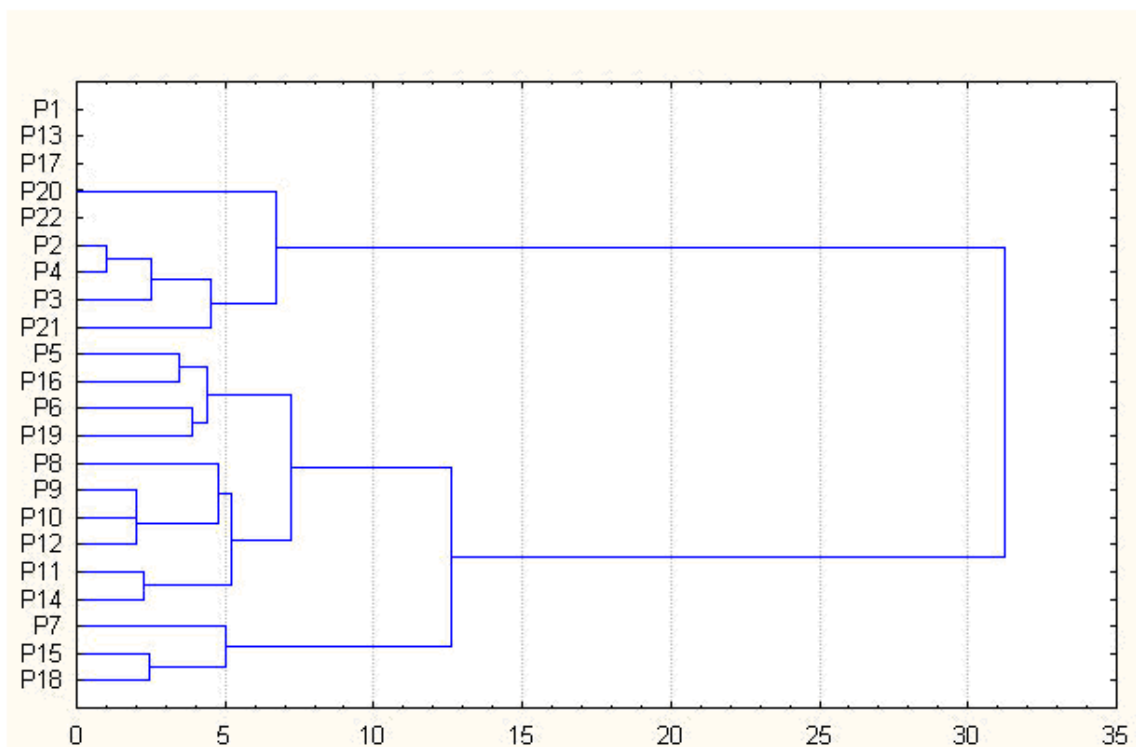
Tabulka 4.2 Specifická IgE reaktivita jednotlivých patientských sér vůči pšeničným proteinům chleba. Intenzita reakce byla rozdělena následujícím způsobem: 0 – nedekovaná intenzita, 1 – slabá intenzita, 2 – střední intenzita a 3 – vysoká intenzita reakce.

		číslo pacienta																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
číslo proužku na blotu	1	0	1	2	2	1	2	3	3	3	3	3	3	0	3	3	1	0	3	2	0	2	0
	2	0	0	0	0	2	2	3	3	3	3	3	3	0	3	3	0	0	3	2	0	0	0
	3	0	0	1	0	2	0	3	0	3	3	2	3	0	3	3	0	0	3	2	0	1	0
	4	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	2	0	2	0
	5	0	0	0	0	0	1	2	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0	2	0
	6	0	0	0	0	0	1	2	1	1	0	0	0	0	0	2	1	0	2	1	0	0	0
	7	0	0	1	0	0	2	2	0	0	1	0	0	0	1	2	0	0	2	1	0	2	0
	8	0	0	0	0	1	2	2	1	1	0	2	1	0	2	3	1	0	3	2	0	0	0
	9	0	0	1	0	1	2	2	0	1	1	2	1	0	2	3	2	0	2	2	0	0	0
	10	0	0	0	0	1	2	3	0	1	1	2	0	0	2	3	1	0	2	2	0	0	0
	11	0	0	0	0	1	2	3	0	1	0	2	0	0	1	3	1	0	2	1	0	0	0
	12	0	0	1	0	1	1	3	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0
	13	0	0	0	0	0	1	3	1	0	0	1	0	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0
	14	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0

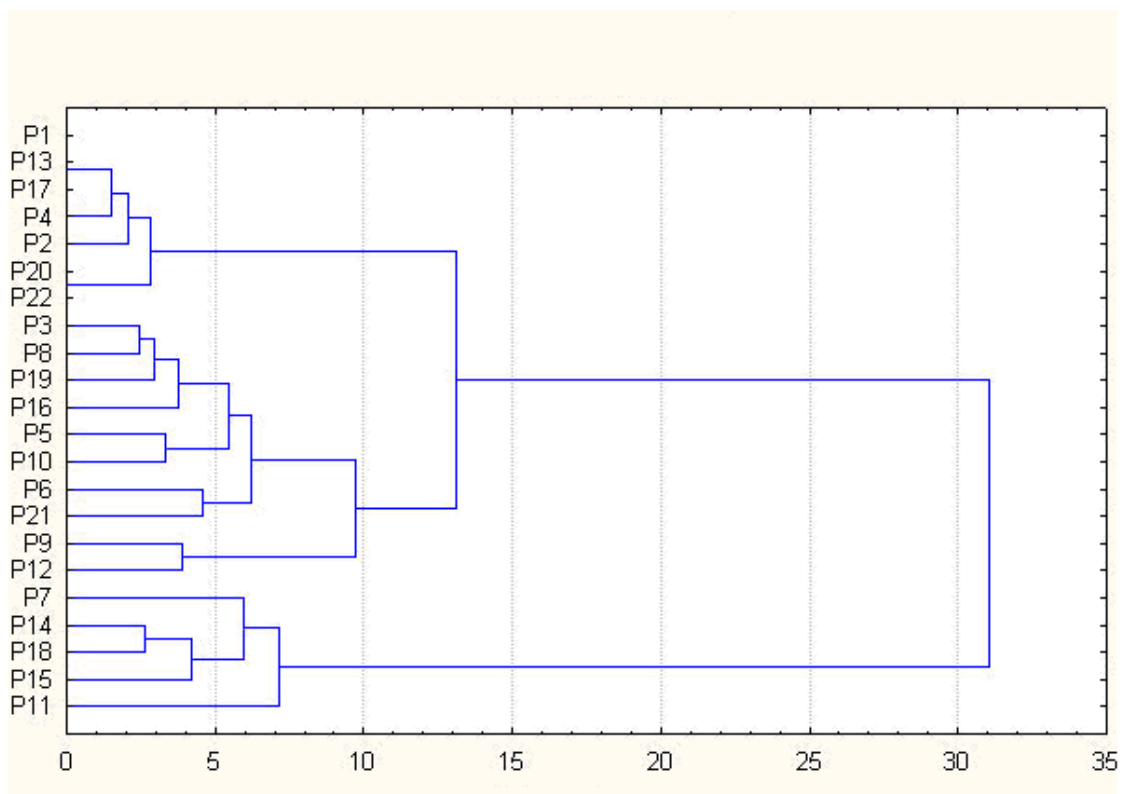
Tabulka 4.3 Specifická IgE reaktivita jednotlivých patientských sér vůči pšeničným proteinům rohlíku. Intenzita reakce byla rozdělena následujícím způsobem: 0 – nedekovaná intenzita, 1 – slabá intenzita, 2 – středná intenzita a 3 – silná intenzita reakce.

		číslo pacienta																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
číslo proužku na blotu	1	0	0	1	0	0	2	3	1	0	0	2	0	0	3	3	0	0	3	1	0	2	0
	2	0	0	0	0	0	1	3	0	3	0	0	3	0	3	3	0	0	3	0	0	0	0
	3	0	1	0	0	0	1	1	0	3	2	3	3	0	3	3	0	0	3	0	0	0	0
	4	0	1	0	0	2	0	1	0	0	2	3	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	1	0	2	0	0	1	2	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
	6	1	1	2	2	2	3	3	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1	2	0	0	1	0
	7	0	0	0	0	2	0	1	1	0	1	1	1	0	2	2	0	0	2	0	0	1	0
	8	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0	1	1	1	3	0	1	1	0	2	3	0	0	2	0	0	2	0
	10	0	0	0	0	1	2	2	1	0	1	3	2	0	3	3	2	0	3	1	0	1	0
	11	0	0	1	0	1	2	2	0	0	1	3	0	0	3	3	2	0	3	1	0	0	0
	12	0	0	1	0	1	2	1	0	1	0	3	0	0	2	3	2	0	2	1	0	0	0
	13	0	0	0	0	1	2	1	0	1	0	2	1	0	2	3	1	0	3	0	0	0	0
	14	0	0	1	0	1	2	2	0	2	1	0	2	0	2	2	0	0	3	1	0	2	0
	15	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	2	0	0	2	2	0	0	3	0	0	2	0
	16	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	1	0	1	2	0	0	2	0	0	0	0
	17	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0

Na základě dat z předcházejících tabulek byly vytvořeny vazebné diagramy pro celý soubor (22 pacientů) Wardovou metodou. Na obrázku 4.5 je zobrazený vazebný diagram charakterizující míru podobnosti IgE reaktivity (počet komponent a síly reakce) s proteiny z PBS extraktu chleba. Na obrázku 4.6 je zobrazený vazebný diagram IgE reaktivity stejných pacientů pro PBS extrakt z rohlíku.



Obrázek 4.5 Stromový diagram reaktivity 22 pacientů na vzorek PBS extraktu z hotového chleba. Osa Y zobrazuje pacienty a osa X znázorňuje vazebnou vzdálenost.



Obrázek 4.6 Stromový diagram reaktivity 22 pacientů na vzorek PBS extraktu z hotového rohlíku. Osa Y zobrazuje pacienty a osa X znázorňuje vazebnou vzdálenost.

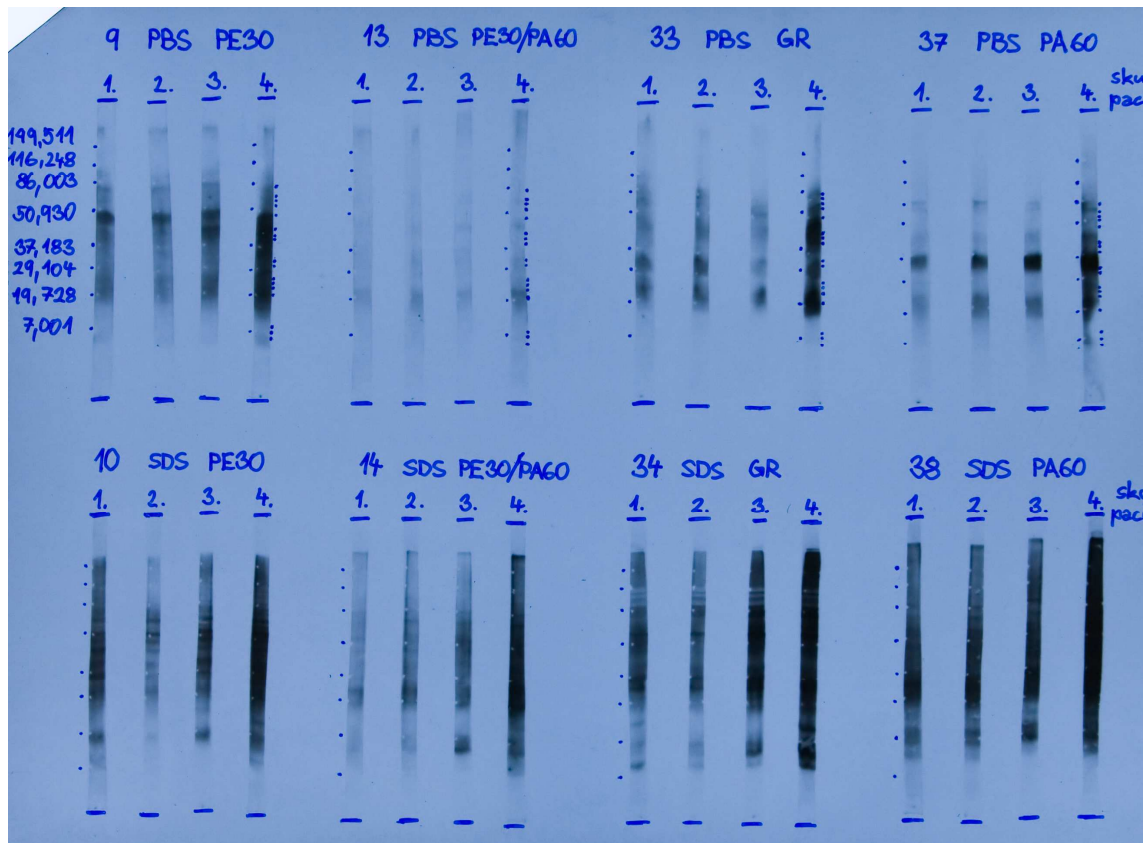
Na základě vytvořených vazebných diagramů jsme soubor 22 pacientů rozdělili do čtyř skupin. První skupinou jsou pacienti, kteří nereagovali s PBS extrakty chleba vůbec. Do této skupiny patří pacienti P1, P13, P17, P20 a P22. Do druhé skupiny patří pacienti P2, P4, P3 a P21, kteří reagovali s 1 až 5 proužky a intenzita reakce byla 1 až 2. Do třetí skupiny patří pacienti P5, P16, P6, P19, P8, P9, P10, P12, P11 a P14, kteří reagovali s 5 až 13 proužky, přičemž intenzita reakce měla jenom málokdy hodnotu 3. Do čtvrté skupiny patří pacienti P7, P15 a P18, kteří reagovali s 13 a více proužky a intenzita reakce mnohokrát dosahovala hodnoty 3.

Při hodnocení IgE reaktivity s PBS extrakty rohlíku jsou první skupinou pacienti P1, P13, P17, P4, P2, P20 a P22, kteří buď nereagovali vůbec, nebo reagovali jenom s 1 až 3 proužky, přičemž intenzita reakce nepřekročila hodnotu 1, s výjimkou pacienta P4, který reagoval jednou s intenzitou 2. Do druhé skupiny patří pacienti P3, P8, P19, P16, P5 a P10, kteří reagovali s 5 až 9 proužky a intenzita reakce nikdy nepřesáhla hodnotu 2. Do třetí skupiny patří pacienti P6, P21, P9 a P12, kteří reagovali se 7 až 11 proužky a intenzita reakce byla v rozmezí 1 až 3, přičemž hodnotu 3 dosáhl třikrát jenom pacient P9. Do čtvrté skupiny patří pacienti P7, P14, P18, P15 a P11, kteří reagovali s 12 až 17 proužky a intenzita reakce častokrát dosahovala hodnoty 3.

4.2 Vliv enzymatického opracování na alergenicitu pšeničných produktů

Po rozdělení patientských sér do čtyř skupin na základě vazebné analýzy jsme smíchali jednotlivá séra pacientů z každé skupiny ve stejném poměru. Takto připravená směsná séra jsme použili pro analýzu rezistence potenciálních pšeničných alergenů vůči působení trávicích enzymů – pepsinu a pankreatinu. Pro analýzu jsme použili následující vzorky PBS extraktů: rohlík (GR), rohlík natrávený pepsinem po dobu 30 minut (PE30), pankreatinem po dobu 60 minut (PA60) a rohlík natrávený nejdříve pepsinem po dobu 30 minut a následně pankreatinem po dobu 60 minut (PE/PA). Pak jsme vzorky proteinů rozdělili jednorozměrnou SDS-PAGE elektroforézou, v gradientovém gelu (5% až 20%) za redukčních podmínek. Rozdělené proteiny jsme v gelech buď obarvili pomocí Coomassie[®] Brilliant Blue R-250 (viz podkapitola 3.10),

nebo jsme přenesli proteiny na nitrocelulóзовou membránu a detekovali IgE vázající proteiny se čtyřmi směsnými séry pacientů (viz podkapitola 3.11). Tyto IgE vázající proteiny byly pak zviditelněny na RTG filmech (viz obrázek 4.7).



Obrázek 4.7 IgE reaktivita směsných patientských sér (1 až 4) se vzorky rohlíku (GR), rohlíku natráveného pepsinem po dobu 30 minut (PE30), pankreatinem po dobu 60 minut (PA60) a rohlíku natráveného nejdřív pepsinem po dobu 30 minut a pak pankreatinem po dobu 60 minut (PE30/PA60). Kvalita obrázku je vyšší v reálné podobě (na filmu).

K jednotlivým proužkům s proteiny jsme přiřadili molekulové hmotnosti a vyhodnotili jsme intenzitu reakce se směsnými séry 1 až 4 obdobným způsobem jako u tepelně opracovaných produktů chleba a rohlíku, tj. číselnými hodnotami v rozmezí 0 až 3, kde nedetekovaná intenzita byla 0, slabá byla 1, střední byla 2 a silná intenzita byla 3. Výsledky, které jsme takto dosáhli, jsou uvedeny v tabulce 4.4.

Tabulka 4.4 Reaktivita jednotlivých skupin pacientů s elektroforeticky rozdělenými proteiny u PBS extraktů: rohlíku (GR), rohlíku natráveného pepsinem po dobu 30 minut (PE30), pankreatinem po dobu 60 minut (PA60) a rohlíku natráveného nejdříve pepsinem po dobu 30 minut a následně pankreatinem po dobu 60 minut (PE/PA).

číslo proužku	M _r [kDa]	skupina 1				skupina 2				skupina 3				skupina 4			
		GR	PE30	PA60	PE/PA	GR	PE30	PA60	PE/PA	GR	PE30	PA60	PE/PA	GR	PE30	PA60	PE/PA
1	4,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
2	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
3	8,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
4	19,6	1	1	1	0	1	1	2	1	1	1	2	0	3	3	3	1
5	21,4	2	1	1	0	2	1	2	1	2	1	2	0	3	3	3	1
6	24,4	2	1	1	0	2	1	1	0	1	1	1	0	3	3	3	1
7	26,1	2	1	1	0	2	1	1	0	1	1	1	0	3	3	3	1
8	31,1	2	1	1	0	2	1	1	0	1	1	2	0	3	3	3	1
9	35,7	2	1	2	0	2	1	2	0	1	1	3	0	3	3	3	1
10	39,4	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	2	0	3	3	3	0
11	40,7	1	1	1	0	1	1	1	0	1	2	1	0	3	3	2	0
12	43,6	1	1	1	0	1	1	1	0	1	2	1	0	3	3	2	0
13	48,8	1	2	0	0	1	2	0	0	1	2	0	0	3	3	2	0
14	53,1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	3	2	2	0
15	58	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	2	2	2	0
16	64,3	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	2	1	3	0
17	83,1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	2	1	3	0

M_r – molekulová hmotnost.

Z porovnání IgE reaktivity směsných sér pacientů čtyř skupin s PBS extrakty je zřejmé, že intenzita vazby sér skupin 1 až 3 poklesla po působení jednotlivých enzymů. Po postupném natrávení pšeničných proteinů pepsinem a pankreatinem byla vazba těchto sér nepatrná (směsné séra druhé skupiny) až nulová (směsné séra skupin 1 a 3). U čtvrté skupiny sér se zachovala vysoká intenzita vazby IgE protilátek po působení jednotlivých enzymů a byla také částečně zachována i po působení obou enzymů a to konkrétně u šesti proteinů v rozmezí molekulových hmotností 19,6 kDa až 35,7 kDa.

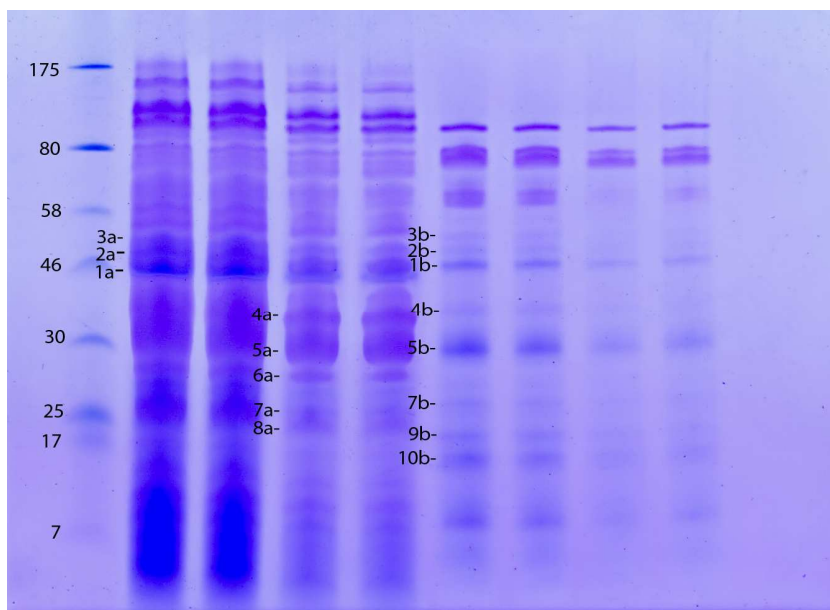
Na základě intenzity vazby IgE protilátek jednotlivých směsných sér s proteiny PBS extraktů jsme pro další práci vybrali směs sér pacientů ze čtvrté skupiny. Tato skupina totiž reagovala nejvíce ze všech skupin s rozdělenými proteiny z PBS extraktů, jak po technologickém opracování, tak po působení trávicích enzymů. Pro identifikaci

potenciálních IgE vázajících pšeničných proteinů hmotnostní spektrometrií jsme vybrali PBS extrakt rohlíku (GR) a stejný extrakt natrávený pepsinem po dobu 30 minut (PE30) s nejvíc zastoupenými vazebnými proteiny.

4.3 Identifikace IgE vázajících pšeničných proteinů metodami hmotnostní spektrometrie

4.3.1 Příprava pšeničných proteinů pro hmotnostní spektrometrii z jednorozměrné elektroforézy

Nejprve jsme hmotnostní spektrometrií identifikovali pšeničné proteiny v původních PBS extraktech rohlíku (GR) o koncentraci 2 mg ml^{-1} a extraktu natráveným pepsinem po dobu 30 minut (PE30). IgE vázající pšeničné proteiny jsme vybrali na základě reakcí s patientskými séry ze čtvrté skupiny na imunoblotu. Pro lepší identifikaci jsme koncentraci PBS extraktů upravili zahuštěním acetonovou metodou (viz podkapitola 3.5) tak, že vzorek GR byl zahuštěn 2,5x a vzorek PE30 byl zahuštěn 2,5x a 5,0x. Proteiny ve vzorcích jsme pak rozdělili pomocí jednorozměrné SDS-PAGE elektroforézy, v gradientovém gelu (5% až 20%) za redukčních podmínek. Rozdělené proteiny v gelu jsme obarvili pomocí Coomassie[®] Brilliant Blue R-250 (viz podkapitola 3.10). Na obarveném gelu jsme pak vyznačili proteiny určené k identifikaci hmotnostní spektrometrií. Označené proteiny jsme pak vyřezali z gelu, zpracovali podle postupu v podkapitole 3.12 a následně byly identifikovány v laboratoři hmotnostní spektrometrie. Proteiny, které jsme vyřezali, jsou zobrazené na obrázku 4.8.



Obrázek 4.8 Gel po elektroforetickém rozdělení proteinů ze vzorků PBS extraktů rohlíku (GR) a rohlíku po natrávení pepsinem po dobu 30 minut (PE30). Rozložení proužků zleva: standard s molekulovými hmotnostmi, pak dva proužky s proteiny rohlíku (zahuštěný 2,5x), dva proužky s proteiny rohlíku (nezahuštěný), dva proužky s proteiny rohlíku po natrávení pepsinem po dobu 30 minut (zahuštěný 5x) a dva proužky s proteiny rohlíku po natrávení pepsinem po dobu 30 minut (zahuštěný 2,5x).

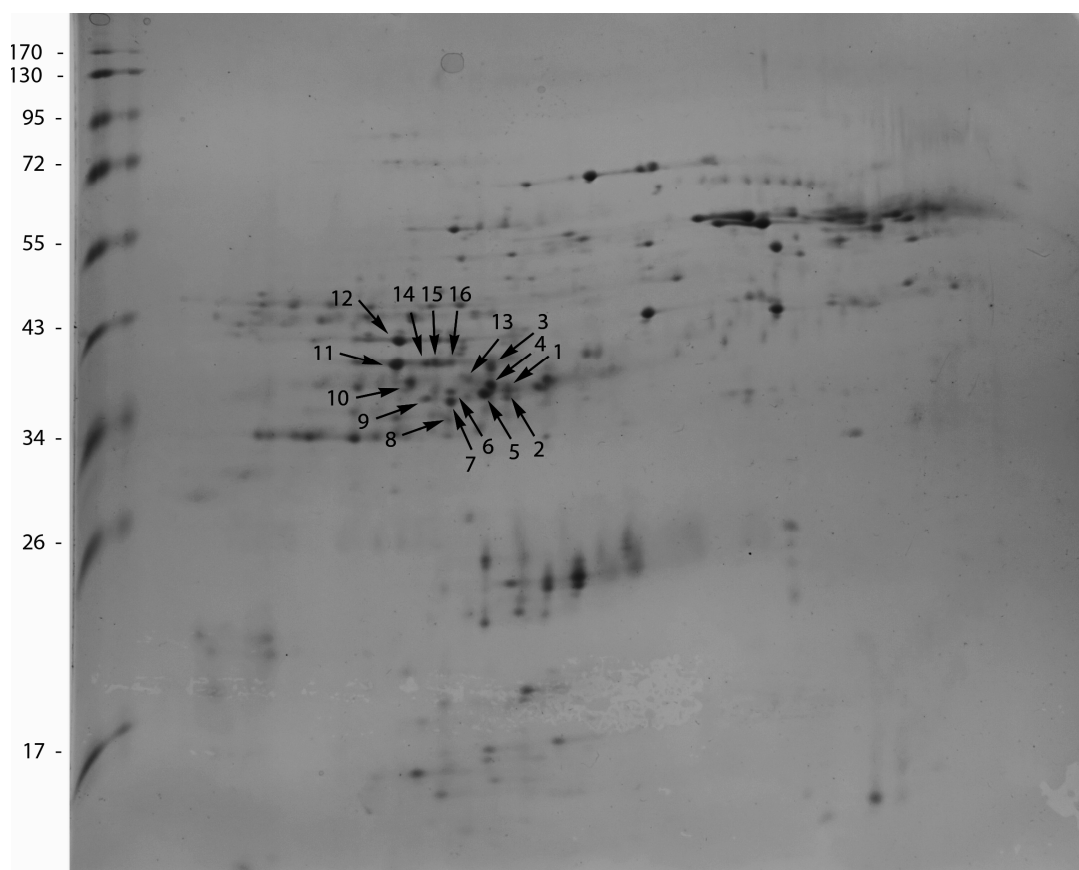
Pro identifikaci jsme vybrali 3 proužky proteinů z PBS extraktu rohlíku (zahuštěného 2,5x) a 5 proužků s proteiny z PBS extraktu rohlíku (nezahuštěného). Po natrávení pepsinem jsme dali na identifikaci 8 proteinů z extraktu, který byl zahuštěný 5x, protože proteiny ve stejném vzorku zahuštěném 2,5x byly vidět jen slabě.

4.3.2 Příprava pšeničných proteinů pro hmotnostní spektrometrii z dvourozměrné elektroforézy

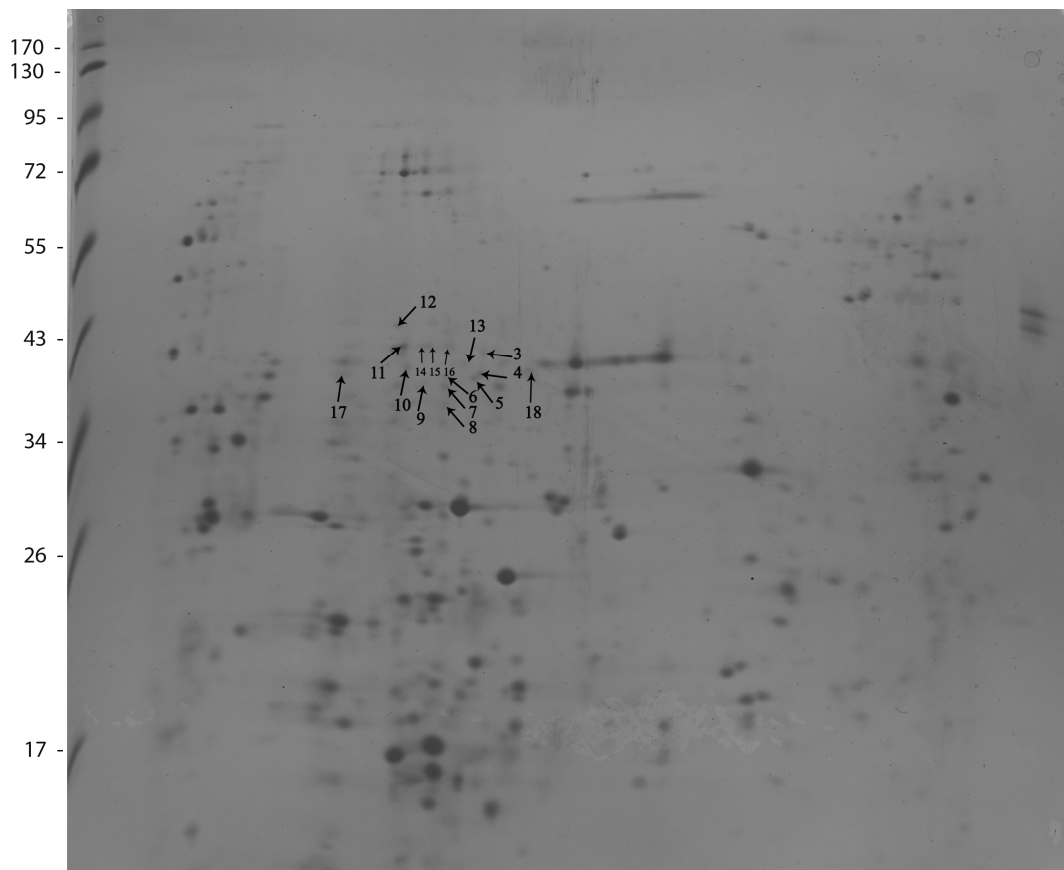
Výrazné změny ve složení proteinů po natrávení enzymy jsme zaznamenali v oblasti kolem molekulové hmotnosti 40 kDa. Abychom tyto změny více charakterizovali, použili jsme dvourozměrnou elektroforézu pro lepší rozdělení proteinů v PBS extraktech rohlíku a rohlíku natráveného pepsinem po dobu 30 minut. Koncentraci proteinů v extraktech jsme upravili pomocí rehydratačního roztoku RTS-D tak, aby jejich výsledná koncentrace v nanášeném objemu na jeden strip byla 200 μg v objemu

350 μ l (viz podkapitola 3.9). Po rozdělení proteinů izoelektrickou fokuscí, jsme dále proteiny rozdělili na SDS-PAGE elektroforéze (12% gel). Rozdělené proteiny jsme v gelech buď obarvili pomocí Coomassie[®] Brilliant Blue R-250 (viz podkapitola 3.10), anebo jsme je přenesli na nitrocelulózovou membránu a detekovali IgE vázající proteiny se směsným sérem pacientů ze čtvrté skupiny (viz podkapitola 3.11). IgE vázající proteiny byly pak zviditelněny na RTG filmech jako „spoty“, na které se vážali protilátky z patientských sér. Podle intenzity reakce IgE protilátek na imunoblotu jsme z gelu vyřezali odpovídající spoty proteinů pro identifikaci hmotnostní spektrometrií.

Gel s vyznačenými proteiny v PBS extraktu rohlíku, resp. v PBS extraktu natráveném pepsinem, které jsme identifikovali, je zobrazený na obrázku 4.9, resp. na obrázku 4.10.



Obrázek 4.9 Gel s fleky proteinů z PBS extraktu rohlíku. Na ose Y jsou znázorněné molekulové hmotnosti proteinů ze standardu.



Obrázek 4.10 Gel s fleky proteinů z PBS extraktu rohlíku natráveného pepsinem po dobu 30 minut. Na ose Y jsou znázorněné molekulové hmotnosti proteinů ze standardu.

Z gelu dvourozměrné elektroforézy PBS extraktu rohlíku jsme vyřezali 16 spotů proteinů, resp. 18 spotů z gelu PBS extraktu po natrávení pepsinem. Molekulové hmotnosti všech proteinů vyřezaných k identifikaci byly v rozmezí 34 až 43 kDa.

V současné době probíhá identifikace pšeničných proteinů v laboratoři hmotnostní spektrometrie Mikrobiologického Ústavu AV ČR, přičemž pro úplnou identifikaci proteinů z našich vzorků bude potřebná jejich další úprava, například zvýšení koncentrace proteinů. Přestože proteiny nemáme dosud identifikované je zajímavé, že po opracování vzorku pepsinem přibyly dva nové IgE vázající proteiny označené čísly 17 a 18; a naopak ubyly tři proteiny označené čísly 14, 15, 16 (viz obrázek 4.10).

4.3.3 Proteiny identifikované hmotnostní spektrometrií

Identifikace jednotlivých proteinů z jednorozměrné elektroforézy a z dvourozměrné elektroforézy se dělala na hmotnostním spektrometru MALDI-FTMS APEX-Ultra (Bruker Daltonics, SRN).

Po jednorozměrné elektroforéze se nám podařilo v PBS extraktech rohlíku a rohlíku natráveného pepsinem identifikovat proteiny (viz tabulka 4.5), které vážou IgE protilátky ze sér alergických pacientů.

Tabulka 4.5 Identifikované proteiny PBS extraktů rohlíku a rohlíku natráveného pepsinem.

jméno identifikovaného proteinu (uvedeno v angličtině)	přístupové číslo v databáze	M_r [kDa]	sekvenční pokrytí [%]	počet označených peptidů
α -amylase inhibitor 0.19	P011085	13,34	24,2	2
α -amylase inhibitor 0.53	P011084	13,19	25,8	2
γ -gliadin	ABO37959	16,21	11,7	1
globulin 3	ACJ65514	66,35	7,1	4
gliadin/avenin-like seed protein	ADA62372	22,37	8,5	1
putative avenin-like A precursor	CAJ32654	18,43	8,9	3
serpin-Z2A	Q9ST57	43,31	17,3	5
serpin-Z2B	P93692	42,95	20,1	6
ovalbumin/serpin B14	P01012	42,88	32,4	8

M_r – molekulová hmotnost.

Metodami hmotnostní spektrometrie byly prvně identifikovány proteiny v PBS extraktech, které jsou zobrazené na obrázku 4.1. Pro doplnění těchto proteinů byla zaměřená analýza v zahuštěných vzorcích, které jsou zobrazené na obrázku 4.8. Dříve identifikované proteiny v PBS extraktech jsou pro srovnání znázorněny v tabulce 4.6.

Tabulka 4.6 Souhrn proteinů identifikovaných z PBS extraktů po tepelném a enzymatickém opracování.

jméno identifikovaného proteinu (uvedeno v angličtině)	přístupové číslo v databáze	M _r [kDa]	sekvenční pokrytí [%]	počet označených peptidů
granule-bound starch synthase 1 (chloroplast precursor)	P09842	66,2	26,5	9
granule-bound starch synthase 1	P27736	67,8	24,1	10
β-amylase	P16098	59,6	17,6	5
β-amylase	AAP80614	30,9	16	4
α-amylase inhibitor 0.19	P01085	13,3	47,6	3
serpin-Z1B	P93693	43	21,1	5
serpin-Z2B	P93692	42,9	10,8	3
serpin-Z1A	Q41593	43,1	11,8	4
serpin-Z2A	Q9ST57	43,3	13,8	4
γ-gliadin	ABO37959	16,21	11,7	1
α-amylase inhibitor 0.19	P01085	13,3	48,4	3
granule-bound starch synthase 1 (chloroplastic/amyloplastic)	P09842	66,2	11,9	5
triticin precursor	AAB27108	57	8,6	3

M_r - molekulová hmotnost.

Srovnáním proteinů identifikovaných v této práci s dříve identifikovanými proteiny je patrné, že u obou identifikací jsou přítomné proteiny z rodin α-amylázových inhibitorů a serpinů. Můžeme tedy předpokládat, že proteiny z těchto rodin zůstávají rezistentní nejen po tepelné úpravě pšeničných produktů, ale i po působení trávicích enzymů. Nové proteiny, které jsme identifikovali, patří do aveninové rodiny proteinů.

V současné době se pracuje na identifikaci proteinů v SDS extraktech pšeničných proteinů.

5 Diskuze

Výskyt potravinové alergie má v posledních letech stále stoupající tendenci. Potravinová alergie postihuje zejména děti, u kterých v prvních letech života dosahuje prevalence hodnoty až 6 procent (SAMPSON 2003). U dospělých je výskyt potravinové alergie nižší (SEITZ et al. 2008). Toto onemocnění sebou přináší komplikace ve stravování, čímž se výrazně ovlivní i kvalita života pacienta trpícího potravinovou alergií. Mezi šest hlavních potravin vyvolávajících potravinovou alergii patří i pšenice.

V diagnostice potravinové alergie na pšeničné složky se dosud používají výlučně komerční extrakty s ve vodě rozpustnými proteiny připravené z pšeničné mouky (odpovídající PBS extraktu), které neodrážejí skutečnou situaci, protože IgE protilátky reagují i s nerozpustnými proteiny a navíc člověk přijímá pšeničné proteiny v surové podobě jenom v omezené míře. Většinou přijímá tyto proteiny po technologickém opracování, které má významný vliv na vazbu IgE protilátky alergických pacientů. Právě technologické opracování, jako například zvýšená teplota, může zvyšovat nebo snižovat alergenicitu jednotlivých pšeničných proteinů (MILLS et al. 2009; PASCHKE 2009; SATHE a SHARMA 2009).

V této práci jsme analyzovali vliv technologického opracování na rozpustnost proteinů v PBS extraktech (rozpustné frakce proteinů) a v SDS extraktech (nerozpustné frakce proteinů). Proteiny jsme extrahovali metodami vyvinutými MUDr. Andreou Kainarovou, které byly mírně modifikované oproti běžným extrakčním postupům (CONSTANTIN et al. 2005; SIMONATO et al. 2001a).

Pozorovali jsme, že po tepelné úpravě dochází v PBS extraktů ke snížení rozpustnosti pšeničných proteinů. Tento pokles rozpustnosti proteinů je způsoben tím, že pod vlivem tepelné úpravy mohou proteiny agregovat, měnit svou konformaci (hlavně u tepelně nestabilních proteinů), čímž dochází k rozkladu konformačních epitopů, přičemž ale může docházet i k odkrytí nových epitopů (NOWAK-WEGRZYN a FIOCCHI 2009).

Pozorovali jsme také pokles IgE reaktivity pacientů s proteiny PBS extraktu po jednotlivých stupních tepelného opracování (surové těsto, vařené těsto). U rozpustných proteinů extrahovaných chleba jsme pozorovali, že došlo k výraznému poklesu IgE reaktivity pacientů po tepelné úpravě (pečení). Tyto výsledky potvrzuje práce (DE

GREGORIO et al. 2009), ve které pozorovali pokles IgE reaktivity s proteiny z chleba a vařených těstovin o 50 % v porovnání se syrovou moukou. V rozporu s našimi dosaženými výsledky je práce (SIMONATO et al. 2001b), která tvrdí, že při tepelném opracování nedochází k poklesu IgE reaktivity pacientů. V našich experimentech nedocházelo k poklesu IgE reaktivity jenom u nerozpustných proteinů (SDS extrakty). Podobné výsledky jsme dosáhli i u jednotlivých stupňů technologického opracování rohlíku.

V další části práce jsme se zaměřili na porovnání IgE odpovědi souboru 22 pacientů, kteří měli atopický ekzém a zvýšenou hladinu specifických IgE protilátek k pšeničným proteinům. Provedli jsme analýzu specifity IgE protilátek pacientů studovanou s PBS extrakty chleba a rohlíku. Dosažené výsledky analýzy (intenzita IgE reakce a počet vazebných složek pro jednotlivé pacienty) jsme vyhodnotili Wardovou metodou vazebných diagramů pro chleba a rohlík. Na základě vazebné vzdálenosti, která popisuje příbuznost pacientů, jsme rozdělili pacienty do čtyř skupin.

Trávicí enzymy patří k dalším důležitým vlivům, které mohou snižovat schopnost pšeničných proteinů vázat IgE protilátky. Působením pepsinu a pankreatinu jsme opracovali PBS a SDS extrakty rohlíku. Zjistili jsme, že po působení pepsinu i pankreatinu klesá vazebná aktivita IgE protilátek u rozpustných frakcí proteinů (PBS extrakty) a zachovává se u nerozpustných frakcí proteinů (SDS extrakty). Autoři v práci (SIMONATO et al. 2001b) prezentují, že u chleba nedochází k poklesu reaktivity IgE protilátek vůči proteinovým komponentám. Další autoři (DE ZORZI et al. 2007) sledovali vliv zvyšování teploty (sušení) na schopnost pepsinu a pankreatinu natrávit vzorky těstovin obsahujících pšeničné komponenty. Pozorovali, že sušení vzorků při teplotě 180 °C nesnížilo reaktivitu IgE protilátek s pšeničnými proteiny, což potvrzují i naše výsledky u rohlíku (teplota pečení byla 270 °C), u kterých jsme nepozorovali pokles IgE reaktivity po působení pepsinu a pankreatinu. Pozorovali jsme však výrazný pokles reaktivity IgE protilátek u proteinů z PBS extraktů po působení obou enzymů (nejdříve pepsinu 30 minut a pak pankreatinu 60 minut). Proteiny z SDS extraktů (nerozpustná frakce) si zachovaly schopnost vázat IgE protilátky po působení obou enzymů aplikovaných jednotlivě i společně. Je to dané tím, že při tepelné úpravě dochází k tvorbě nerozpustných proteinových agregátů (SINGH 2005), které jsou dobře odolné vůči působení trávicích enzymů.

Séra pacientů patřící do čtvrté skupiny jsme použili pro výběr IgE vázajících proteinů ze vzorků rohlíku před a po opracování pepsinem. Podařilo se nám hmotnostní

spektrometrií identifikovat řadu proteinů. Mezi proteiny, které nebyly identifikované ze syrové mouky patří: α -amylázový inhibitor 0.53, globulin 3 a serpin-B14. Dále byly identifikované α -amylázový inhibitor 0.19 a γ -gliadin, které byly popsány v práci autorů (ŠOTKOVSKÝ et al. 2008). Identifikovali jsme i proteiny z aveninové rodiny, které byly zjištěny v extraktu chleba (DE GREGORIO et al. 2009). Nové alergeny, které se nám podařilo identifikovat, by mohly být (spolu s dříve identifikovanými alergeny) použité pro doplnění diagnostických testů, a to po ověření jejich biologické aktivity v kožních (SPT) a buněčných testech (BAT).

6 Závěr

1. V laboratoři jsme připravili PBS extrakty (frakce proteinů dobře rozpustných v solných roztocích) a SDS extraktů (málo rozpustné frakce proteinů) z technologicky opracovaných a konečných pšeničných produktů: chleba (výchozí mouka, syrové těsto, vařené těsto, kůrka a dřev) a rohlíku (výchozí mouka, syrové těsto, vařené těsto a rohlík).
2. Pomocí jednorozměrné SDS-PAGE elektroforézy, v gradientovém gelu (5% až 20%) za redukčních podmínek, jsme rozdělili pšeničné proteiny v připravených PBS a SDS extraktech.
3. Metodou imunoblotu jsme charakterizovali škálu pšeničných proteinů, které byly po tepelném opracování rozpoznány IgE protilátkami v souboru 22 pacientů. Na základě intenzity a počtu IgE vázajících proteinů jsme vytvořili vazebné diagramy pro PBS extrakty chleba a rohlíku Wardovou metodou. Ta nám umožnila roztrdit pacienty na základě jejich příbuznosti do čtyř skupin. Pro každou skupinu pacientů jsme připravili směsné sérum.
4. Pak jsme analyzovali potenciální rezistenci pšeničných alergenů vůči působení trávicích enzymů. Použili jsme předem připravené PBS extrakty, které jsme natrávili pepsinem nebo pankreatinem. Proteiny jsme rozdělili jednorozměrnou elektroforézou a vyhodnotili jsme intenzitu IgE reaktivity se směsnými séry obdobným způsobem jako u tepelně opracovaných produktů. Pouze u séra pacientů skupiny 4 byla zachována IgE reaktivita i po enzymatickém opracování extraktů proteinů z pšeničných produktů. Proto jsme reakci s tímto sérem použili pro výběr proteinů pro hmotnostní spektrometrii.
5. IgE vázající pšeničné proteiny z PBS extraktů před a po enzymatickém opracování jsme rozdělili jednorozměrnou, resp. dvourozměrnou elektroforézou. Proteiny v gelu jsme obarvili, vyřezali a dále zpracovali pro identifikaci hmotnostní spektrometrií.

6. Bylo identifikováno celkem 23 IgE vázajících proteinů, z toho 9 proteinů bylo doplněno po zakoncentrování vzorků. Pomocí dvourozměrné elektroforézy, v kombinaci s vazbou patientských IgE protilátek, se nám podařilo charakterizovat změny imunogenicity proteinů v oblasti kolem 40 kDa u vzorek pšeničného produktu před a po opracování pepsinem.

Použitá literatura

Aalberse, R.C.; Akkerdaas, J.H.; van Ree, R. (2001): Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. *Allergy* 56, 478–490.

Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pillai, S. (2007): *Cellular and Molecular Immunology*. 6th edition. Philadelphia, Saunders.

Abeck, D.; Mempel, M. (1998): *Staphylococcus aureus* colonization in atopic dermatitis and its therapeutic implications. *British Journal of Dermatology* 139, 13–16.

Aihara, M.; Miyazawa, M.; Osuna, H.; Tsubaki, K.; Ikebe, T.; Aihara, Y.; Ikezawa, Z. (2002): Food-dependent exercise-induced anaphylaxis: influence of concurrent aspirin administration on skin testing and provocation. *British Journal of Dermatology* 146, 466–472.

Ball, T.M.; Castro-Rodriguez, J.A.; Griffith, K.A.; Holberg, C.J.; Martinez, F.D.; Wright, A.L. (2000): Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *New England Journal of Medicine* 343, 538–543.

Battais, F.; Mothes, T.; Moneret-Vautrin, D.A.; Pineau, F.; Kanny, G.; Popineau, Y.; Bodinier, M.; Denery-Papini, S. (2005): Identification of IgE-binding epitopes on gliadins for patients with food allergy to wheat. *Allergy* 60, 815–821.

Bernhisel-Broadbent, J.; Dintzis, H.M.; Dintzis, R.Z.; Sampson, H.A. (1994): Allergenicity and antigenicity of chicken egg ovomucoid (Gal d III) compared with ovalbumin (Gal d I) in children with egg allergy and in mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 93, 1047–1059.

Bernhisel-Broadbent, J.; Scanlon, S.M.; Sampson, H.A. (1992): Fish hypersensitivity. I. In vitro and oral challenge results in fish-allergic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 89, 730–737.

Bischoff, S.C.; Krämer, S. (2007): Human mast cells, bacteria, and intestinal immunity. *Immunological Reviews* 217, 329–337.

Björkstén, B. (2001): The epidemiology of food allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 1, 225–227.

Boumiza, R.; Monneret, G.; Forissier, M.-F.; Savoye, J.; Gutowski, M.-C.; Powell, W.S.; Bienvenu, J. (2003): Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD63. *Clinical and Experimental Allergy* 33, 259 – 265.

Böttcher, M.F.; Jenmalm, M.C.; Garofalo, R.P.; Björkstén, B. (2000): Cytokines in breast milk from allergic and nonallergic mothers. *Pediatric Research* 47, 157–162.

Brant, A. (2007): Baker's asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 7, 152–155.

Brenna, O.; Pompei, C.; Ortolani, C.; Pravettoni, V.; Farioli, L.; Pastorello, E. (2000): Technological processes to decrease the allergenicity of peach juice and nectar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 493–497.

Brisman, J. (2002): *Occupational and Environmental Medicine* 59, 498–502.

Brisman, J.; Järvholm, B.; Lillienberg, L. (2000): Exposure-response relations for self reported asthma and rhinitis in bakers. *Occupational and Environmental Medicine* 57, 335–340.

Burks, A.W.; James, J.M.; Hiegel, A.; Wilson, G.; Wheeler, J.G.; Jones, S.M.; Zuerlein, N. (1998): Atopic dermatitis and food hypersensitivity reactions. *Journal of Pediatrics* 132, 132–136.

Burks, A.W.; Laubach, S.; Jones, S.M. (2008): Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121, 1344–1350.

Burks, A.W.; Williams, L.W.; Thresher, W.; Connaughton, C.; Cockrell, G.; Helm, R.M. (1992): Allergenicity of peanut and soybean extracts altered by chemical or thermal denaturation in patients with atopic dermatitis and positive food challenges. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 90, 889–897.

Chapel, H; Haeney, M.; Misbah, S.; Snowden, N. (2006): *Essentials of Clinical Immunology*. 5th edition. Malden, Blackwell Publishing.

Cianferoni, A.; Spergel, J.M. (2009): Food allergy: review, classification and diagnosis. *Allergology International* 58, 457–466.

Clarke, B.C.; Hobbs, M.; Skylas, D.; Appels, R. (2000): Genes active in developing wheat endosperm. *Functional and Integrative Genomics* 1, 44–55.

Cochrane, S.; Beyer, K.; Clausen, M.; Wjst, M.; Hiller, R.; Nicoletti, C.; Szepfalusi, Z.; Savelkoul, H.; Breiteneder, H.; Manios, Y.; Crittenden, R.; Burney, P. (2009): Factors influencing the incidence and prevalence of food allergy. *Allergy* 64, 1246–1255.

Constantin, C.; Huber, W.D.; Granditsch, G.; Weghofer, M.; Valenta, R. (2005): Different profiles of wheat antigens are recognised by patients suffering from Coeliac disease and IgE-mediated food allergy. *International Archives of Allergy and Immunology* 138, 257–266.

Constantin, C.; Quirce, S.; Grote, M.; Touraev, A.; Swoboda, I.; Stoecklinger, A.; Mari, A.; Thalhamer, J.; Heberle-Bors E. Valenta, R. (2008): Molecular and immunological characterization of a wheat serine proteinase inhibitor as a novel allergen in baker's asthma. *Journal of Immunology* 180, 7451–7460.

Cullinan, P.; Lowson, D.; Nieuwenhuijsen, M.J.; Sandiford, C.; Tee, R.D.; Venables, K.M.; McDonald, J.C.; Newman Taylor, A.J. (1994): Work related symptoms, sensitisation, and estimated exposure in workers not previously exposed to flour. *Occupational and Environmental Medicine* 51, 579–583.

Daengsuwan, T.; Palosuo, K.; Phankingthongkum, S.; Visitsunthorn, N.; Jirapongsananuruk, O.; Alenius, H.; Vichyanond, P.; Reunala, T. (2005): IgE antibodies to ω -5 gliadin in children with wheat-induced anaphylaxis. *Allergy* 60, 506–509.

Darsow, U.; Vieluf, D.; Ring, J. (1995): Atopy patch test with different vehicles and allergen concentrations: an approach to standardization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 95, 677–684.

De Gregorio, M.; Armentia, A.; Díaz-Perales, A.; Palacín, A.; Dueñas-Laita, A.; Martín, B.; Salcedo, G.; Sánchez-Monge, R. (2009): Salt-soluble proteins from wheat-derived foodstuffs show lower allergenic potency than those from raw flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 3325–3330.

- De Zorzi, M.; Curioni, A.; Simonato, B.; Giannattasio, M.; Pasini, G. (2007): Effect of pasta drying temperature on gastrointestinal digestibility and allergenicity of durum wheat protein. *Food Chemistry* 104, 353–363.
- Douliez, J.-P.; Michon, T.; Elmorjani, K.; Marion, D. (2000): Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels. *Journal of Cereal Science* 32, 1–20.
- Du Toit, G. (2007): Food-dependent exercise-induced anaphylaxis in childhood. *Pediatric Allergy and Immunology* 18, 455–463.
- Eberlein-König, B.; Varga, R.; Mempel, M.; Darsow, U.; Behrendt, H.; Ring, J. (2006): Comparison of basophil activation tests using CD63 or CD203c expression in patients with insect venom allergy. *Allergy* 61, 1084–1085.
- Eduard, W.; Douwes, J.; Omenaas, E.; Heederik, D. (2004): Do farming exposures cause or prevent asthma? Results from a study of adult Norwegian farmers. *Thorax* 59, 381–386.
- Eigenmann, P.A. (2009): Mechanisms of food allergy. *Pediatric Allergy and Immunology* 20, 5–11.
- Ellman, L.K.; Chatchatee, P.; Sicherer, S.H.; Sampson, H.A. (2002): Food hypersensitivity in two groups of children and young adults with atopic dermatitis evaluated a decade apart. *Pediatric Allergy and Immunology* 13, 295–298.
- Ferenčík, M.; Rovenský, J.; Shoenfeld, Y.; Macha, V. (2005): *Imunitní Systém*. Praha, Grada.
- Fiocchi, A.; Restani, P.; Bernardo, L.; Martelli, A.; Ballabio, C.; D'Auria, E.; Riva, E. (2004): Tolerance of heat-treated kiwi by children with kiwifruit allergy. *Pediatric Allergy and Immunology* 15, 454–458.
- Fritsch, R.; Ebner, C.; Kraft, D. (1997): Allergenic Crossreactivities. Pollens and vegetable foods. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 15, 397–404.
- Fuchs, M. (2005): Mouka – Imunologické reakce přecitlivělosti. *Alergie* 7, 209–216.

Gall, H.; Steinert, M.; Peter, R.U. (2000): Exercise-induced anaphylaxis to wheat flour. *Allergy* 55, 1096–1097.

Gómez Vázquez, M.; Fernández-Redondo, V.; Toribio, J. (2002): Allergic contact eczema/dermatitis from cosmetics. *Allergy* 57, 268–269.

Hansen, S.K.; Ballmer-Weber, B.K.; Lüttkopf, D.; Skov, P.S.; Wüthrich, B.; Bindslev-Jensen, C.; Vieths, S.; Poulsen, L.K. (2003): Roasted hazelnuts – allergenic activity evaluated by double-blind, placebo-controlled food challenge. *Allergy* 58, 132–138.

Hauser, M.; Egger, M.; Wallner, M.; Wopfner, N.; Schmidt, G.; Ferreira, F. (2008): Molecular properties of plant food allergens: a current classification into protein families. *Open Immunology Journal* 1, 1–12.

Hefle, S.L.; Lambrecht, D.M.; Nordlee, J.A. (2005): Soy sauce retains allergenicity through the fermentation/production process. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115, Supplement 1, S32.

Heinemann, C.; Schliemann-Willers, S.; Kelterer, D.; Metzner, U.; Kluge, K.; Wigger-Alberti, W.; Elsner, P. (2002): The atopy patch test – reproducibility and comparison of different evaluation methods. *Allergy* 57, 641–645.

Host, A.; Jacobsen, H.P.; Halken, S.; Holmenlund, D. (1995): The natural history of cow's milk protein allergy/intolerance. *European Journal of Clinical Nutrition* 49, Supplement 1, S13–S18.

Hrubíško, M., Barta, T.; Červenková, D.; Čížnár, P.; Hruškovič, B.; Chovan, L.; Kayserová, H.; Kertys, P.; Lukán, N.; Paulovičová, E.; Potocký, M. (2003): *Alergológia*. Martin, Osveta.

Inomata, N. (2009): Wheat allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 9, 238–243.

Jacobs, J.H.; Meijster, T.; Meijer, E.; Suarhana, E.; Heederik, D. (2008): Wheat allergen exposure and the prevalence of work-related sensitization and allergy in bakery workers. *Allergy* 63, 1597–1604.

Johansson, S.G.O.; O'B Hourihane, J.; Bousquet, J.; Bruijnzeel-Koomen, C.; Dreborg, S.; Haahtela, T.; Kowalski, M.L.; Mygind, N.; Ring, J.; van Cauwenberge, P.; van Hage-Hamsten,

M.; Wüthrich, B. (2001): A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 56, 813–824.

Kalliomäki, M.; Ouwehand, A.; Arvilommi, H.; Kero, P.; Isolauri, E. (1999): Transforming growth factor- β in breast milk: A potential regulator of atopic disease at an early age. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 104, 1251–1257.

Kanagawa, Y.; Matsumoto, S.; Koike, S.; Imamura, T. (2009): Association analysis of food allergens. *Pediatric Allergy and Immunology* 20, 347–352.

Kukkonen, K.; Kuitunen, M.; Haahtela, T.; Korpela, R.; Poussa, T.; Savilahti, E. (2010): High intestinal IgA associates with reduced risk of IgE-associated allergic diseases. *Pediatric Allergy and Immunology* 21, 67–73.

Kulig, M.; Bergmann, R.; Niggemann, B.; Burow, G.; Wahn, U.; The MAS Study Group (1998): Prediction of sensitization to inhalant allergens in childhood: evaluating family history, atopic dermatitis and sensitization to food allergens. *Clinical and Experimental Allergy* 28, 1397–1403.

Kull, I.; Böhme, M.; Wahlgren, C.-F.; Nordvall, L.; Pershagen, G.; Wickman, M. (2005): Breast-feeding reduces the risk for childhood eczema. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 116, 657–661.

Lau, S. (2005): Allergen avoidance as primary prevention. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 28, 17–23.

Laurière, M.; Pecquet, C.; Bouchez-Mahiout, I.; Snégaroff, J.; Bayrou, O.; Raison-Peyron, N.; Vigan, M. (2006): Hydrolysed wheat proteins present in cosmetics can induce immediate hypersensitivities. *Contact Dermatitis* 54, 283–289.

Leung, D.Y.; Sampson, H.A.; Yunginger, J.W.; Burks, A.W., Jr.; Schneider, L.C.; Wortel, C.H.; Davis, F.M.; Hyun, J.D.; Shanahan, W.R., Jr. (2003): Effect of anti-IgE therapy in patients with peanut allergy. *New England Journal of Medicine* 348, 986–993.

Lowe, A.J.; Carlin, J.B.; Bennett, C.M.; Abramson, M.J.; Hosking, C.S.; Hill, D.J.; Dharmage, S.C. (2006): Atopic disease and breast-feeding—cause or consequence? *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117, 682–687.

- MacDonald, T.T.; Monteleone, G. (2005): Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 307, 1920–1925.
- McKeever, T.M.; Lewis, S.A.; Smith, C.; Collins, J.; Heatlie, H.; Frischer, M.; Hubbard, R. (2002): Early exposure to infections and antibiotics and the incidence of allergic disease: A birth cohort study with the West Midlands General Practice Research Database. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 109, 43–50.
- Mehl, A.; Rolinck-Werninghaus, C.; Staden, U.; Verstege, A.; Wahn, U.; Beyer, K.; Niggemann, B. (2006): The atopy patch test in the diagnostic workup of suspected food-related symptoms in children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 118, 923–929.
- Mesa-del-Castillo, M.; Martínez-Cócerca, C.; Caballero, M.L.; Vazquez, L.; Moneo, I. (2004): IgE binding to pepsin-digested water soluble and insoluble wheat proteins. *Allergy* 59, 1229–1232.
- Mills, E.N.C.; Breiteneder, H. (2005): Food allergy and its relevance to industrial food proteins. *Biotechnology Advances* 23, 409–414.
- Mills, E.N.C.; Mackie, A.R. (2008): The impact of processing on allergenicity of food. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 8, 249–253.
- Mills, E.N.C.; Sancho, A.I.; Rigby, N.M.; Jenkins, J.A.; Mackie, A.R. (2009): Impact of food processing on the structural and allergenic properties of food allergens. *Molecular Nutrition and Food Research* 53, 963–969.
- Miyake, Y.; Arakawa, M.; Tanaka, K.; Sasaki, S.; Ohya, Y. (2007): Cross-sectional study of allergic disorders associated with breastfeeding in Japan: The Ryukyus Child Health Study. *Pediatric Allergy and Immunology* 18, 433–440.
- Miyake, Y.; Yura, A.; Iki, M. (2003): Breastfeeding and the prevalence of symptoms of allergic disorders in Japanese adolescents. *Clinical and Experimental Allergy* 33, 312–316.
- Moreno, F.J.; Clemente, A. (2008): 2S albumin storage proteins: What makes them food allergens? *Open Biochemistry Journal* 2, 16–18.

Muraro, A.; Dreborg, S.; Halken, S.; Høst, A.; Niggemann, B.; Aalberse, R.; Arshad, S.H.; von Berg, A.; Carlsen, K.-H.; Duschén, K.; Eigenmann, P.; Hill, D.; Jones, C.; Mellon, M.; Oldeus, G.; Oranje, A.; Pascual, C.; Prescott, S.; Sampson, H.; Svartengren, M.; Vandenplas, Y.; Wahn, U.; Warner, J.A.; Warner, J.O.; Wickman, M.; Zeiger, R.S. (2004): Dietary prevention of allergic diseases in infants and small children. Part III: Critical review of published peer-reviewed observational and interventional studies and final recommendations. *Pediatric Allergy and Immunology* 15, 291–307.

Murphy, K.; Travers, P.; Walport, M. (2008): *Janeway's Immunobiology*. 7th edition. New York, Garland Science.

Neutra, M.R.; Mantis, N.J.; Kraehenbuhl, J.-P. (2001): Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nature Immunology* 2, 1004–1009.

Niess, J.H.; Brand, S.; Gu, X.; Landsman, L.; Jung, S.; McCormick, B.A.; Vyas, J.M.; Boes, M.; Ploegh, H.L.; Fox, J.G.; Littman, D.R.; Reinecker, H.-C. (2005): CX₃CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307, 254–258.

Nowak-Wegrzyn, A.; Fiocchi, A. (2009): Rare, medium, or well done? The effect of heating and food matrix on food protein allergenicity. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 9, 234–237.

Oddy, W.H.; Rosales, F. (2010): A systematic review of the importance of milk TGF- β on immunological outcomes in the infant and young child. *Pediatric Allergy and Immunology* 21, 47–59.

Oehling, A.; Resano, A.; Sanz, M.L.; Fernández Benítez, M. (1998): Importance of food allergy in atopic dermatitis. *Allergy* 53, (Supplement 46), 139–142.

O'Farrelly, C. (1998): Just how inflamed is the normal gut? *Gut* 42, 603–604.

Østergaard, H.; Rasmussen, S.K.; Roberts, T.H.; Hejgaard, J. (2000): Inhibitory serpins from wheat grain with reactive centers resembling glutamine-rich repeats of prolamin storage proteins. *Journal of Biological Chemistry* 275, 33272–33279.

Ownby, D.R.; Johnson, C.C.; Peterson, E.L. (2002): Exposure to dogs and cats in the first year of life and risk of allergic sensitization at 6 to 7 years of age. *Journal of the American Medical Association* 288, 963–972.

Palosuo, K. (2003): Update on wheat hypersensitivity. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 3, 205–209.

Palosuo, K.; Varjonen, E.; Kekki, O.-M.; Klemola, T.; Kalkkinen, N.; Alenius, H.; Reunala, T. (2001): Wheat ω -5 gliadin is a major allergen in children with immediate allergy to ingested wheat. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 108, 634–638.

Paschke, A. (2009): Aspects of food processing and its effect on allergen structure. *Molecular Nutrition and Food Research* 53, 959–962.

Pasini, G.; Simonato, B.; Giannattasio, M.; Peruffo, A.D.B.; Curioni, A. (2001): Modifications of wheat flour proteins during in vitro digestion of bread dough, crumb, and crust: an electrophoretic and immunological study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 2254–2261.

Pastorello, E.A.; Farioli, L.; Conti, A.; Pravettoni, V.; Bonomi, S.; Iametti, S.; Fortunato, D.; Scibilia, J.; Bindslev-Jensen, C.; Ballmer-Weber, B.; Robino, A.M.; Ortolani, C. (2007): Wheat IgE-mediated food allergy in European patients: α -amylase inhibitors, lipid transfer proteins and low-molecular-weight glutenins. *International Archives of Allergy and Immunology* 144, 10–22.

Paul, W.E. (2008): *Fundamental Immunology*. 6th edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins/Wolters Kluwer.

Priault, G.; Nagler-Anderson, C. (2005): Mucosal immunity and allergic responses: lack of regulation and/or lack of microbial stimulation? *Immunological Reviews* 206, 204–218.

Ramesh, S. (2008): Food allergy overview in children. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 34, 217–230.

Rescigno, M.; Urbano, M.; Valzasina, B.; Francolini, M.; Rotta, G.; Bonasio, R.; Granucci, F.; Kraehenbuhl, J.-P.; Ricciardi-Castagnoli, P. (2001): Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology* 2, 361–367.

- Riedler, J.; Braun-Fahrlander, C.; Eder, W.; Schreuer, M.; Waser, M.; Maisch, S.; Carr, D.; Schierl, R.; Nowak, D.; von Mutius, E.; the ALEX Study Team (2001): Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 358, 1129–1133.
- Rosenkrands, I.; Hejgaard, J.; Rasmussen, S.K.; Bjørn, S.E. (1994): Serpins from wheat grain. *FEBS Letters* 343, 75–80.
- Salcedo, G.; Sanchez-Monge, R.; Diaz-Perales, A.; Garcia-Casado, G.; Barber, D. (2004): Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens. *Clinical and Experimental Allergy* 34, 1336–1341.
- Salt, L.J.; Robertson, J.A.; Jenkins, J.A.; Mulholland, F.; Mills, E.N.C. (2005): The identification of foam-forming soluble proteins from wheat (*Triticum aestivum*) dough. *Proteomics* 5, 1612–1623.
- Sampson, H.A. (1999): Food allergy. Part 2: diagnosis and management. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 103, 981–989.
- Sampson, H.A. (2001a): Immunological approaches to the treatment of food allergy. *Pediatric Allergy and Immunology* 12, Supplement 14, 91–96.
- Sampson, H.A. (2001b): Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 107, 891–896.
- Sampson, H.A. (2003): 9. Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111, S540–S547.
- Sander, I.; Raulf-Heimsoth, M.; van Kampen, V.; Baur, X. (2000): Is fungal α -amylase in bread an allergen? *Clinical and Experimental Allergy* 30, 560–565.
- Sathe, S.K.; Sharma, G.M. (2009): Effects of food processing on food allergens. *Molecular Nutrition and Food Research* 53, 970–978.
- Sathe, S.K.; Teuber, S.S.; Roux, K.H. (2005): Effects of food processing on the stability of food allergens. *Biotechnology Advances* 23, 423–429.

Schwartz, L.B.; Delgado, L.; Craig, T.; Bonini, S.; Carlsen, K.H.; Casale, T.B.; Del Giacco, S.; Drobnic, F.; van Wijk, R.G.; Ferrer, M.; Haahtela, T.; Henderson, W.R.; Israel, E.; Lötval, J.; Moreira, A.; Papadopoulos, N.G.; Randolph, C.C.; Romano, A.; Weiler, J.M. (2008): Exercise-induced hypersensitivity syndromes in recreational and competitive athletes: a PRACTALL consensus report (what the general practitioner should know about sports and allergy). *Allergy* 63, 953–961.

Scibilia, J.; Pastorello, E.A.; Ziza, G.; Ottolenghi, A.; Bindslev-Jensen, C.; Pravettoni, V.; Scovena, E.; Robino, A.; Ortolani, C. (2006): Wheat allergy: a double-blind, placebo-controlled study in adults. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117, 433–439.

Seitz, C.S.; Pfeuffer, P.; Raith, P.; Bröcker, E.-B.; Trautmann, A. (2008): Food allergy in adults: an over- or underrated problem? *Deutsches Ärzteblatt International* 105, 715–723.

Shewry, P.R. (2009): Wheat. *Journal of Experimental Botany* 60, 1537–1553.

Sicherer, S.H. (2001): Clinical implications of cross-reactive food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 108, 881–890.

Simonato, B.; De Lazzari, F.; Pasini, G.; Polato, F.; Giannattasio, M.; Gemignani, C.; Peruffo, A.D.B.; Santucci, B.; Plebani, M.; Curioni, A. (2001a): IgE binding to soluble and insoluble wheat flour proteins in atopic and non-atopic patients suffering from gastrointestinal symptoms after wheat ingestion. *Clinical and Experimental Allergy* 31, 1771–1778.

Simonato, B.; Pasini, G.; Giannattasio, M.; Peruffo, A.D.B.; De Lazzari, F.; Curioni, A. (2001b): Food allergy to wheat products: the effect of bread baking and in vitro digestion on wheat allergenic proteins. A study with bread dough, crumb, and crust. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 5668–5673.

Singh, H. (2005): A study of changes in wheat protein during bread baking using SE-HPLC. *Food Chemistry* 90, 247–250.

Šotkovský, P.; Hubálek, M.; Hernychová, L.; Novák, P.; Havranová, M.; Šetinová, I.; Kitanovičová, A.; Fuchs, M.; Stulík, J.; Tučková, L. (2008): Proteomic analysis of wheat proteins recognized by IgE antibodies of allergic patients. *Proteomics* 8, 1677–1691.

- Strachan, D.P. (1989): Hay fever, hygiene, and household size. *British Medical Journal* 299, 1259–1260.
- Strobel, S.; Mowat, A.M. (1998): Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Review Immunology Today* 19, 173–181.
- Sudo, N.; Sawamura, S.; Tanaka, K.; Aiba, Y.; Kubo, C.; Koga, Y. (1997): The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *Journal of Immunology* 159, 1739–1745.
- Tatham, A.S.; Shewry, P.R. (2008): Allergens in wheat and related cereals. *Clinical and Experimental Allergy* 38, 1712–1726.
- Tewari, A.; Du Toit, G.; Lack, G. (2006): The difficulties of diagnosing food-dependent exercise-induced anaphylaxis in childhood – a case study and review. *Pediatric Allergy and Immunology* 17, 157–160.
- Tlaskalová-Hogenová, H.; Tučková, L.; Lodinová-Žádníková, R.; Štěpánková, R.; Cukrowska, B.; Funda, D.P.; Stříž, I.; Kozáková, H.; Trebichavský, I.; Sokol, D.; Řeháková, Z.; Šinkora, J.; Fundová, P.; Horáková, D.; Jelínková, L.; Sánchez, D. (2002): Mucosal immunity: its role in defense and allergy. *International Archives of Allergy and Immunology* 128, 77–89.
- Toogood, J.H. (1998): Side effects of inhaled corticosteroids. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 102, 705–713.
- Umetsu, D.T.; DeKruyff, R.H. (2006): The regulation of allergy and asthma. *Immunological Reviews* 212, 238–255.
- Valenta, R.; Ferreira, F.; Focke-Tejkl, M.; Linhart, B.; Niederberger, V.; Swoboda, I.; Vrtala, S. (2010): From allergen genes to allergy vaccines. *Annual Review of Immunology* 28, 211–241.
- Valenta, R.; Lidholm, J.; Niederberger, V.; Hayek, B.; Kraft, D.; Grönlund, H. (1999): The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clinical and Experimental Allergy* 29, 896–904.
- Varjonen, E.; Vainio, E.; Kalimo, K. (2000): Antigliadin IgE – indicator of wheat allergy in atopic dermatitis. *Allergy* 55, 386–391.

von Mutius, E.; Martinez, F.D.; Fritsch, C.; Nicolai, T.; Reitmeir, P.; Thiemann, H.-H. (1994): Skin test reactivity and number of siblings. *British Medical Journal* 308, 692–695.

Weichel, M.; Glaser, A.G.; Ballmer-Weber, B.K.; Schmid-Grendelmeier, P.; Cramer, R. (2006a): Wheat and maize thioredoxins: a novel cross-reactive cereal allergen family related to baker's asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117, 676–681.

Weichel, M.; Vergoossen, N.J.; Bonomi, S.; Scibilia, J.; Ortolani, C.; Ballmer-Weber, B.K.; Pastorello, E.A.; Cramer, R. (2006b): Screening the allergenic repertoires of wheat and maize with sera from double-blind, placebo-controlled food challenge positive patients. *Allergy* 61, 128–135.

Werfel, T.; Breuer, K. (2004): Role of food allergy in atopic dermatitis. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 4, 379–385.

Wills-Karp, M.; Nathan, A.; Page, K.; Karp, C.L. (2010): New insights into innate immune mechanisms underlying allergenicity. *Mucosal Immunology* 3, 104–110.

Wilson, A.C.; Forsyth, J.S.; Greene, S.A.; Irvine, L.; Hau, C.; Howie, P.W. (1998): Relation of infant diet to childhood health: seven year follow up of cohort of children in Dundee infant feeding study. *British Medical Journal* 316, 21–25.

Yamashita, H.; Nanba, Y.; Onishi, M.; Kimoto, M.; Hiemori, M.; Tsuji, H. (2002): Identification of a wheat allergen, Tri a Bd 36K, as a peroxidase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 66, 2487–2490.

<http://www.allergome.org> (shlédnuto 8. 4. 2010)