



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

mgr Aleksandra Ewa
Siekierzyńska

Molekularne uwarunkowania alergizujących
właściwości jabłek

ROZPRAWA DOKTORSKA

*Serdeczne podziękowania kieruję do moich
Promotorów
Pani dr hab. Doroty Piaseckiej-Kwiatkowskiej
oraz Pana dr hab. Tomasza Sozańskiego, których
pomoc i nieustanne wsparcie było kluczowym
elementem przy powstawaniu tej pracy.*

Spis treści

1	Wykaz publikacji wchodzących w skład doktoratu	2
2	Wstęp	3
2.1	<i>Charakterystyka alergenów jabłek</i>	3
2.2	<i>Białka z rodziny Mal d</i>	4
2.3	<i>Czynniki wpływające na alergenicność jabłek</i>	5
2.3.1	Genotyp	5
2.3.2	Stopień dojrzałości, warunki przechowywania owoców, odporność na choroby	8
2.3.3	Oksydacja polifenoli	9
3	Cel pracy	10
4	Materiały i metody	10
4.1	<i>Materiały</i>	10
4.1.1	Owoce jabłoni	10
4.1.2	Surowice osób uczulonych na pyłek brzozy	12
4.2	<i>Metody</i>	12
4.2.1	Ekstrakcja RNA	12
4.2.2	Synteza cDNA	12
4.2.3	Real-Time PCR	13
4.2.4	Ekstrakcja białek jabłek	13
4.2.5	Immunobloting	13
4.2.6	ELISA	14
4.2.7	Analiza statystyczna	14
5	Wyniki	15
5.1	<i>Ekspresja genu Mal d 1, poziom białka Mal d 1.</i>	15
5.1.1	Ekspresja genu <i>Mal d 1.06A</i>	15
5.1.2	Ekspresja genu <i>Mal d 1.01</i>	15
5.1.3	Ekspresja genów <i>Mal d 1.06A</i> vs <i>Mal d 1.01</i>	16
5.1.4	Poziom białka Mal d1	16
5.2	<i>Ekspresja genu Mal d 2.01</i>	17
5.3	<i>Ekspresja genu Mal d 3.01</i>	17
5.4	<i>Ekspresja genu Mal d 4.01</i>	17
5.5	<i>Grupowanie hierarchiczne</i>	17
6	Dyskusja	18
7	Wnioski	22
	Literatura	22
	Załączniki	27

1 Wykaz publikacji wchodzących w skład doktoratu

1. Aleksandra Siekierzynska, Dorota Piasecka-Kwiatkowska, Aleksander Myszka, Marta Burzynska, Barbara Sozanska and Tomasz Sozanski. Apple allergy: causes and factors influencing fruits allergenic properties. *Clinical and Translational Allergy Apple allergy*. In production, DOI:10.1002/ctt2.12032
IF=5,16, 100 pkt MEIN
2. Aleksandra Siekierzynska, Dorota Piasecka-Kwiatkowska, Wojciech Litwinczuk, Marta Burzynska, Aleksander Myszka, Pawel Karpinski, Elzbieta Zygal, Narcyz Piorecki, Ewa Springer, and Tomasz Sozanski. Molecular and Immunological Identification of Low Allergenic Fruits among Old and New Apple Varieties. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 3527. <https://doi.org/10.3390/ijms22073527>.
IF=4,56, 140 pkt MEIN

2 Wstęp

Okolo 5–8% dzieci i 2–3% dorosłych cierpi na alergię pokarmowe [1]. W Europie Północnej i Środkowej uczulenie na jabłka jest związane z nadwrażliwością na reagujący krzyżowo alergen pyłku brzozy ze względu na strukturalną homologię białek. Okolo 50–70% pacjentów uczulonych na pyłki po spożyciu świeżych jabłek cierpi na zespół alergii jamy ustnej (OAS) [2]. Jak dotąd w jabłkach (*Malus domestica* Borkh.) zidentyfikowano cztery klinicznie istotne alergeny: Mal d 1, Mal d 2, Mal d 3 i Mal d 4 [3]. W Europie Północnej Mal d 1 jest głównym alergenem wywołującym reakcje alergiczne na owoce jabłoni. Białko to jest podobne do głównego alergenu pyłku brzozy Bet v 1 i posiada podobne epitopy dla przeciwciał IgE, co powoduje reakcje krzyżowe [4]. W krajach śródziemnomorskich natomiast reakcje alergiczne wywoływane są głównie przez białko Mal d 3. Dwa inne białka znajdujące się w jabłku, Mal d 2 i Mal d 4 są również związane z nadreaktywnością na białka jabłek, ale mają mniejsze znaczenie kliniczne [5-7].

Zawartość alergenów i/lub ekspresję genów kodujących główne białka alergizujące owoce jabłek scharakteryzowano tylko u kilku odmian. Obecnie tylko w odmianach Santana, Elise i Topaz uważa się za hipoalergenne, są dobrze tolerowane przez alergików [8-10]. Wykazano związek między ryzykiem reakcji alergicznej a (genotypem jabłoni), stopniem dojrzałości i czasem przechowywania owoców na podstawie ekspresji genu *Mal d 1* lub poziomu białka Mal d 1. Analizy te przeprowadzono tylko na najpopularniejszych odmianach, np. Golden Delicious, Granny Smith, Fuji, Santana, Cox's Orange Pippin, Topaz oraz Braeburn [7]. Powstaje interesujące pytanie, czy inne odmiany jabłoni, tradycyjne/stare i nowe (wyhodowane odpowiednio przed i po „zielonej rewolucji”) mogą mieć niski potencjał alergizujący.

Temat ekspresji genów kodujących cztery główne alergeny jabłek jest słabo poznany. Brak jest również informacji o wpływie metody uprawy, stopnia dojrzałości czasie przechowywania owoców na poziom alergenów w innych obecnie i dawniej uprawianych odmianach jabłoni.

Celem niniejszej pracy była ocena alergenicności jabłek 21 tradycyjnych/starych i dziewięciu nowoczesnych odmianach owoców jabłek poprzez badanie poziomu białka Mal d 1, ekspresji genów kodujących cztery główne alergeny jabłek oraz immunoreaktywności surowic. Postawiono hipotezę, że czynniki takie jak metoda hodowli, stopień dojrzałości, genotyp lub rodzaj tkanki mają wpływ na alergenicność jabłek. Aby odpowiedzieć na te pytania, zastosowano immunoblotting, technikę ELISA oraz PCR w czasie rzeczywistym.

2.1 Charakterystyka alergenów jabłek

Owoce jabłoni (*Malus × domestica* Borkh.) są bogatym źródłem składników odżywczych i nutraceutyków, takich jak polifenole i inne fitoskładniki. Głównymi składnikami fitochemikaliów jabłek są kwasy fenolowe, dihydrochalkony, flawonoidy (glikozydy kwercetyny), katechiny i oligomeryczne procyanidyny oraz glukozydy cyjanidyn znajdujące się głównie w owocach czerwonych [11]. Dzięki wymienionym składnikom spożywanie jabłek może zmniejszać ryzyko rozwoju chorób przewlekłych poprzez różne mechanizmy, w tym antyoksydacyjne czy antyproliferacyjne [12]. Mogą także usprawniać pracę przewodu pokarmowego, regulować masę ciała oraz zwiększać wydolność oddechową organizmu [13].

Niestety jabłka mogą być również przyczyną alergii, w tym reakcji anafilaktycznych. Alergie na owoce, takie jak jabłka, gruszki, brzoskwinie, morele, wiśnie i warzywa, takie jak marchew, seler i ziemniaki, występują częściej u starszych dzieci a także dorosłych i są głównie

związane z reaktywnością krzyżową między aeroalergenami, takimi jak pyłki drzew, pyłki traw lub ambrozji, a alergenami pokarmowymi ze względu na homologię strukturalną niektórych białek [14]. W Europie Północnej i Środkowej najczęstszym przykładem jest reakcja po spożyciu surowych jabłek u pacjentów uczulonych na pyłek brzozy [15]. Pierwotne uczulenie na alergizujące cząsteczki *Betula verrucosa* (np. Bet v1) wyzwała syntezę specyficznych przeciwciał IgE, które są zdolne do reakcji krzyżowej z jej homologami, występującymi w jabłku (Mal d1). Kliniczna manifestacja takiej reakcji immunologicznej obejmuje szybko pojawiający się świąd w obrębie jamy ustnej i gardła, obrzęk naczynioruchowy, świąd uszu i czasami zwężenie krtani. Objawy te znane jako zespół alergii jamy ustnej (OAS) są zwykle łagodne i pojawiają się bezpośrednio po ekspozycji na alergeny.

Objawy są rzadko związane z reakcją ze strony przewodu pokarmowego. Asero i in. [16] oszacowali, że rodzina białek związanych z patogenezą PR-10 i profilina, pomimo, że są nietrwałymi cząsteczkami, mogą wywoływać reakcje ogólnoustrojowe u osób przyjmujących inhibitory pompy protonowej, spożywających duże ilości surowej żywności a także stosujących głódówki. Reaktywność krzyżowa i potencjał alergenny różnych odmian jabłoni są zróżnicowane a zjawisko to może być przydatne klinicznie w planowaniu immunoterapii doustnej z użyciem mniej alergizujących odmian.

2.2 Białka z rodziny Mal d

Jak dotąd zidentyfikowane zostały i oficjalnie włączone do nomenklatury przez WHO / IUIS [3] 4 alergeny jabłek (*Malus domestica* Borkh.): Mal d 1, Mal d 2, Mal d 3, Mal d 4. Wśród nich Mal d 1 jest klinicznie najważniejszym alergenem w Europie Północnej i Środkowej, Mal d 3 w Europie Południowej. W basenie Morza Śródziemnego dwa inne białka Mal d 2 i Mal d 4 są również związane z nadreaktywnością po spożyciu jabłka.

Mal d 1 jest identyfikowane jako białko o masie 17-18 kDa zbudowane ze 158-159 aminokwasów, kodowane przez 480-483 nukleotydy [18]. Jego funkcja biologiczna związana jest z reakcją na infekcje spowodowane przez grzyby i bakterie, co wynika z aktywności rybonukleazowej białek należących do rodziny PR-10, określanych jako białka związane z patogenezą. Mal d 1 może również brać udział w wiązaniu i transporcie steroidów roślinnych oraz sygnalizacji wewnątrzkomórkowej [19-21]. Stres abiotyczny i biotyczny wpływa na zawartość alergenu Mal d 1. Czas i warunki przechowywania owoców jabłoni mogą wpływać na ilość alergizujących białek [8]. Pacjenci z alergiami pokarmowymi i pyłkowicą brzożową, zgłaszają różne nasilenie objawów po spożyciu jabłek w zależności od odmiany i stopnia dojrzałości spożytych owoców [22].

Zmienność siły alergennej może także wynikać z różnych poziomów ekspresji izoform *Mal d 1* zgrupowanych w 4 grupach (Mal 1.01 - Mal d 1.04) (www.allergen.org). W genomie jabłka dotychczas zidentyfikowano wiele sekwencji izoalergenów. *Mal d 1* jest kodowane przez 18 genów, 7 z nich leży w grupie sprzężeń 13 (LG13), 9 genów skupionych w LG16, jeden z nich nie jest zgrupowany [18]. Rodzinę genów podzielono na 5 grup w zależności od liczby i wielkości intronów oraz analizy EST (Expressed Sequence Tags) [23]. W pierwszej podrodzynie białka Mal d 1 zlokalizowane są dwa główne warianty genetyczne *Mal d 1.01* i *Mal d 1.02*, w drugiej *Mal d 1.04* i *Mal d 1.05*, w trzeciej *Mal d 1.06A*, *Mal d 1.06B*, *Mal d 1.06C*, w czwartej zidentyfikowano: *Mal d 1.07-1.09*, *Mal d 1.03AG*, w piątym *Mal d 1.01* [18]. Gao i in. [24] wykazali związek ekspresji *Mal d 1.04* i *Mal d 1.06A* z alergiennością. Ponadto *Mal d 1.06A* wykazuje wpływ dawki allelu na ilość białka Mal d 1 [24].

Wiadomo również, że inny alergen, Mal d2 (23 kDa), jest związany ze zjawiskiem alergenności jabłek. Mal d 2 należy do grupy białek podobnych do taumatyny (TLP) o właściwościach przeciwgrzybiczych (należy do grupy PR-5) [25]. Białka TLP stanowią główny białkowy składnik dojrzałych owoców jabłoni [26] i są uważane za panalergen w żywności oraz pyłku [27]. Białka Mal d 2 są kodowane przez geny *Mal d 2.01*, *2.02* i *2.03* [28], chociaż tylko jedna izoforma (*Mal d 2.01*) jest oficjalnie uznana przez WHO / IUIS [3] jako kodująca alergen. Dwie kopie genu *Mal d 2.01* nieznacznie różnią się wielkością peptydu sygnałowego i intronu zmapowanych w tej samej pozycji na LG 9 [29]. Białka Mal d 2 są bardzo stabilnymi cząsteczkami, odpornymi na denaturację termiczną i proteolizę, dzięki obecności 8 mostków dwusiarczkowych, które utrzymują jej strukturę trójwymiarową [30]. Hsieh i in. [31] zidentyfikowali Mal d 2 jako reaktywny *in vitro* alergen wśród 75% (25/34) alergików na jabłka rekrutowanych do badania w USA.

Białko zidentyfikowane w jabłkach o masie cząsteczkowej 9 kDa jako Mal d 3, należy do rodziny nieswoistych białek przenoszących lipidy (nsLTP). Białka z tej rodziny są głównymi alergenami uczulającymi pacjentów z alergiami niezwiązanymi z pyłkami roślin z rodziny *Rosaceae* [32, 33]. W krajach śródziemnomorskich pacjenci uczuleni na jabłka, ale nie uczuleni na pyłki brzozy, są uczuleni na brzoskwinię i inne owoce. Udowodniono, iż alergen Mal d 3 krzyżowo reaguje z alergenami brzoskwini Pru p 3. Mal d 3 jest kodowany przez dwa geny *Mal d 3.01* i *Mal d 3.02* [34].

Mal d 4 to białko cytozolowe 12-15 kDa [32], odgrywające istotną rolę we wzroście i rozwoju roślin poprzez udział w regulacji polimeryzacji filamentów aktyny [28]. Alergia na Mal d 4 występuje głównie w basenie Morza Śródziemnego [35]. Alergen ten bierze udział w reakcji na owoce innych gatunków, reagując krzyżowo z profiliną pyłku brzozy Bet v 2 [8, 36]. Mal d 4 jest kodowany przez 3 geny *Mal d 4.01*, *Mal d 4.02* i *Mal d 4.03* [28], wśród nich *Mal d 4.02* charakteryzuje się najwyższym poziomem ekspresji [29].

2.3 Czynniki wpływające na alergenność jabłek

2.3.1 Genotyp

Pomimo powszechnych alergii na jabłka, tylko kilka badań oceniających poziom różnych alergenów jabłek przeprowadzono w powszechnie uprawianych odmianach: Golden Delicious, Granny Smith, Fuji, Santana, Cox's Orange Pippin, Topaz, Braeburn [21, 37, 38], przede wszystkim w odniesieniu do Mal d 1 (tab. 1 i 2). Szerokie wykorzystanie popularnych odmian spowodowało ujednolicenie komercyjnych sadów jabłoniowych i ograniczenie genetycznej bioróżnorodności [39].

Tabela 1. Lista odmian oraz badań jakie przeprowadzono w badaniach nad alergiennością owoców jabłoni.

Odmiana	Metoda badań	Mal d 1	Mal d 2	Mal d 3	Mal d 4
Golden Delicious	Ekspresja genów	[63], [7], [44], [42], [13]	[63], [7], [44], [42]	[7], [44], [42], [64]	[7], [61]
	ELISA, EAST, Immunoblotting	[63], [7], [22], [43], [2], [42], [13], [9], [65], [42], [2], [63], [61], [67], [68], [69]	[63], [7]	[7], [66], [43]	[7], [61]
	SPT/ Prick-to-Prick	[40], [42], [65]	[42]	[43]	[7], [44]
Granny Smith	Ekspresja genów	[7], [66], [13]	[7]	[7]	[7]
	ELISA, EAST, Immunoblotting	[22], [13], [66], [2], [38], [67], [69], [63]	[66]	[43]	
	SPT/ Prick-to-Prick	[40]		[43]	
Braeburn	Ekspresja genów	[7]	[7]	[7]	[7]
	ELISA, EAST, Immunoblotting	[44], [8], [7], [9], [43], [61], [22]	[7]	[7]	[7]
	SPT/ Prick-to-Prick	[8]			
Elstar	Ekspresja genów	[13]			
	ELISA, EAST, Immunoblotting	[13]			[61]
	SPT/ Prick-to-Prick				[61]
Topaz	Ekspresja genów				
	ELISA, EAST, Immunoblotting	[43], [8], [9], [48]			
	SPT/ Prick-to-Prick				
Elise	Ekspresja genów				
	ELISA, EAST, Immunoblotting	[8], [48]			
	SPT/ Prick-to-Prick	[40]			
Santana	Ekspresja genów	[10]			
	ELISA, EAST, Immunoblotting	[68]			
	SPT/ Prick-to-Prick	[2], [40]			
Cox's Orange Pippin, Jonagored, Jonagold, Boskoop, Priscilla, Fuji, Jonathan, Prima, Fiesta, McIntosh, Gala, Idared, Gloster, Szampion	Ekspresja genów	[71], [42], [13]			
	ELISA, EAST, Immunoblotting	[22], [42], [13], [9], [69], [22], [28], [61], [48], [71]		[43]	
	SPT/ Prick-to-Prick	[2], [40], [65]		[43]	
Stare odmiany: Pink Lady, Cripps Pink, Annurca, Calvilla Bianca d'Inverno, Mutsu, Osnabruecker Renette, Delorina, Resista, Rajca, Grey Renette, Starking	Ekspresja genów	[42], [7]	[42], [7]	[42], [7]	[7]
	ELISA, EAST, Immunoblotting	[42], [7]	[42], [7]	[70]	[7]
	SPT/ Prick-to-Prick	[40], [9], [65]	[70]	[70]	

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; EAST - Enzyme Allergosorbent Test; SPT - Skin Prick Test.

Tabela 2. Zawartość białka Mal d 1 w różnych odmianach jabłoni.

Odmiana	Zawartość Mal d 1	Jednostki	Literatura
Golden Delicious	12.1	μg/g FW	[13]
	C ₅₀ =0.12, C ₅₀ =0.36	μg	[22]
	45 (4.5)	μg/g (mg/100g)	[67]
	2.9, 3.4, około 10.0	μg/g FW	[68]
	14.1-135.17	μg/g	[61]
	7.3-18.6	μg/g FW	[2]
	6.2-7.6	μg/g f FW	[9]
	7-8 (0,7-0,8)	μg/g (mg/100g)	[63]
	7.6-17	μg/g	[43]
	5.5-12.8	μg/g	[69]
Granny Smith	5.95-18.17	μg/g	[2]
	12.14, 8.81	μg/g FW	[13]
	16 (1.6)	μg/g (mg/100g)	[67]
	2.3-6.4	μg/g FW	[63]
	5.45-12.14	μg/g	[69]
Braeburn	9.45-271.20	μg/g	[61]
	C ₅₀ =0.12	μg	[22]
Topaz	2.0-6.4	μg/g FW	[9]
	6.3-16.1	μg/g	[43]
	<1-25	μg/g FW	[48]
Santana	0.5, 2.3, około 5.0	μg/g FW	[68]
Elise	0.25-17	μg/g FW	[48]
Fuji	11.50	μg/g FW	[13]
	5.4, 11.5	μg/g	[16]
	32.84-455,01	μg/g	[61]
	50.8	μg/g	[71]
Boskoop	C ₅₀ =2	μg	[22]
	1-25	μg/g FW	[48]
Jonagold	7 (0.7)	μg/g (mg/100g)	[67]
	3.33-5.5	μg/g FW	[69]
	1.3-8.7	μg/g FW	[9]
	12.98-38.82	μg/g	[61]
	17.2	μg/g	[71]
Idared	8 (0.8)	μg/g (mg/100g)	[67]
Gloster	4 (0.4)	μg/g (mg/100g)	[67]
Gala	14.6	μg/g FW	[9]

FW- (świeża masa), C₅₀ – stężenie białka powodujące zahamowanie w 50% wiązania przeciwciała IgE zawartego w surowicy pacjenta.

Temat ekspresji genów kodujących alergeny w jabłkach jest również mało zbadany, badania ograniczają się głównie do kilku nowoczesnych odmian (tab.1)

Analizy ekspresji genów kodujących Mal d 1, wykazały związek między ekspresją genów i stopniem dojrzałości, warunkami przechowywania (tab. 1). Tylko nieliczne prace [9, 40] opisujące ekspresję genów alergenów w kilku starych odmianach, które są cenne pod względem różnorodności smaku, wartości odżywczej, przetwórstwa czy hodowli. Również uprawa odmian jabłoni o niskim potencjale alergizującym nie jest prowadzona na szerszą skalę. Obecnie tylko odmiany Santana, Topaz i Elise są uważane za hipoalergiczne i tolerowane przez alergików. Co więcej, wykazano, że odmiana Santana charakteryzuje się dużą odpornością na parch jabłoni, dzięki czemu można znacznie ograniczyć stosowanie fungicydów w jej uprawie

[41]. Udowodniono, że stosowanie pestycydów może prowadzić do jeszcze silniejszej odpowiedzi wywołującej wyższą ekspresję Mal d 1 niż sam czynnik biotyczny [9].

2.3.2 Stopień dojrzałości, warunki przechowywania owoców, odporność na choroby

Zmienność zawartości białka Mal d 1 podczas dojrzewania, w dojrzałości pozbiorcowej oraz czasu i warunków przechowywania potwierdzono jedynie w odmianach jabłek Golden Delicious, Topaz, Braeburn i Cox'Orange Pippin. W okresie dojrzewania zawartość alergenów Mal d 1 stale rośnie od około 0,2 mg / 100 g świeżej masy do około 0,8 mg / 100 g świeżej masy (odpowiednio 130-164 dni po kwitnieniu). Zawartość Mal d 1 w owocach jabłoni odmian Braeburn i Topaz zbieranych na różnych etapach dojrzałości nie różniła się [42]. Po dodatkowym okresie przechowywania owoców, stwierdzono istotnie wyższe stężenie Mal d 1 w owocach przejrzałych. Przechowywanie w temperaturze otoczenia, owoców przetrzymywanych wcześniej w chłodni przez 12-tygodni wyżej wymienionych odmian, doprowadziło do akumulacji Mal d 1 w owocach niedojrzałych i przejrzałych, w przeciwieństwie do owoców dojrzałych, gdzie poziom Mal d 1 pozostawał stały [43]. Podkreślono potrzebę dalszych badań innych odmian jabłek w celu ustalenia różnic w zawartości Mal d 1 na różnych etapach dojrzałości jabłek i podczas ich przechowywania. W kilku badaniach wykazano podwyższenie zawartości białka Mal d 1 i zwiększoną ekspresję genu *Mal d 1* podczas przechowywania i stresu związanego z niską temperaturą [9]. Jednak Botton i wsp. [29] wykazali, iż poziom ekspresji genów w analizowanych odmianach jabłek, m.in. Golden Delicious i Braeburn był stabilny. Ekspresja Mal d 3 natomiast, była 2-5 razy wyższa w skórce jabłka niż w miąższu i zmniejszyła się w czasie 5-cio miesięcznego przechowywania. Co więcej, czas przechowywania wpływa także na ekspresję genów kodujących *Mal d 4*, powodując jej zmniejszenie [29]. Yang i in. [44] wykazali spadek ekspresji izoform *Mal d 4* po zbiorze i podczas dojrzewania. Sugeruje się również, że etylen może wpływać na ekspresję genu profiliny.

Oszacowano, iż w uprawie ekologicznej jabłoni, zawartość Mal d 1 była niska [45], niestety komercyjne odmiany o znacznie obniżonej odporności na choroby nie nadają się do tego typu upraw. Stare odmiany, u których obserwuje się dużą odporność na choroby grzybowe, dzięki czemu nadają się do nowoczesnego rolnictwa ekologicznego, mogą być wartościowym źródłem genotypów o potencjale hipoalergennym.

Rośliny reagują na atak patogenów (tab. 3), zranienia, promieniowanie UV-B, szok osmotyczny, niską temperaturę, niedobór wody, chemikalia takie jak etylen czy kwas salicylowy, m.in. poprzez produkcję białek należących do rodziny PR (Pathogen Resistance Proteins). Trzy z czterech głównych alergenów jabłek (Mal d 1, 2 i 3) należą do tej grupy białek, które są związane z naturalną odpornością na mączniaka prawdziwego lub / i parch jabłoni lub inne stresory, w tym chemikalia [46].

Tabela 3. Odporność na choroby grzybowe i potencjał alergenny

Odmiana	Parch jabłoni	Mączniak	Alergenność	Literatura
Golden Delicious	S	VS	Wysoka	[72]
Granny Smith	S	VS	Niska	[62]
Braeburn	R	R	Niska/wysoka	[22,62]
Elstar	S	S	Niska	[62]
Topaz	R	R	Niska	[62]
Elise	S/R	S	Niska	[62]
Santana	R	S	Niska	[62]

R – odporny, resistant; S – podatny, susceptible; VS – bardzo podatny, very susceptible.

W badaniach potencjału alergizującego odmian jabłek, przeprowadzonych za pomocą testów skórnych typu prick-to-prick i testu prowokacyjnego u 52 pacjentów uczulonych na pyłek brzozy, mających katar sienny i OAS, stwierdzono istotne różnice w stopniu manifestacji uczulenia w zależności od spożytej odmiany jabłek. Najłagodniejsze reakcje alergiczne pacjentów obserwowano po spożyciu jabłek odmian o czerwonym miąższu, które są proponowane jako potencjalnie przydatne narzędzie w doustnej immunoterapii pacjentów z alergią na pyłki brzozy i OAS [47].

Dodatkową rolę w alergizacji owoców jabłek może odgrywać obróbka po zbiorach. Hsieh i wsp., [31] ujawnili, że długotrwałe przechowywanie w 4°C owoców odmian Golden Delicious i Granny Smiths może zwiększyć ilość białka Mal d 1 i Mal d 2. W odmianach mało alergizujących, takich jak Santana i Elise, poziom białka Mal d 1 wzrastał wraz z czasem przechowywania, ale po potraktowaniu owoców czynnikiem hamującym dojrzewanie (MCP-1), zawartość alergenu Mal d 1 uległa zmniejszeniu [48].

2.3.3 Oksydacja polifenoli

Zagadnienie alergizacji jabłek jest bardziej złożone ze względu na możliwe interakcje białka Mal d 1 z polifenolami (katechiną) i enzymatycznym układem antyoksydacyjnym. Reakcja pomiędzy Mal d 1 a utlenionymi polifenolami może skutkować zmniejszeniem wiązaniem IgE, jak pokazano w odmianie Braeburn [43]. Z drugiej strony, w odmianie Topaz, przy wysokiej zawartości polifenoli i niskiej aktywności PPO (enzymu oksydazy polifenolowej), nadającej wysoką całkowitą zdolność antyoksydacyjną, również zmniejsza się wiązanie IgE z Mal d 1 [49]. Według Schmits-Eiberger i Matthes w odmianach Braeburn, Golden Delicious oraz Topaz, zawartość wszystkich polifenoli była stabilna w okresie dojrzewania, jednak podczas przechowywania zawartość tych składników znacznie się zmniejszyła [43].

Podsumowując, w Europie Północnej i Środkowej alergię na jabłka są głównie związane z uczuleniem na pyłki brzozy i są powodowane przez krzyżowo reagujące przeciwciała z białkami Bet v 1 i Mal d 1. W basenie Morza Śródziemnego alergię na jabłka są rzadsze, ale ciężkie i wiążą się z uczuleniem na LTP (Mal d 3). Różnice w ekspresji izoform Mal d 1 mogą także odpowiadać za zmienność siły alergicznej, co sugeruje, że czynniki genetyczne mogą odgrywać dużą rolę w kontrolowaniu ilości Mal d 1 w owocach. Różnice

w potencjale alergizującym jabłek mogą także być związane ze stopniem dojrzałości owoców, na skutek akumulacji białka Mal d 1 w trakcie dojrzewania. Podobnie czas i warunki przechowywania owoców wpływają na akumulację alergenów Mal d 1 i Mal d 2, co udowodniono w odmianach Golden Delicious i Granny Smiths. Całkowity potencjał antyoksydacyjny i interakcje polifenoli z białkiem Mal d 1 mogą wpływać na potencjał alergiczny poprzez wpływ na wiązanie przeciwciał IgE. Obecnie tylko odmiany Topaz, Elise i Santana są uważane za dobrze tolerowane przez pacjentów uczulonych na jabłka. Wybór odmian o niskim potencjale alergenicności, usunięcie skórki jabłek i obróbka termiczna może zmniejszyć ryzyko wystąpienia reakcji alergicznych i przypuszczalnie mogą być stosowane w immunoterapii alergii na pyłek brzozy. Znajomość molekularnego mechanizmu alergenicności jabłek oraz czynników modyfikujących nasilenie reakcji może ułatwić poradnictwo medyczne i polepszyć opiekę nad pacjentami z alergiami związanymi z owocami jabłoni.

3 Cel pracy

Celem niniejszej pracy była ocena alergenicności 21 tradycyjnych, starych i 9 nowoczesnych odmian owoców jabłoni poprzez badanie immunoreaktywności surowic pacjentów z ekstraktami białkowymi jabłek, określenie poziomu ekspresji genów kodujących cztery główne alergeny jabłek oraz określenie poziomu białka Mal d 1.

Hipoteza badawcza.

Stare odmiany jabłoni są źródłem odmian hipoalergicznych.

Czynniki takie jak metoda uprawy, faza dojrzałości, genotyp czy rodzaj tkanki mają wpływ na potencjał alergenicności.

Aby odpowiedzieć na te pytania, zastosowano immunoblotting, ilościowy Real-Time PCR oraz technikę ELISA.

4 Materiały i metody

4.1 Materiały

4.1.1 Owoce jabłoni

Owoce jabłoni 21 starych odmian jabłoni (*Malus x domestica* Borkh.) (wprowadzonych do uprawy przed zieloną rewolucją) hodowanych metodami ekologicznymi zebrano z Arboretum i Instytutu Fizjografii w Bolestraszczykach (tab. 4). Osiem nowoczesnych odmian jabłek, uprawianych metodami ekologicznymi i intensywnie uprawianymi, otrzymano od firmy „BioGrim” z Wojciechowa. Z drzew uprawianych w Instytucie Ogrodnictwa w Brzeznej metodą integrowaną zebrano trzy odmiany jabłoni. Owoce odmiany Santana (*Malus x domestica* Borkh. Odm. Santana) otrzymano z prywatnego sadu położonego w pobliżu Bielska-Białej. Skórki i miąższ owoców jabłek zbierano oddzielnie i przechowywano w temperaturze -80°C. Kolejno próbki liofilizowano a następnie ekstrahowano RNA.

Tabela 4. Charakterystyka próbek roślinnych

Rodzaj odmiany	Numer próbki	Odmiana	Metoda uprawy	Pochodzenie próbki
Stare	X_15	Rumianka from Alma-Ata	ekologiczna	Bolestraszyce
	X_17	Sztetyna	ekologiczna	Bolestraszyce
	X_19	Gloria Mundi	ekologiczna	Bolestraszyce
	X_21	Kosztela	ekologiczna	Bolestraszyce
	X_23	Reinette Coulon	ekologiczna	Bolestraszyce
	X_25	Emperor Alexander Apple	ekologiczna	Bolestraszyce
	X_27	Kantówka Gdańska (Danzinger Kantapfel)	ekologiczna	Bolestraszyce
	X_29	Żeleźniak (Rother Eiserapfel)	ekologiczna	Bolestraszyce
	X_31	Jonathan	ekologiczna	Bolestraszyce
	X_33	Reinette de Canada	ekologiczna	Bolestraszyce
	X_35	Oberland Raspberry Apple (Callville d'Automne Raye)	ekologiczna	Bolestraszyce
	X_37	Bukówka	ekologiczna	Bolestraszyce
	X_39	Jakub Lebel	ekologiczna	Bolestraszyce
	X_41	Winter Banana	ekologiczna	Bolestraszyce
	X_43	Kandil Sinap	ekologiczna	Bolestraszyce
	X_45	Parker's Pippin	ekologiczna	Bolestraszyce
	X_47	Gray French Reinette	ekologiczna	Bolestraszyce
	X_51	Grochówka (Grosser Bohnapfel)	ekologiczna	Bolestraszyce
	X_53	Berner Rose	ekologiczna	Bolestraszyce
	X_103	Antonovka Usual	ekologiczna	Bolestraszyce
X_105	Antonovka One and a Half Pound	ekologiczna	Bolestraszyce	
Nowe	X_80B	Jonagored	ekologiczna	Wojciechow
	X_81B	Jonagored	intensywna	Wojciechow
	X_82A	Gold Millennium	ekologiczna	Wojciechow
	X_83A	Gold Millennium	intensywna	Wojciechow
	X_84B	Gala	ekologiczna	Wojciechow
	X_85A	Gala	intensywna	Wojciechow
	X_86A	Idared	ekologiczna	Wojciechow
	X_87A	Idared	intensywna	Wojciechow
	X_88A	Golden Delicious	ekologiczna	Wojciechow
	X_89A	Golden Delicious	intensywna	Wojciechow
	X_91A	Trinity	intensywna	Wojciechow
	X_93A	Trinity I (× Gold Millennium)	ekologiczna	Wojciechow
	X_94A	Trinity II (× Ligol)	ekologiczna	Wojciechow
	X_96A	Idared	integracyjna	Brzezna
	X_97A	Gala	integracyjna	Brzezna
	X_99A	Golden Delicious	integracyjna	Brzezna
	X_108	Golden Delicious 2	ekologiczna	Wojciechow
	X_109	Golden Delicious 2	intensywna	Wojciechow
	X_110	Idared 2	intensywna	Wojciechow
	X_111A	Idared 2	ekologiczna	Wojciechow
X_112A	Santana	ekologiczna	Bielsko-Biała	
X_113B	Golden Delicious 2	integracyjna	Brzezna	

4.1.2 Surowice osób uczulonych na pyłek brzozy

Czterech pacjentów biorących udział w badaniu przebadano metodą SPT (skórny test punktowy) i zdiagnozowano alergię na pyłki brzozy w wywiadzie podawali alergię na jabłka. Wszyscy uczestnicy wyrazili świadomą zgodę na udział w tym programie badawczym.

Projekt uzyskał pozytywną opinię Komisji Etyki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, dokument nr 178/19.

4.2 Metody

4.2.1 Ekstrakcja RNA

Ekstrakcję RNA przeprowadzono metodą stosowaną przez Reida i wsp. [50], z pewnymi modyfikacjami. Tkankę zmielono we wstępnie schłodzonym mózdzierzu na drobny proszek, a następnie dodano do podgrzanego (65°C) buforu ekstrakcyjnego w proporcji 0,15 g tkanki na 7,5 ml buforu, następnie energicznie wytrząsano. Bufor do ekstrakcji RNA zawierał 2% CTAB (bromek cetylotrimetyloamoniowy; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 2 M NaCl, 300 mM Tris-HCl (pH = 8,0) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 0,25 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 0,05% spermidine (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 1% poliwinylpiperolidon (PVP) K-30 (rozpuszczalny) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) i 2% β-merkaptioetanolu (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) dodawane bezpośrednio przed użyciem. Próbkę inkubowano w łaźni wodnej w 65°C przez 10–15 min i wytrząsano przez 10–15 s co każde 3 minuty. Próbkę pozostawiono do ostygnięcia do temperatury pokojowej a następnie dodano równe objętości chloroformu / alkoholu izoamyłowego (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) (24: 1), odwirowano przy 3500 g przez 20 min w 4 °C. Warstwę wodną przeniesiono do nowej probówki i odwirowano przy 30000 g przez 15 min w 4 °C w celu usunięcia wszelkich nierozpuszczalnych cząstek pozostałych w roztworze. W celu wytrącenia kwasu nukleinowego dodano 0,1 objętości 3 M NaOAc (pH = 5,2 ± 0,2) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) i 0,6 objętości izopropanolu (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), zmieszano, i inkubowano w -80 °C przez 20 min. Próbkę następnie wirowano przy 3500 g przez 30 min w 4°C w celu odwirowania osadu kwasu nukleinowego. Supernatant odrzucono, a osad rozpuszczono w 1 ml TE (Tris (hydroksymetylo) aminometan i kwas etylenodiaminotetraoctowy; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) (pH 7,5) i przeniesiono do nowej 2 ml probówki. Matrycowy RNA wytrącono selektywnie przez dodanie 0,3 objętości 8 M LiCl (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) i inkubowano przez 25 godzin w 4°C, następnie odwirowano przy 20 000 g przez 30 minut w 4 °C. Osad mRNA przemyto przez dodanie 700 µl 70% zimnego etanolu (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) i wysuszono na powietrzu. Osad rozpuszczono w 70–100 µl wody DEPC (pirowęglan dietylu; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

Ilość i jakość całkowitego mRNA określono spektrofotometrycznie (Nanodrop Technologies LLC, Wilmington, DE, USA) przez pomiar OD260 / 230 i OD260 / 280. Integralność RNA oceniano przez na żelu agarozowym w obecności SybrGreen Safe Stain (Ivotrogen, Carlsbad, CA, USA). Jedynie próbki mRNA spełniające kryteria 260/2880 > 1,9 i 260/280 ≥ 2,0 oraz wysokocząsteczkowe zostały poddane syntezy cDNA.

4.2.2 Synteza cDNA

Odwrotną transkrypcję przeprowadzono za pomocą zestawu TranScriba (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska) zgodnie z instrukcjami producenta, stosując startery oligo (dT) i 250 ng całkowitego mRNA. Do oceny zanieczyszczenia genomowym DNA zastosowano jako

kontrolę próbkę bez transkryptazy. Stężenie cDNA oceniano spektrofotometrycznie (Nanodrop Technologies LLC, Wilmington, DE, USA).

4.2.3 Real-Time PCR

Ekspresję genów określano metodą PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu termocyklera (Lightcycler-96; Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA, USA). Sekwencje starterów oligonukleotydowych zastosowane do PCR w czasie rzeczywistym (tab. 5) zostały przejęte z literatury [7, 18, 44, 51]. Wydajność amplifikacji oceniano dla każdej pary starterów za pomocą regresji i nachylenia zgodnie z następującym równaniem: $10^{(-1 / \text{nachylenie})}$ [52]. Względna ekspresję znormalizowano do średniej geometrycznej poziomów ekspresji genów odniesienia (geny aktyny i ubikwityny) i wyrażono w jednostkach arbitralnych (A.U.).

Tabela 5. Startery użyte do reakcji amplifikacji w czasie rzeczywistym

Gen	Nazwa starera	Sekwencja startera (5'-3')	Access No.
<i>Mal d 1.01</i>	Md1-1.01F	AAGCTGAAATCCTTGAAGGAA	AJ417551
	Md1-1.01R	GTGCTCTTCCTTGATTTC AATG	
<i>Mal d 1.06A</i>	Mal d 1.06AF	TTGTTGCCAGATGGATGGTC	AY428580
	Mal d 1.06AR	TTGATGCTGACAATCTCATT	
<i>Mal d 2.1</i>	Mal d 2.01 F	GTGTGCCCGGCTCCACTT	AJ243427
	Mal d 2.01 R	TTCGAATCACCAAACGCAAG	
<i>Mal d 3.1</i>	Mal d3.01F	GTGACCAGCAGCCTTGCG	AF221502
	Mal d 3.01R	TTCAGGCAGTTGCAAGCAGT	
<i>Mal d 4.01</i>	Mal d 4.01F	GCTCTGGTGGCGTAACTGTG	AF129426
	Mal d 4.01R	CCTGGAGTCAAAGGCTCCTC	
<i>MdUBI</i>	UBI-F	TTGATCTTTGCTGGGAAACAG	CN491263
	UBI-R	CACCACCATCATTCAACACC	
<i>MdActin</i>	Actin-F	TGACCGAATGAGCAAGGAAATTACT	CN938023
	Actin-R	TACTCAGCTTTGGCAATCCACATC	

4.2.4 Ekstrakcja białek jabłek

Mrożony miąższ jabłka (0,5 g) wytrząsano z 5 ml 10 mM buforu PBS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) o pH = 5,4, przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano w 4°C przez 30 min przy maksymalnej prędkości. Każdą próbkę ekstrahowano dwukrotnie. Do dalszej analizy pobrano 2 ml supernatantu i odwirowano przy 15 000 rpm przez 10 minut, a następnie supernatant przeniesiono do nowej probówki. Supernatanty przechowywano w temperaturze -80°C do czasu użycia w poniższej procedurze.

4.2.5 Immunobloting

Blotting przeprowadzono stosując Slot Blotter (Geneflow, Lichfield, Anglia). Podczas procedury pobrano 150 µl wyekstrahowanego roztworu białka. Membranę PVDF (Merck, Darmstadt, Niemcy) (4,5 cm x 4,4 cm) aktywowano przez zanurzenie w metanolu i nasączenie buforem do transferu (12 mM Tris, 96 mM glicyna i 20% metanol) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) przez 5 min. Aktywowaną membranę umieszczono między bibułą nasączoną wcześniej buforem do transferu. Po immobilizacji białek jabłek membranę inkubowano z roztworem blokującym zawierającym 1% BSA (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) w buforze TBS (20 mM Tris, pH 7,5, 500 mM NaCl) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) przez 45 minut z delikatnym wytrząsaniem w temperaturze pokojowej. Po blokowaniu płukano trzykrotnie przez 5 min w buforze TBS-Tween (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), pH 7,4.

Do testu immunologicznego surowice ludzkie (zawierające pierwszorzędowe przeciwciała IgE) rozcieńczono 10–100 razy 1% buforem BSA – TBS. Membrany następnie

inkubowano z rozcieńczonym roztworem surowic przez 45 minut i przemywano pięciokrotnie buforem TBS-Tween. Do immunodetekcji stosowano rozcieńczone w stosunku 1:1000 drugorzędowe kozie przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko ludzkim IgE sprzężone z fosfatazą alkaliczną (Invitrogen). Po inkubacji membranę płukano pięciokrotnie roztworem TBS-Tween pH 7,4. Bloty barwiono z użyciem 5 mg BCIP (sól p-toluidyny 5-bromo-4-chloro-3'-indolifosforanu; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) i 10 mg NBT (chlorek nitro-błękitu tetrazoliowego; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) przez 20 min. Reakcję zatrzymano przez przemycie membran wodą. Membrany wysuszone na powietrzu i sfotografowano.

4.2.6 ELISA

Płytki wielokołowe aktywowano przez dodanie 200 μ l buforu węglanowo - wodorowęglanowego, pH 9,6, w temperaturze 37 °C przez 30 min. Po aktywacji płytki powlekano białkami jabłkowymi poprzez dodanie do każdego dołka po 100 μ l ekstraktów a następnie inkubowano w temperaturze 37 °C przez 120 min. Jako standardy białek alergenowych użyto rMal d1 (Mal d1.0108, Biomay, Wien, Austria) (1000 ng/ml – 7,81 ng / ml) i rBet v1-A (Cusabio Technology LLC, Houston, TX, USA) (138 ng / ml– 1,08 ng/ml). Wolne miejsca wiązania blokowano 1% BSA w buforze TBS, pH 7,4, przez 45 minut. Dodano specyficzne przeciwciała poliklonalne IgG Bet v 1 królicze (100 μ l; rozcieńczenie 1: 2000) i płytkę inkubowano w 37 °C przez 90 min. Immunokompleksy Mal d 1 i IgG wykryto monoklonalnym przeciwciałem przeciwko peroksydazie IgG przeciw IgG króliczym (1: 400 000; SIGMA A1949; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) i inkubowano w 37°C przez 60 minut bez mieszania. Reakcję barwną wywołano po dodaniu 200 μ l dichlorowodoru o - fenylenodiaminy (OPD; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) i inkubowano przez 30 min. Reakcję zatrzymano przez dodanie 50 μ l 3M H₂SO₄ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Absorbancję mierzono przy długości fali 492 nm za pomocą spektrofotometru.

4.2.7 Analiza statystyczna

Dane są wyrażone jako średnie lub mediany i zostały poddane analizie za pomocą programu statystycznego Statistica v.13 (StatSoft, Kraków, Polska). Wartości $p < 0,05$ uznano za istotne statystycznie. Jednorodność wariancji dla wszystkich danych oceniono za pomocą testu Levene'a. Do oceny różnic między grupami zastosowano jednokierunkową analizę wariancji (ANOVA). Różnice między średnimi wartościami starych i nowych odmian jabłek analizowano za pomocą testu t-Studenta. Do oceny korelacji zastosowano korelację r-Pearsona (dane o rozkładzie normalnym), w której wartość p uznawano za statystycznie istotną na poziomie $< 0,05$. Różnice między grupami jabłoni uprawianych różnymi metodami oceniano za pomocą testu Tukeya.

Integrację ekspresji genów (mRNA), immunoreaktywności i ekspresji białek przeprowadzono za pomocą pakietu R/Bioconductor moCluster [32]. Metoda ta polega na analizie wieloczynnikowej z wieloma blokami, która definiuje zestaw ukrytych zmiennych reprezentujących wspólne wzorce w wejściowych zbiorach danych, które są następnie przekazywane do hierarchicznego algorytmu grupowania (odległość euklidesowa, metoda Warda) w celu wykrycia połączonych klastrów. Decyzję o optymalnej liczbie klastrów podjęto na podstawie statystyki luk [33].

Przeprowadzono również hierarchiczną klasyfikację głównych komponentów (HCPC) z wykorzystaniem danych ekspresji genów, przy użyciu pakietu FactoMineR.

5 Wyniki

5.1 Ekspresja genu *Mal d 1*, poziom białka Mal d 1.

Analizie poddano ekspresję dwóch izoform genu *Mal d 1* (*Mal d 1.06A* i *Mal d 1.01*) oraz stężenie białka Mal d 1 we wszystkich odmianach ujętych w badaniu (tab. 1, 2 i tab. 6). Wyniki ekspresji genów w poszczególnych odmianach przedstawione są w „Supplementary data” oryginalnego artykułu „Molecular and Immunological Identification of Low Allergenic Fruits among Old and New Apple Varieties”.

5.1.1 Ekspresja genu *Mal d 1.06A*

Ekspresja genu *Mal d 1.06A* jest wyższa w starych odmianach jabłoni niż w nowych ($p = 0,000143$). Poziom ekspresji zależy także od rodzaju tkanki, w skórce była wyższa niż w mięszu starych odmian ($p = 0,053$). Metoda uprawy nie wpłynęła istotnie na ekspresję. W odmianach: Golden Delicious, Idared, Jonagored, Gold Millennium i Gala, ekspresja *Mal d 1.06A* dodatnio korelowała z dojrzałością owoców (współczynnik r Pearsona = 0,52, $p = 0,038$, tab. 6). Wykazano, iż, ekspresja *Mal d 1.06A* była dodatnio skorelowana z immunoreaktywnością surowic pacjentów (tab. 8).

Tabela 6. Średnia wartość ekspresji genów kodujących główne alergeny u jabłoni (A.U.).

Tkanka	Gen	Odmiany stare	Odmiany nowe			
			Razem nowe	Uprawa ekologiczna	Uprawa intensywna	Uprawa integrowana
Mięsz	<i>Mal d 1.06A</i>	3.43	2.90	2.74	3.04	2.99
	<i>Mal d 1.01</i>	3.61	3.37	3.44 (g)	3.38	2.95 (g)
	<i>Mal d 2.01</i>	4.12 (b,d)	3.69 (d)	3.35 (a,b,c)	4.01 (c)	3.66 (a)
	<i>Mal d 3.01</i>	3.05 (e)	2.88	3.13	2.77	2.61
	<i>Mal d 4.01</i>	3.30	3.23	3.29	3.2	2.96
Skórka	<i>Mal d 1.06A</i>	3.90 (h)	3.33	3.40	3.51	2.93
	<i>Mal d 1.01</i>	4.32 (h)	3.78	3.91	4.01	2.9
	<i>Mal d 2.01</i>	3.56	3.31	3.05	3.67	2.96
	<i>Mal d 3.01</i>	4.97 (e)	4.54	4.94	4.96	3.02
	<i>Mal d 4.01</i>	2.81	2.89	2.85	2.93	2.78
Średnia	<i>Mal d 1.06A</i>	3.67 (f)	3.12	3.07	3.28	2.96
	<i>Mal d 1.01</i>	3.97 (f)	3.57	3.68	3.70	2.93
	<i>Mal d 2.01</i>	3.84 (j,k)	3.50 (j)	3.20 (i,k)	3.84 (i)	3.31
	<i>Mal d 3.01</i>	3.99	3.71	4.04	3.86	2.81
	<i>Mal d 4.01</i>	3.05	3.06	3.07	3.10	2.87

5.1.2 Ekspresja genu *Mal d 1.01*

Ekspresja genu *Mal d 1.01* istotnie różni się między starymi a nowymi odmianami jabłek ($p = 0,013$). Poziom transkryptu *Mal d 1.01* był wyższy w jabłkach z upraw ekologicznych niż w jabłkach z upraw integrowanych ($p = 0,01$). Ekspresja *Mal d 1.01* była wyższa w skórce niż w mięszu starych odmian ($p = 0,00001$). W odmianach: Golden Delicious, Idared, Jonagored, Gold Millennium i Gala, ekspresja *Mal d 1.01* dodatnio korelowała z dojrzałością owoców (wsp. r -Pearsona = 0,61, $p = 0,012$, tab. 6).

Zaobserwowaliśmy również dodatnią korelację ekspresji *Mal d 1.01* z immunoreaktywnością (wsp. r-Pearsona = 0,3851, p = 0,036; tab. 8).

5.1.3 Ekspresja genów *Mal d 1.06A* vs *Mal d 1.01*

W owocach starych odmian średni poziom ekspresji izoformy *Mal d 1.06A* był niższy niż *Mal d 1.01* (odpowiednio p = 0,008) (tab. 6). Również w skórce jabłek starych odmian, ekspresja izoformy *Mal d 1.06A* była niższa niż *Mal d 1.01* (p = 0,018) (tab. 6).

5.1.4 Poziom białka Mal d1

Oceniono zawartość białka Mal d 1 w miąższu jabłek starych odmian uprawianych ekologicznie oraz nowych uprawianych ekologicznych i intensywnie (tab. 7). Różnice w medianach między analizowanymi grupami nie były istotne statystycznie. Udowodniono, że ekspresja *Mal d 1.06A* koreluje z zawartością białka Mal d 1 (współczynnik r-Pearsona = 0,38, p = 0,036) (tab. 8), natomiast ekspresja *Mal d 1.01* nie korelowała z zawartością głównego alergenu. Zaobserwowaliśmy dodatnią korelację między zawartością Mal d 1 a immunoreaktywnością (r-Pearsona= 0,37, p = 0,04) (tab. 8).

Tabela 7. Zawartość białka Mal d 1 w miąższu owoców.

	Odmiana	Zawartość Mal d 1 (µg/g FW)
Stare odmiany Uprawa ekologiczna	Kantówka Gdańska	0.3
	Kosztela	0.6
	Antonovka Usual	1.8
	Sztetyna	1.9
	Rumianka from Alma-Ata	2
	Reinette Coulon	2.5
	Żeleźniak	3.5
	Kandil Sinap	4.6
	Bukówka	7.3
	Emperor Alexander Apple	7.6
	Jonathan	7.7
	Antonovka One and a Half Pound	7.7
	Grochówka	8.2
	Oberlands Raspberry Apple	10
	Winter Banana	12.9
	Jakub Lebel	17.5
	Gloria Mundi	20.9
	Gray French Reinette	23.5
	Reinette de Canada	28.8
	Berner Rose	37.7
	Mediana (Stare)	7.65
Nowe odmiany Uprawa ekologiczna	Gala	1.3
	Golden Delicious	1.8
	Jonagored	5.8
	Idared	6
	Santana	8.5
	Trinity x Gold Millenium	12.7
	Gold Millenium	13.2
	Trinity x Ligol	15
		Mediana

Nowe odmiany Uprawa intensywna	Gold Millenium	2.3
	Gala	2.4
	Idared	2.4
	Golden Delicious	5.8
	Jonagored	9.5
	Trinity	13.6
	Mediana	4.1
Mediana (Nowe)		5.9

FW-świeża masa

Korelacja między ekspresją *Mal d 1.06A* a zawartością białka Mal d 1 (tab. 8) była istotna przy współczynniku r-Perasona = 0,38 (p = 0,036).

Tabela 8. Korelacja ekspresji genów ze stpnem dojrzałości owoców.

	Mal d 1.06A	Mal d 1.01	Mal d 2.01	Mal d 3.01	Mal d 4.01
r-Pearson	0.5211	0.6129	0.3461	0.4012	0.6175
p value	0.038	0.012	0.189	0.123	0.011

5.2 Ekspresja genu *Mal d 2.01*

Średnia ekspresja w grupie starych odmian różni się istotnie zarówno od ogółu nowych jaki nowych odmian uprawianych ekologicznie (odpowiednio p = 0,043 i p = 0,025) (tab. 6). Wykazano iż, sposób urawy wpływa na ekspresję genu *Mal d 2.01* (p <0,04). Metoda organiczna, w przeciwieństwie do metody intensywnej, powoduje obniżenie poziomu średniej ekspresji genu i ekspresji w mięszu (p <0,05) (tab. 1). Ekspresja *Mal d 2.01* nie korelowała z dojrzałością owoców ani immunoreaktywnością surowic pacjentów.

5.3 Ekspresja genu *Mal d 3.01*

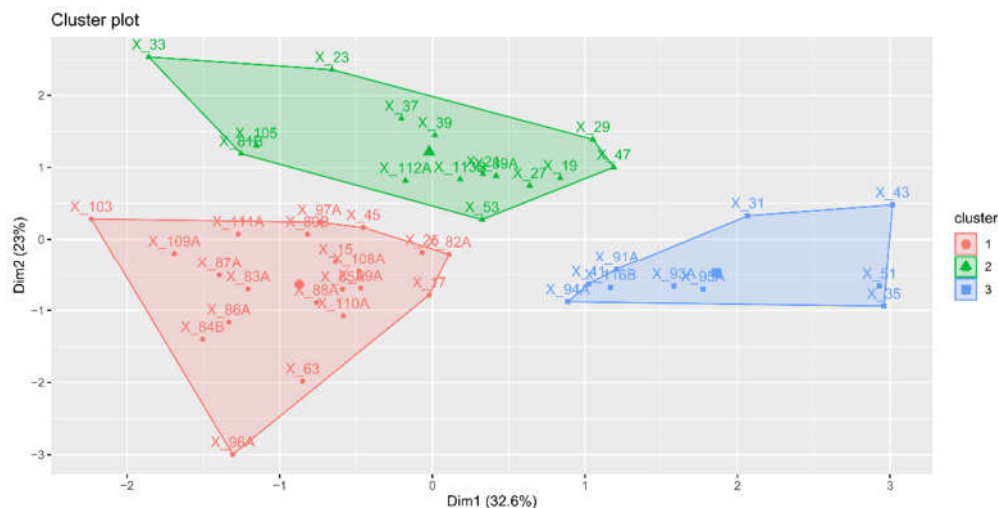
Stare i nowe odmiany nie różniły się pod względem poziomu transkrypcji genu *Mal d 3.01*. We wszystkich odmianach skórka jabłka zawierała około dwa razy więcej transkryptów *Mal d 3.01* niż mięsz (p <0,05). Wśród starych odmian tylko w odmianie Oberland Raspberry Apple, Kandil Sinap i Grochówka, ekspresja genów wzrosła jednakowo w mięszu jak i w skórcie. Uprawa ekologiczna i intensywna, w przeciwieństwie do metody zintegrowanej, znacząco wpływa na wzrost ekspresji w skórcie jabłek (p <0,05). Nie stwierdzono korelacji między ekspresją genu, stanem dojrzałości i immunoreaktywnością surowic pacjentów.

5.4 Ekspresja genu *Mal d 4.01*

Nowe odmiany charakteryzują się podobnym poziomem ekspresji zarówno w skórcie, jak i mięszu (współczynnik r Pearsona = 0,71, p <0,01). Metoda uprawy nie wpłynęła na ekspresję genu *Mal d 4.01*. Poziom dojrzałości dodatnio korelował z ekspresją *Mal d 4,01* (r = 0,62, p = 0,011). Nie wykazano korelacji ekspresji genu z immunoreaktywnością.

5.5 Grupowanie hierarchiczne

Dane dotyczące ekspresji badanych genów (ocenione w miąższu owocu) zostały zintegrowane za pomocą analizy głównych składników, aby uzyskać przegląd zachowania różnych odmian pod względem wszystkich mierzonych parametrów. Pierwsze dwie składowe wyjaśniały 55,6% całkowitej wariancji. Pierwsza główna składowa była w stanie wyjaśnić 32,6% całkowitej wariancji zaobserwowanej w analizie. Drugi składnik wyjaśniał 23% całkowitej wariancji i doprowadził do wyróżnienia grup odmian o niskiej (na zielono), średniej (na czerwono) i wysokiej ekspresji (na niebiesko). Większość starych odmian wykazuje większą zmienność niż nowe (rys. 1).



Rysunek 1. Wykres grup (skupień) powstałych na podstawie ekspresji genów *Mal d 1.01*, *Mal d 1.06A*, *Mal d 2.01*, *Mald 3.01*, and *Mald 4.01* w miąższu jabłek. Nazwy próbek są opisane w tabeli 4.

6 Dyskusja

Celem pracy była ocena alergenicności owoców różnych odmian jabłoni (genotypów) u pacjentów z pyłkowicą brzoową. Badano także wpływ takich czynników, jak typ tkanki, metoda hodowli czy etap dojrzałości. Wykazano, iż niektóre stare odmiany, takie jak Kandil Sinap, Ruminaka z Alma-Ata, Kantówka Gdańska i Reinette Coulon, a także nowe (Gala) mogą być uważane za hipoalergiczne. Poddając analizie ekspresję genów wykazano, że różne izoformy genu *Mal d 1* mogą mieć odmienny wpływ na alergenny potencjał jabłek.

Pacjenci uczuleni na jabłka zgłaszają nasilenie objawów, które łączą ze spożytą odmianą i dojrzałością owoców [22]. Alergen *Mal d 1* jest nietrwały i podatny na trawienie, a objawy alergii są związane głównie z OAS, rzadziej ze strony przewodu pokarmowego. Zmienność siły działania alergennego może wynikać z różnych poziomów ekspresji izoform genów kodujących białka *Mal d*.

W niniejszej pracy określono czynniki wpływające na ekspresję genów kodujących cztery główne alergeny jabłek. Wykazano, iż ekspresja izoform *Mal d 1.06A* i *Mal d 1.01* była wyższa w skórce jabłka niż w miąższu, podobnie jak w badaniu Pagliarani i wsp. [23]. Podwyższona ekspresja w skórce może wynikać z funkcji białka związanej z odpowiedzią na infekcje grzybicze i bakteryjne [21]. Ponadto Schmitz – Eibereger et al. wykazali wyższą zawartość głównego alergenu jabłkowego *Mal d 1* w skórce niż w miąższu [43]. Ekspresja *Mal d 1.06A*, w przeciwieństwie do *Mal d 1.01*, korelowała z poziomem białka *Mal d 1* (współczynnik r-

Pearsona = 0,38, $p = 0,036$) (tab. 8), co jest zgodne z wynikami badań innych autorów [5,7]. Stwierdzono ponadto, że ekspresja *Mal d 1.01* była wyższa niż *Mal d 1.06A*, podobnie do obserwacji grupy Yang'a i wsp. [44].

Metoda uprawy istotnie wpływa na ekspresję *Mal d 1.01*. Niniejsza praca jest pierwszym badaniem ujawniającym, że jabłonie uprawiane ekologicznie i intensywnie mają w owocach znacznie podwyższoną ekspresję izoformy *Mal d 1.01* w porównaniu z jabłkami pochodzącymi z upraw integrowanych (tab. 6). Sugeruje to, że izoforma *Mal d 1.01* może być zaangażowana w reakcję na patogeny i traktowanie pestycydami. Ta hipoteza jest zgodna z ustaleniami Matthesa i Schmitz-Eiberger et al. [9], którzy wykazali, że stosowanie pestycydów prowadzi do silniejszej reakcji niż jakiegokolwiek czynnik biotyczny. Co więcej, Beuning [55] wykazał podwyższony poziom PR (białek związanych z patogenezą, w tym Mal d 1) w okresie dojrzewania, infekcji grzybami patogennymi oraz w odpowiedzi na czynniki środowiskowe.

Ekspresja *Mal d 1.06A* jest istotnie skorelowana nie tylko z ilością białka Mal d 1 ale także z immunoreaktywnością surowic pacjentów, w przeciwieństwie do *Mal d 1.01* co sugeruje, że izoforma *Mal d 1.06A* ma duży wpływ na alergenicność jabłek. Wykazano również, że ekspresja *Mal d 1.06A* i *Mal d 1.01* dodatnio koreluje z dojrzałością owoców (odpowiednio współczynnik r -Pearsona = 0,52, $p = 0,038$; współczynnik r -Pearsona = 0,61, $p = 0,012$, odpowiednio, tab. 8); co jest zgodne z wynikami badań przeprowadzonych przez Schmitz-Eiberger i Matthes [43].

Badania innego alergenu jabłka - Mal d 2 były podejmowane sporadycznie. W niniejszych analizach stare odmiany jabłek cechowały się wyższym poziomem transkrypcji izoformy *Mal d 2.01* niż nowe odmiany ($p = 0,043$). Sposób uprawy wpływa na ekspresję genu *Mal d 2.01*, jabłka pochodzące z upraw ekologicznych miały mniejszą ilość transkryptu w miąższu niż owoce pochodzące z uprawy integrowanej czy intensywnej ($p < 0,05$). Różnice w ekspresji mogą być związane z reakcją roślina – patogen ze względu na to, iż białko Mal d 2 należy do klasy PR-5. Gau i in. [56] wykazali, że wysoką zawartość Mal d 2 w odmianie Remo odpornej na parcha, co sugeruje ochronną rolę tego białka przeciwko patogenom. Inne badania pokazyły również, iż u wrażliwej odmiany Elstar, po zaszczepieniu patogenami, stężenie białka Mal d 2 zwiększyło się [56].

Hsieh i in. [31] zidentyfikowali Mal d 2 jako alergen reaktywny in vitro wśród 75% pacjentów uczulonych na jabłka w USA. Niniejsze badania nie ujawniły korelacji ekspresji genów z immunoreaktywnością, co może wynikać z różnej etiologii uczulenia na białka Mal d 1 i Mal d 2.

Badania kolejnego genu – *Mal d 3* wykazały, iż metoda uprawy wpływa na ekspresję izoformy *Mal d 3.01* w skórce, ale nie w miąższu w grupie nowych odmian jabłek. Wyniki te są zgodne z badaniami Borges i in. [57], którzy udowodnili stabilny poziom genu *Mal d 3.01* w miąższu i akumulację transkryptu w skórce. Biologiczna rola tego białka polega na udziale w syntezie kutyny, która gromadzi się w powierzchniowej warstwie owocu [58]. To może wyjaśniać, dlaczego ekspresja izoformy genu *Mal d 3.01* w skórce była podwyższona w porównaniu z miąższem jabłka. Biorąc pod uwagę czynniki środowiskowe wpływające na ekspresję białek z grupy PR, Gau i wsp. [56] wykazali, że poziom Mal d 3 podczas infekcji patogenem jednak maleje. Jednakże, w niniejszych badaniach przeprowadzonych na odmianach uprawianych ekologicznie i intensywnie, ekspresja genu *Mal d 3.01* w skórce wzrosła (tab. 6).

Alergen Mal d 3 głównie uczula pacjentów u których wcześniej występowała alergia na brzoskwinie. W przeciwieństwie do alergii na Mal d 1, której objawy są ograniczone głównie do OAS, uczulenie na Mal d 3 ma poważne, a nawet zagrażające życiu konsekwencje. Mal d 3 jest jednym z nieswoistych białek przenoszących lipidy (nsLTP), odpornych na temperaturę lub

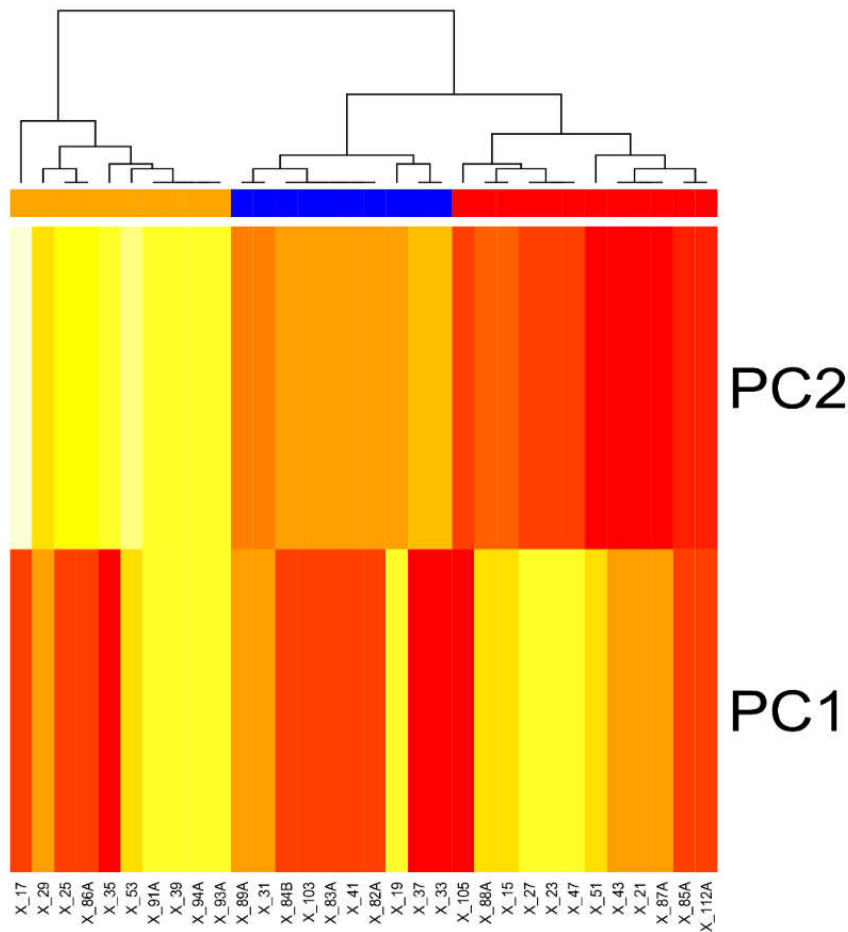
enzymy trawienne, dzięki czemu uważa się go za czynnik wywołujący reakcje od łagodnych do ciężkich po spożyciu pokarmu zawierającego ten alergen [5]. Warto zauważyć, że Fernandez – Rivas et al. [15] wykazali, że uczulenie na pyłki brzozy wiązało się z 3,5-krotnym zmniejszeniem ryzyka uczulenia na Mal d 3, podczas gdy alergia na bylicę i platan zwiększała to ryzyko odpowiednio 2,3–2,8-krotnie. W badaniach opisanych w niniejszej pracy wykazano, iż ekspresja *Mal d 3* nie koreluje z immunoreaktywnością surowic pacjentów uczulonych na pyłek brzozy, co jest zgodne z obserwacjami grupy Fernandez-Rivas [15].

Ostatnim z analizowanych genów jabłek był Mal d 4, kodujący białko należące do profilin. Zaobserwowano stabilny poziom ekspresji genu *Mal d 4.01* wśród analizowanych odmian zarówno w miąższu i jak i skórce, co może być konsekwencją funkcji biologicznej białka Mal d 4. Profiliny są prawdopodobnie zaangażowane w kaskady transdukcji sygnałów i organizację cytoszkieletu, obejmujące podstawowe funkcje komórkowe [59], z konstytutywną ekspresją, podobną do aktyny [44]. Ekspresja *Mal d 4.01* korelowała dodatnio z dojrzałością owoców (współczynnik r Pearsona = 0,62, p = 0,011). W przypadku dłuższego przechowywania owoców, ekspresja genu *Mal d 4* może jednak się obniżyć, jak wykazali Botton i in. [7]. Mal d 4 powoduje raczej łagodne objawy u alergików, głównie OAS [60]. Profiliny są dość wrażliwe na denaturację cieplną i trawienie w żołądku, dlatego alergie pokarmowe wywoływane przez profilinę są zwykle ograniczone do zespołu alergii jamy ustnej wywołanego spożyciem świeżych jabłek. Uczulenie na Mal d 4 występuje głównie wśród osób zamieszkujących tereny Europy Północnej i Środkowej, podobnie jak w przypadku alergii na Mal d 1. Niemniej jednak w badaniu SAFE częstość występowania IgE swoistych dla profiliny była wyższa u pacjentów z Europy Południowej niż u pacjentów z Europy Środkowej i Północnej [61]. Surowice pacjentów z alergią na pyłki i uczulonych na profilinę często wykazują reaktywność krzyżową IgE z innymi owocami i warzywami. W alergiach krzyżowych owoce-brzoza a także brzoza – bylica – seler – pieprz, podejrzewa się, że profilina może pełnić rolę czynnika uczulającego [61]. Jednak w niniejszym badaniu ekspresja *Mal d 4.01* nie korelowała z immunoreaktywnością surowic pacjentów uczulonych na pyłek brzozy, co może wynikać z innego czynnika sprawczego alergii u tych pacjentów, niezwiązanego z profilinami.

Oceniając jednoczesną ekspresję genów kodujących cztery główne alergeny we wszystkich badanych odmianach, zastosowano hierarchiczną klasyfikację (HCPC), która ujawniła trzy skupienia: na zielono - obejmujące odmiany z niską ekspresją, na niebiesko obejmujące wysoką ekspresję oraz skupisko zaznaczone na czerwono obejmujące geny alergenów jabłek o średniej ekspresji (rys. 1). Większość starych odmian wykazuje większą zmienność w ekspresji genów niż nowe. Co więcej, zawartość białka Mal d 1 również była bardzo zróżnicowana (od 0,3 do 37,7 $\mu\text{g} / \text{g}$ FW), wykazując szeroki zakres różnorodności biologicznej (współczynnik zmienności - odpowiednio 99,6% i 68,6% w starych i nowych odmianach). Duże zróżnicowanie pod względem zawartości Mal d 1 w odmianach starych w porównaniu z nowymi wskazuje na bogate źródło jabłek o potencjalnie niskiej alergenności (tab. 7).

Marzban i in. [13] sklasyfikował odmiany jabłek jako potencjalnie hipoalergiczne tylko na podstawie zawartości białka Mal d 1, ustalając próg alergenności na 5 $\mu\text{g}/\text{g}$. W naszej analizie po zastosowaniu modelowania nienadzorowanego grupowania integracyjnego (UIC) (rys. 2), biorąc pod uwagę nie tylko zawartość Mal d 1, ale także ekspresję *Mal d 1.06A* i immunoreaktywność, wyłoniono trzy grupy, potencjalnie nisko (prawa strona wykresu), średnio i silnie alergizujące odmiany (lewa strona wykresu) (rys. 2). Na podstawie kryteriów grupowania (UIC) oraz Marzbana [13] jako potencjalnie hipoalergiczne zostały wyłonione

następujące odmiany: Kandil Sinap, Kosztela, Rumianka z Alma-Ata, Kantówka Gdańska, Reinette Coulon i Gala.



Rysunek 2. Nienadzorowane, integracyjne grupowanie opierające się na ekspresji genu *Mal d 1.06A*, zawartości białka Mal d 1 oraz immunoreaktywności surowic.

W niniejszym projekcie odmiana Gala została włączona do grupy odmian hipoałrgennych dla pacjentów z uczuleniem na Mal d 1, ze względu na niski poziom białka Mal d 1 i ekspresję kodowanych genów, ponadto immunoreaktywność surowic wszystkich pacjentów z ekstraktem z owoców była niska, niezależnie od metody uprawy jabłoni tej odmiany. Genotyp ten jest łatwo dostępny dla konsumentów ze względu na jego popularność jako bardzo dobra odmiana deserowa.

Według Vlieg – Boerstra i in. [62] testy punktowe Prick-to-Prick nie są skuteczne w określaniu alergenicności odmian jabłek; w związku z tym zastosowano technikę slot bot z testem immunologicznym jako bardziej wiarygodną metodę oceny alergenicności owoców. W dalszych badaniach zamierzam rozszerzyć analizę immunoreaktywności przy użyciu surowic osób uczulonych nie tylko na pyłek brzozy i/lub owoce jabłoni, ale także na brzoskwinie.

Ograniczeniem niniejszej pracy było wykorzystanie rodzimych, mało znanych odmian rosnących w małych sadach lub bankach genów; jednakże, jak wykazano, stare odmiany mogą być ważnym źródłem jabłek o niskiej alergenicności.

7 Wnioski

1. Zastosowane podejście do oceny alergenicności jabłek na poziomie genetycznym, proteomicznym i immunologicznym umożliwia identyfikację odmian potencjalnie nisko, średnio i silnie alergizujących.
2. Stare odmiany jabłoni są bogatym źródłem potencjalnie hipoalergicznych jabłek. Do tej pory tylko odmiany Topaz, Elise i Santana były uważane za dobrze tolerowane przez pacjentów uczulonych na jabłka. Dzięki niniejszym badaniom można rozszerzyć listę odmian hipoalergicznych o pięć starych odmian: Kandil Sinap, Ruminaka z Alma-Ata, Kantówka Gdańska, Reinette Coulon, i jedną nową odmianę Gala.
3. Ekspresja izoformy Mal d 1.06A odgrywa główną rolę w kształtowaniu alergenicności jabłek. Ekspresja izoformy Mal d 1.06A determinuje poziom głównego alergenu jabłek Mal d 1, a tym samym wpływa na stopień alergenicności.
4. Wyniki niniejszych badań poszerzają wiedzę na temat regulacji ekspresji genów kodujących alergeny, pod wpływem metody uprawy, stopnia dojrzałości czy rodzaju tkanki, co może być przydatne w ocenie ryzyka wystąpienia reakcji alergicznej po spożyciu jabłek o odmiennym profilu ekspresji genów.
5. Poznanie molekularnego mechanizmu alergenicności jabłek i czynników modyfikujących może ułatwić poradnictwo medyczne i polepszyć opiekę nad pacjentami z alergiami pokarmowymi.
6. Wyłonione odmiany o różnym potencjale alergenicności mogą być przydatne do opracowania procedur immunoterapii alergii pokarmowej na jabłka oraz pyłek brzozy.

Literatura

1. Hassan, A.K.G.; Venkatesh, Y.P. An overview of fruit allergy and the causative allergens. *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.* 2015.
2. Gao, Z.; Weg, E.W.V. De; Matos, C.I.; Arens, P.; Bolhaar, S.T.H.P.; Knulst, A.C.; Li, Y.; Hoffmann-Sommergruber, K.; Gilissen, L.J.W.J. Assessment of allelic diversity in intron-containing Mal d 1 genes and their association to apple allergenicity. *BMC Plant Biol.* 2008, doi:10.1186/1471-2229-8-116.
3. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Home Page Available online: <http://www.allergen.org/> (accessed on Jul 8, 2020).
4. Ebner, C.; Birkner, T.; Valenta, R.; Rumpold, H.; Breitenbach, M.; Scheiner, O.; Kraft, D. Common epitopes of birch pollen and apples-Studies by western and northern blot. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1991, doi:10.1016/0091-6749(91)90152-E.
5. Sancho, A.I.; Foxall, R.; Rigby, N.M.; Browne, T.; Zuidmeer, L.; Van Ree, R.; Waldron, K.W.; Mills, E.N.C. Maturity and storage influence on the apple (*Malus domestica*) allergen Mal d 3, a nonspecific lipid transfer protein. *J. Agric. Food Chem.* 2006, doi:10.1021/jf0530446.
6. Gao, Z.S.; Van De Weg, W.E.; Schaart, J.G.; Van Arkel, G.; Breiteneder, H.; Hoffmann-Sommergruber, K.; Gilissen, L.J.W.J. Genomic characterization and linkage mapping of the apple allergen genes Mal d 2 (thaumatin-like protein) and Mal d 4 (profilin). *Theor. Appl. Genet.* 2005, doi:10.1007/s00122-005-0034-z.

7. Botton, A.; Lezzer, P.; Dorigoni, A.; Barcaccia, G.; Ruperti, B.; Ramina, A. Genetic and environmental factors affecting allergen-related gene expression in apple fruit (*Malus domestica* L. Borkh). *J. Agric. Food Chem.* 2008, doi:10.1021/jf800813d.
8. Bolhaar STHP, Van De Weg WE, Van Ree R, Gonzalez-Mancebo E, Zuidmeer L, Bruijnzeel-Koomen CAFM, et al. In vivo assessment with prick-to-prick testing and double-blind, placebo-controlled food challenge of allergenicity of apple cultivars. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;
9. Matthes A, Schmitz-Eiberger M. Apple (*Malus domestica* L. Borkh.) allergen Mal d 1: Effect of cultivar, cultivation system, and storage conditions. *J Agric Food Chem.* 2009;
10. 46. Kootstra HS, Vlieg-Boerstra BJ, Dubois AEJ. Assessment of the reduced allergenic properties of the Santana apple. *Ann Allergy, Asthma Immunol.* 2007;
11. Kalinowska M, Bielawska A, Lewandowska-Siwkiewicz H, Priebe W, Lewandowski W. Apples: Content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. *Plant Physiol Biochem* [Internet]. 2014;84:169–88. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942814002873>
12. Breinholt V. DESIRABLE VERSUS HARMFUL LEVELS OF INTAKE OF FLAVONOIDS AND PHENOLIC ACIDS. *Nat Antioxidants Anticarcinog Nutr Heal Dis.* 1999.
13. Marzban G, Puehringer H, Dey R, Brynda S, Ma Y, Martinelli A, et al. Localisation and distribution of the major allergens in apple fruits. *Plant Sci.* 2005;
14. Popescu F-D. Cross-reactivity between aeroallergens and food allergens. *World J Methodol.* 2015;
15. Fernández-Rivas M, Bolhaar S, González-Mancebo E, Asero R, van Leeuwen A, Bohle B, et al. Apple allergy across Europe: How allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;
16. Asero R, Ariano R, Aruanno A, Barzaghi C, Borrelli P, Busa M, et al. Systemic allergic reactions induced by labile plant-food allergens: Seeking potential cofactors. A multicenter study. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2020;
17. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Home Page [Internet]. [cited 2020 Jul 8]. Available from: <http://www.allergen.org/>
18. Gao ZS, Van De Weg WE, Schaart JG, Schouten HJ, Tran DH, Kodde LP, et al. Genomic cloning and linkage mapping of the Mal d 1 (PR-10) gene family in apple (*Malus domestica*). *Theor Appl Genet.* 2005;
19. Markovic-Housley Z, Degano M, Lamba D, Susani M, Ferreira F, Scheiner O, et al. Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its biological function. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;
20. Neudecker P, Schweimer K, Nerkamp J, Scheurer S, Vieths S, Sticht H, et al. Allergic cross-reactivity made visible. Solution structure of the major cherry allergen Pru av 1. *J Biol Chem.* 2001;
21. Pühringer H, Moll D, Hoffmann-Sommergruber K, Watillon B, Katinger H, Da Câmara Machado ML. The promoter of an apple Ypr10 gene, encoding the major allergen Mal d 1, is stress- and pathogen-inducible. *Plant Sci.* 2000;
22. Vieths S, Jankiewicz A, Schöning B, Aulepp H. Apple allergy: the IgE-binding potency of apple strains is related to the occurrence of the 18-kDa allergen. *Allergy.* 1994;
23. Pagliarani G, Paris R, Arens P, Tartarini S, Ricci G, Smulders MMJ, et al. A qRT-PCR assay for the expression of all Mal d 1 isoallergen genes. *BMC Plant Biol.* 2013;

24. Gao Z, Weg EWV De, Matos CI, Arens P, Bolhaar STHP, Knulst AC, et al. Assessment of allelic diversity in intron-containing Mal d 1 genes and their association to apple allergenicity. *BMC Plant Biol.* 2008;
25. Krebitz M, Wagner B, Ferreira F, Peterbauer C, Campillo N, Witty M, et al. Plant-based heterologous expression of Mal d 2, a thaumatin-like protein and allergen of apple (*Malus domestica*), and its characterization as an antifungal protein. *J Mol Biol.* 2003;
26. 18. Oh DH, Song KJ, Shin YU, Chung W Il. Isolation of a cDNA Encoding a 31-kDa, Pathogenesis-related 5/thaumatin-like (PR5/TL) Protein Abundantly Expressed in Apple Fruit (*Malus domestica* cv. Fuji). *Biosci Biotechnol Biochem.* 2000;
27. Breiteneder H, Radauer C. A classification of plant food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004.
28. Gao ZS, Van De Weg WE, Schaart JG, Van Arkel G, Breiteneder H, Hoffmann-Sommergruber K, et al. Genomic characterization and linkage mapping of the apple allergen genes Mal d 2 (thaumatin-like protein) and Mal d 4 (profilin). *Theor Appl Genet.* 2005;
29. Botton A, Lezzer P, Dorigoni A, Barcaccia G, Ruperti B, Ramina A. Genetic and environmental factors affecting allergen-related gene expression in apple fruit (*Malus domestica* L. Borkh). *J Agric Food Chem.* 2008;
30. Smole U, Bublin M, Radauer C, Ebner C, Breiteneder H. Mal d 2, the thaumatin-like allergen from apple, is highly resistant to gastrointestinal digestion and thermal processing. *Int Arch Allergy Immunol.* 2008;
31. Hsieh LS, Moos M, Lin Y. Characterization of apple 18 and 31 kd allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening. *J Allergy Clin Immunol.* 1995;
32. Poltronieri P, Hong Y. *Applied Plant Genomics and Biotechnology.* Appl. Plant Genomics Biotechnol. 2015.
33. Gomez F, Aranda A, Campo P, Diaz-Perales A, Blanca-Lopez N, Perkins J, et al. High prevalence of lipid transfer protein sensitization in apple allergic patients with systemic symptoms. *PLoS One.* 2014;
34. Gao ZS, Van De Weg WE, Schaart JG, Van Der Meer IM, Kodde L, Laimer M, et al. Linkage map positions and allelic diversity of two Mal d 3 (non-specific lipid transfer protein) genes in the cultivated apple (*Malus domestica*). *Theor Appl Genet.* 2005;
35. Andersen MBS, Hall S, Dragsted LO. Identification of European allergy patterns to the allergen families PR-10, LTP, and profilin from rosaceae fruits. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2011.
36. 28. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S, Falagiani P. Analysis of the heat stability of lipid transfer protein from apple [2]. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003.
37. Homann A, Schramm G, Jappe U. Glycans and glycan-specific IgE in clinical and molecular allergology: Sensitization, diagnostics, and clinical symptoms. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;
38. Hemmer W, Wohrl S, Wantke F, Altmann F. Immunocap Cellulose Displays Cross-Reactive Carbohydrate Epitopes and Can Cause False-Positive Test Results in Patients with Anti-CCD IgE Antibodies. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;
39. Cerutti AK, Bruun S, Donno D, Beccaro GL, Bounous G. Environmental sustainability of traditional foods: The case of ancient apple cultivars in Northern Italy assessed by multifunctional LCA. *J Clean Prod.* 2013;

40. Vlieg-Boerstra BJ, Van De Weg WE, Van Der Heide S, Dubois AEJ. Where to prick the apple for skin testing? *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2013;
41. Schenk MF, van der Maas MP, Smulders MJM, Gilissen LJWJ, Fischer ARH, van der Lans IA, et al. Consumer attitudes towards hypoallergenic apples that alleviate mild apple allergy. *Food Qual Prefer.* 2011;
42. Vegro M, Eccher G, Populin F, Sorgato C, Savazzini F, Pagliarani G, et al. Old Apple (*Malus domestica* L. Borkh) Varieties with Hypoallergenic Properties: An Integrated Approach for Studying Apple Allergenicity. *J Agric Food Chem.* 2016;
43. Schmitz-Eiberger M, Matthes A. Effect of harvest maturity, duration of storage and shelf life of apples on the allergen Mal d 1, polyphenoloxidase activity and polyphenol content. *Food Chem.* 2011;
44. Yang XT, Song J, Campbell-Palmer L, Walker B, Zhang Z. Allergen related gene expression in apple fruit is differentially controlled by ethylene during ripening. *Postharvest Biol Technol.* 2012;
45. Takács K, Szamos J, Szabó EE, Szabó Z, Nyéki J, Gelencsér É. Apple allergens as affected by cultivation technology and varietal factors. *Int J Hortic Sci.* 2010;
46. Savazzini F, Ricci G, Tartarini S. Apple allergens genomics and biotechnology: Unravelling the determinants of apple allergenicity. *Appl Plant Genomics Biotechnol.* 2015
47. Nothegger B, Reider N, Covaciu CE, Cova V, Ahammer L, Eidelpes R, et al. Allergen-specific immunotherapy with apples: selected cultivars could be a promising tool for birch pollen allergy. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2020;
48. Kiewning D, Schmitz-Eiberger M. Effects of long-term storage on Mal d 1 content of four apple cultivars with initial low Mal d 1 content. *J Sci Food Agric.* 2014;
49. Matthes A, Schmitz-Eiberger M. Polyphenol content and antioxidant capacity of apple fruit: Effect of cultivar and storage conditions. *J Appl Bot Food Qual.* 2009;
50. Reid, K.E.; Olsson, N.; Schlosser, J.; Peng, F.; Lund, S.T. An optimised grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol.* 2006, doi:10.1186/1471-2229-6-27.
51. Wiersma, P.A.; Zhang, H.; Lu, C.; Quail, A.; Toivonen, P.M.A. Survey of the expression of genes for ethylene synthesis and perception during maturation and ripening of “Sunrise” and “Golden Delicious” apple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 2007, doi:10.1016/j.postharvbio.2006.12.016
52. Ramakers, C.; Ruijter, J.M.; Lekanne Deprez, R.H.; Moorman, A.F.M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* 2003, doi:10.1016/S0304-3940(02)01423-4.
53. Meng, C.; Helm, D.; Frejno, M.; Kuster, B. moCluster: Identifying Joint Patterns Across Multiple Omics Data Sets. 2015, doi:10.1021/acs.jproteome.5b00824.
54. Tibshirani, R.; Walther, G.; Hastie, T. Estimating the number of clusters in a data set via the gap statistic. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Stat. Methodol.* 2001, doi:10.1111/1467-9868.00293.
55. Beuning, L.L.; Bowen, J.H.; Persson, H.A.; Barraclough, D.; Bulley, S.; MacRae, E.A. Characterisation of Mal d 1-related genes in *Malus*. *Plant Mol. Biol.* 2004.
56. Gau, A.E.; Koutb, M.; Pitrowski, M.; Kloppstech, K. Accumulation of pathogenesis-related proteins in the apoplast of a susceptible cultivar of apple (*Malus domestica* cv. Elstar) after infection by *Venturia inaequalis* and constitutive expression of PR genes in the resistant cultivar Remo. *Eur. J. Plant Pathol.* 2004, 110, 703–711.

57. Borges, J.P.; Jauneau, A.; Brulé, C.; Culerrier, R.; Barre, A.; Didier, A.; Rougé, P. The lipid transfer proteins (LTP) essentially concentrate in the skin of Rosaceae fruits as cell surface exposed allergens. *Plant Physiol. Biochem.* 2006.
58. Kader, J.C. Lipid-transfer proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1996.
59. Machesky, L.M.; Poland, T.D. Profilin as a potential mediator of membrane-cytoskeleton communication. *Trends Cell Biol.* 1993, doi:10.1016/0962-8924(93)90087-H.
60. Zuidmeer, L.; Goldhahn, K.; Rona, R.J.; Gislason, D.; Madsen, C.; Summers, C.; Sodergren, E.; Dahlstrom, J.; Lindner, T.; Sigurdardottir, S.T.; et al. The prevalence of plant food allergies: A systematic review. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008, doi:10.1016/j.jaci.2008.02.019.
61. Zuidmeer L, Van Leeuwen WA, Budde IK, Breiteneder H, Ma Y, Mills C, et al. Allergenicity assessment of apple cultivars: Hurdles in quantifying labile fruit allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* 2006;
62. Vlieg-Boerstra BJ, Van De Weg WE, Van Der Heide S, Kerkhof M, Arens P, Heijerman-Poppelman G, et al. Identification of low allergenic apple cultivars using skin prick tests and oral food challenges. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2011;
63. Szamos J, Takács K, Szabó EE, Kovács E, Gelencsér E. Purification of natural Mal d 1 and Mal d 2 allergens and monitoring of their expression levels during ripening in Golden Delicious apple. *Food Res Int.* 2011;
64. Zuidmeer L, Van Leeuwen WA, Budde IK, Cornelissen J, Bulder I, Rafalska I, et al. Lipid transfer proteins from fruit: Cloning, expression and quantification. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005;
65. Wagner A, Szwed A, Buczyłko K, Wagner W. Allergy to apple cultivars among patients with birch pollinosis and oral allergy syndrome. *Ann Allergy, Asthma Immunol.* 2016;
66. Cudowska B, Kaczmarek M, Restani P. Immunoblotting in the diagnosis of cross-reactivity in children allergic to birch. *Rocz Akad Med w Białymstoku.* 2005;
67. Son DY, Scheurer S, Hoffmann A, Haustein D, Vieths S. Pollen-related food allergy: Cloning and immunological analysis of isoforms and mutants of Mal d 1, the major apple allergen, and Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Eur J Nutr.* 1999;
68. Romer E, Chebib S, Bergmann KC, Plate K, Becker S, Ludwig C, et al. Tiered approach for the identification of Mal d 1 reduced, well tolerated apple genotypes. *Sci Rep.* 2020;
69. Asero R, Marzban G, Martinelli A, Zaccarini M, Laimer Da Câmara Machado M. Search for low allergenic apple cultivars for birch pollen-allergic patients: Is there a correlation between in vitro assays and patient response? *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2006;
70. Carnés J, Ferrer A, Fernández-Caldas E. Allergenicity of 10 different apple varieties. *Ann Allergy, Asthma Immunol.* 2006;
71. Sancho AI, Foxall R, Browne T, Dey R, Zuidmeer L, Marzban G, et al. Effect of postharvest storage on the expression of the apple allergen Mal d 1. *J Agric Food Chem.* 2006;
72. Barden JA, Marini RP. Incidence of diseases on fruit of nine apple genotypes as influenced by six fungicide treatments. *Fruit Var J.* 1998;

Załączniki

Pełnotekstowe wersje publikacji ujętych w cyklu wraz z suplementem.

Wkład poszczególnych współautorów w pracach jest opisany na końcu każdej publikacji.



REVIEW

Apple allergy: Causes and factors influencing fruits allergenic properties—Review

Aleksandra Siekierzynska¹ | Dorota Piasecka-Kwiatkowska² |
Aleksander Myszkowski³ | Marta Burzynska² | Barbara Sozanska⁴ | Tomasz Sozanski⁵

¹Department of Physiology and Plant Biotechnology, Institute of Agricultural Sciences, Land Management and Environmental Protection, University of Rzeszow, Rzeszow, Poland

²Department of Food Biochemistry and Analysis, Poznan University of Life Sciences, Poznan, Poland

³Institute of Medical Sciences, University of Rzeszow, Rzeszow, Poland

⁴1st Department of Pediatric Allergology and Cardiology, Wrocław Medical University, Wrocław, Poland

⁵Department of Pharmacology, Wrocław Medical University, Wrocław, Poland

Correspondence

Aleksandra Siekierzynska, Department of Physiology and Plant Biotechnology, Institute of Agricultural Sciences, Land Management and Environmental Protection, University of Rzeszow, Cwiklinskiej 2, 35-601 Rzeszow, Poland.
Email: ola_sk@wp.pl

Funding information

Polish Ministry of Science and Higher Education's program, Grant/Award Number: Publication was co-financed within the framework o

Abstract

Apple tree fruits (*Malus × domestica* Borkh.) are a rich source of nutrients and nutraceuticals and are recommended as a part of the healthy, staple diet. However, apples could be also the cause of allergies including severe reactions. Allergies to fruits like apples are predominantly associated with pollinosis. In North and Central Europe, sensitisation to apples is caused mainly by cross-reactive birch pollen aeroallergen, whereas in the Mediterranean area of Europe, apple allergy is mostly associated with allergies to peach. The allergenicity of apples differ across cultivars but only a few varieties were studied. Some factors changing apples allergenicity were identified, including unmodifiable and potentially modifiable factors for example cultivation method, ripening stage and storage conditions. This review presents current knowledge about the molecular basis of apple allergenicity and factors influencing its level. Selecting cultivars with low potential of allergenicity, removing apple peel and heat treatment could reduce the risk of severe allergy reaction incidence and presumably can be used in birch pollen immunotherapy.

KEYWORDS

allergy, antioxidants, apple varieties, birch pollinosis, polyphenols

Abbreviations: BAT, basophil activation test; BMI, body mass index; CCDs, cross reactive carbohydrate determinants; EAST, Enzyme Allergosorbent Test; ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; EST, expressed sequence tag; HR, histamine release test; LG, linkage group; (ns)LTPs, (non-specific) lipid transfer proteins family; OAS, oral allergy syndrome; OPT, oral provocation test; PPO, polyphenol oxidase enzyme; PR, Pathogen Resistance Proteins, pathogenesis-related protein family; PR, Pathogen Resistance Proteins, pathogenesis-related protein family; R, resistant; RAST, inhibition and immunoblotting; S, susceptible; sIgE, specific IgE; SPT, skin prick test; VS, very susceptible.

1 | BACKGROUND

Apple tree fruits (*Malus × domestica* Borkh.) are a rich source of nutrients and nutraceuticals like polyphenols and other phytochemicals. The main components of apple phytochemicals are phenolic acids, dihydrochalcones, flavonoids (quercetin glycosides), catechins and oligomeric procyanidins as well as cyanidin glucosides in red fruits.¹ Due to the listed ingredients, apple may reduce risk of chronic diseases, through various mechanisms, including antioxidant or anti-proliferative.² They may also improve the functioning of the digestive tract, regulate body mass and increase the respiratory efficiency of the body.³ Unfortunately, apples could also be the cause of allergies including severe reactions.

About 5%–8% children and 2%–3% adults suffer from food allergy.⁴ Allergies to fruits like apple, pear, peach, apricot, cherry, and to vegetables such as carrot, celery and potato are more frequent in older children and adults and they are predominantly associated with cross-reactivity between aeroallergens like tree pollens, grass or ragweed pollens and food allergens due to structural homology of some allergenic proteins.⁵ In North and Central Europe, the most frequent example is the symptomatic response to raw apple in patients sensitised to birch tree pollens.⁶ The primary sensitisation to allergenic molecules of *Betula verrucosa* (e.g., Bet v1) triggers the synthesis of specific IgE antibodies which are capable to cross-react with its homologues in apple (e.g., Mal d1). The clinical expression of such immune-mediated reaction includes rapid-onset pruritus of the oropharynx, angio-oedema, ears' pruritus and sometimes larynx constriction. These symptoms known as an Oral Allergy Syndrome (OAS) are usually mild and occur directly after exposure to the allergens. The apple allergens are heat-labile and susceptible to digestion thus the symptoms are rarely connected with gastrointestinal track. Asero et al.⁷ estimated the pathogenesis-related protein family PR-10 and profilin are although labile molecules, can induce systemic reactions facilitated by proton pump inhibitors, ingestion of large amounts of raw foods and fasting. The cross-reactivity properties and allergenic potential of different apple cultivars may vary and this phenomenon may be clinically useful in planning oral immunotherapy treatment with the use of less allergenic cultivars. These issues will be discussed in our article.

1.1 | Sensitising components

1.1.1 | Mal d proteins

So far, four allergens have been identified and officially incorporated into the nomenclature by WHO/IUIS⁸ in apples (*Malus × domestica* Borkh.): Mal d 1, Mal d 2, Mal d 3 and Mal d 4. Among them, Mal d 1 is clinically the most important allergen in North and Central Europe, Mal d 3 in Southern Europe. In Mediterranean, the two other proteins Mal d 2 and Mal d 4, are also associated with the hyper-reactivity to apple fruits.

Mal d 1 is identified as a 17–18 kDa protein of 158–159 amino acids encoded by 480–483 nucleotides.⁹ Its biological function is connected with fungal and bacterial infection response due to the ribonuclease activity of proteins belonging to the pathogenesis-related protein family (PR-10). Mal d 1 may also be involved in binding and transport of plant steroids and intracellular signalling.^{10–12} The abiotic and biotic stress affects the content of Mal d 1 allergen. Time and conditions of apple fruits storage may quantitatively alter the allergenic properties of their proteins.¹³ Moreover, patients with birch pollen-related food allergies report the severity of their symptoms strongly dependent on apple variety and the degree of maturity.¹⁴ Variability in the allergenic potency might result from the different expression levels of the Mal d 1 isoforms clustered in four groups (Mal 1.01–Mal d 1.04) (www.allergen.org). In the apple genome, many sequences of isoallergens has been identified so far. Mal d 1 is encoded by 18 genes, seven of these are clustered into linkage group 13 (LG13), nine genes clustered into LG16 and one of them is unclustered.⁹ The gene family was divided into five groups depending on number and size of introns and analysis of EST (expressed sequence tag).¹⁵ In the first subfamily of the Mal d 1 protein, two major genetic variants *Mal d 1.01* and *Mal d 1.02*, in the second *Mal d 1.04* and *Mal d 1.05*, in the third *Mal d 1.06A*, *Mal d 1.06B*, *Mal d 1.06C*, in the fourth: *Mal d 1.07–1.09*, *Mal d 1.03A–G* and in the fifth *Mal d 1ps1* have been identified.⁹ Gao et al.¹⁶ demonstrated the association of expression of *Mal d 1.04* and *Mal d 1.06A* with the allergenicity. Moreover, *Mal d 1.06A* showed the allele dosage effect on the amount of Mal d 1 protein.¹⁶

Another apple allergen Mal d2 (23 kDa), is also known to be connected with apple allergenicity phenomenon. Mal d 2 belongs to thaumatin-like proteins (TLPs) group with antifungal properties (PR-5).¹⁷ TLPs are major protein component in mature apple fruit¹⁸ and they are considered as a panallergen in food and in pollen.¹⁹ Mal d 2 is similar to protein extracted from the fruit *Thaumatococcus daniellii*. Mal d 2 proteins are encoded by *Mal d 2.01*, *2.02* and *2.03* genes,²⁰ although there is only one isoform (Mal d 2.01) officially recognised by WHO/IUIS.⁸ Two copies of the *Mal d 2.01* gene are slightly different in the signal peptide and intron size mapped at the same position on LG 9.²¹ Mal d 2 proteins are very stable molecules, resistant to heat denaturation and proteolysis, as a result of the presence of the eight disulphide bridges which hold together three-dimensional structure.²² Hsieh et al.²³ identified Mal d 2 as an in vitro reactive allergen among 75% (25/34) of apple allergic subjects recruited in the study in USA.²³

A 9 kDa molecular weight protein—Mal d 3 identified in apples, belongs to the non-specific lipid transfer proteins family (nsLTPs). Proteins from that family are major allergens sensitising patients with non-pollen related allergies to *Rosaceae* fruits.^{24–27} In Mediterranean countries, patients allergic to apples, but not sensitised to *Betula* pollen, confer allergies to peach and other *Rosaceae* and non-*Rosaceae* fruits. Apple Mal d 3 allergens cross-react with peach Pru p 3 allergens. Mal d 3 is encoded by two genes *Mal d 3.01* and *Mal d 3.02*.²⁵

Mal d 4 is a cytosolic protein 12–15 kDa,²⁴ playing essential role in plant growth and development by participating in the regulation of actin filament polymerisation.²⁰ Allergy to Mal d 4 occurs mostly in the Mediterranean, with minor role in apple sensitisation.²⁶ This allergen is involved in sensitisation to fruits of other species and strongly cross-reacts with birch pollen Bet v 2 profilin.^{13,28} Mal d 4 is encoded by three genes *Mal d 4.01*, *Mal d 4.02* and *Mal d 4.03*,²⁰ among them *Mal d 4.02* has the highest expression level.²¹

1.2 | CCDs—cross reactive carbohydrate determinants

About 20% of sensitised patients to pollen produce IgE antibodies that can bind carbohydrate determinants. IgE specific to CCDs are considered to have no or minor clinical significance. Glycans with carbohydrate determinants in plants and in invertebrates differ from those glycoproteins existing in mammals. These foreign epitopes for humans are highly immunogenic resulting in specific IgE antibodies.²⁹ The widespread presence of fucose and xylose on N-linked glycans of plants and in invertebrates may explain the high degree of cross-reactivity that has been reported for CCD-specific IgE antibodies.³⁰ The clinical relevance of IgE antibodies to CCDs relies on the composition of the allergen-monovalent or multivalent with respect to the carbohydrate determinant.

To avoid misdiagnosis, an investigation of the presence of CCD antibodies should be conducted. Determination of anti-CCD IgE antibody in blood can be tested with bromelain or horseradish peroxidase, and also by the use of a test specific to MUXF3, a common plant glycan structure.³¹ A positive in vitro test and a negative skin prick test to the same plant food allergen may indicate presence of non-cross-linking CCD-specific IgE antibodies to that allergen. However, this phenomenon does not exclude cross-linking to other allergens with multivalent CCD epitopes or the presence of concomitant IgE antibodies to peptide epitopes.³²

1.3 | Allergenicity varies regards to apple tree varieties and cultivation method

Despite common allergies to apples, only a few studies assessing the amount of different apple allergens were conducted in commonly cultivated varieties: Golden Delicious, Granny Smith, Fuji, Santana, Cox's Orange Pippin, Topaz, Braeburn^{12,30,31} and mainly in relation to the Mal d 1 (Tables 1 and 2). The extensive use of these popular cultivars has resulted in uniformity of commercial apple orchards and the limitation of genetic biodiversity.³³

The issue of the expression of genes encoding allergens in apples is also poorly understood. Even limited number of publications regarding the gene expression encoding apple allergens showed an association among gene expression and degree of maturity, storage conditions mainly with respect to the *Mal d 1* gene (Table 1). Therefore, it is expected to expand similar research to a larger

number of varieties, in particular with regard to old ones. There are only a few papers^{40,44} describing allergen gene expression in old varieties, which are valuable in terms of taste, nutritional value, processing or for breeding. Nevertheless, cultivation of apple varieties with low allergenic potential is not developed. Currently, only Santana, Topaz and Elise cultivars, are considered hypoallergenic, and are quite well tolerated by patients with allergies. It has been shown that the Santana variety is characterised by considerable resistance to apple scab, thanks to which it is possible to significantly reduce the use of fungicides in its cultivation.⁵¹ There is some evidence that pesticide treatment may lead to an even more robust response inducing higher expression of Mal d 1 than biotic factor.⁴⁰

1.4 | Abiotic factors influencing allergenicity

Variation of Mal d 1 content during ripening, postharvest maturity, and storage time and conditions were confirmed only in the context of Golden Delicious, Topaz, Braeburn and Cox'Orange Pippin apple varieties. During the ripening period, content of Mal d 1 allergens continuously increases from about 0.2 mg/100 g fresh weight to approximately 0.8 mg/100 g fresh weight (130–164 days after blooming respectively). Mal d 1 content in apple fruit varieties Braeburn, Topaz harvested at different stages of ripeness revealed no differences.³⁶ After an additional shelf life, significantly higher Mal d 1 concentration in the overripe fruit in comparison to the unripe fruit were determined. Storage, at ambient temperature, of 12 weeks cold-stored fruit of above mentioned cultivars led also to Mal d 1 accumulation in unripe and overripe harvested fruit, contrary to ripe fruit, where Mal d 1 remained stable.³⁹ The study emphasises the need for further research on other apple cultivars to ascertain the differences of Mal d 1 content at different maturity stage and during apple storage. Several studies shown the elevation of Mal d 1 protein content and up-regulation of *Mal d 1* gene expression during storage and by cold stress.⁴⁰ However, Botton et al.²¹ indicated stable level of gene expression in analysed apple cultivars, inter alia in Golden Delicious and Braeburn. *Mal d 3* expression was two to five times higher in apple skin than in a pulp and down-regulated upon storage time by about 5 months. The duration of storage time down regulates Mal d 4 coding genes.²¹ Yang et al.³⁵ showed a decrease in expression of the Mal d 4 isoforms after harvest and during ripening. It is suggested that different responses to ethylene can affect profilin gene expression.

A point of interest is that organic farming weakened Mal d content,⁵² unfortunately, commercial varieties with a significantly reduced resistance to apple diseases are not suitable for this type of crop. We should focus our attention on old varieties, in which a significant resistance to fungal diseases is observed, making them suitable for organic farming that is getting modern nowadays. Moreover, the impact of cultivation methods on allergenicity is not established nor in commonly cultivated apple trees neither in old cultivars.

TABLE 1 The list of apple cultivars and methods used for Mal d allergens studies

Cultivar	Analysis method	Mal d 1	Mal d 2	Mal d 3	Mal d 4
Golden Delicious	Gene expression	3, 21, 34–36	21, 34–36	21, 35–37	21, 38
	ELISA, EAST, immunoblotting	3, 14, 16, 16, 21, 34, 34, 36, 38–42, 48–50	21, 34	21, 42, 43	21, 38
	SPT/prick-to-prick	36, 41, 44	36	43	21, 35
Granny Smith	Gene expression	3, 21, 36	21	21	21
	ELISA, EAST, immunoblotting	3, 14, 16, 31, 34, 42, 48, 50	36	43	
	SPT/prick-to-prick	44		43	
Baeburn	Gene expression	21	21	21	21
	ELISA, EAST, immunoblotting	13, 14, 21, 35, 38–40	21	21	21
	SPT/prick-to-prick	13			
Elstar	Gene expression	3			
	ELISA, EAST, immunoblotting	3			38
	SPT/prick-to-prick				38
Topaz	Gene expression				
	ELISA, EAST, immunoblotting	13, 39, 40, 45			
	SPT/prick-to-prick				
Elise	Gene expression				
	ELISA, EAST, immunoblotting	13, 45			
	SPT/prick-to-prick	44			
Santana	Gene expression	46			
	ELISA, EAST, immunoblotting	49			
	SPT/prick-to-prick	16, 44			
Cox's Orange Pippin, Jonagored, Jonagold, Boskoop, Priscilla, Fuji, Jonathan, prima, Fiesta, McIntosh, Gala, Idared, Gloster, Szampion	Gene expression	3, 36, 47			
	ELISA, EAST, immunoblotting	3, 14, 14, 28, 36, 38, 40, 45, 47, 50		43	
	SPT/prick-to-prick	16, 41, 44		43	
Old varieties: Pink Lady Cripps Pink, Annurca, 'Calvilla Bianca d'Inverno, Mutsu, Osnabruecker Renette, Delorina, Resista, Rajca, Grey Renette, Starking	Gene expression	21, 36	21, 36	21, 36	21
	ELISA, EAST, immunoblotting	21, 36	21, 36	43	21
	SPT/prick-to-prick	40,41,44	43	43	

Abbreviations: EAST, Enzyme Allergosorbent Test; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; SPT, Skin Prick Test.

1.5 | Biotic factors

Plants react to pathogen attacks (Table 3), wounding, UV-B radiation, osmotic shock, low temperature, water deficit, chemicals like ethylene or salicylic acid, inter alia by producing proteins belonging to the PR (Pathogen Resistance Proteins) family. Three of the four main apple allergens belongs to PR, which are connected with natural resistance to powdery mildew or/and to apple scab or to other stressors and chemicals.⁵³

1.6 | Allergenicity modifying factors

The allergenicity of apples is more complex due to the interactions of Mal d 1 protein with polyphenols (catechin) and enzymatic

antioxidant system. The reaction between Mal d 1 and oxidised polyphenols can result in decrease of IgE binding as shown in Braeburn cultivar.³⁹ On the other hand, in Topaz, with high polyphenols content and low activity of PPO (polyphenol oxidase enzyme) conferring a high total anti-oxidative capacity, IgE binding to Mal d 1 is also reduced.⁵⁶ According to Schmits-Eiberger and Matthes,³⁹ in the cv. Braeburn, cv. Golden Delicious and cv. Topaz amount of total polyphenols were stable during maturation; however during storage, polyphenol content significantly decreased.

Traditional cultivation of apple varieties with low allergenic potentials is not well developed. Currently, Santana, Topaz and Elise cultivars, are considered as hypoallergenic, and are quite well tolerated in patients experiencing OAS syndrome.⁴⁰ Furthermore, it has been demonstrated that Santana is characterised by considerable resistance to apple scab, thanks to which it is possible to significantly

TABLE 2 Mal d 1 protein content across apple cultivars

Cultivar	Mal d 1 content	Units	Literature
Golden Delicious	12.1	µg/g FW	3
	$C_{50} = 0.12$, $C_{50} = 0.36$	µg	14
	45 (4.5)	µg/g (mg/100 g)	48
	2.9, 3.4, about 10.0	µg/g FW	49
	14.1–135.17	µg/g	38
	7.3–18.6	µg/g FW	16
	6.2–7.6	µg/g f FW	40
	7–8 (0.7–0.8)	µg/g (mg/100 g)	34
	7.6–17	µg/g	39
Granny Smith	5.95–18.17	µg/g	16
	12.14, 8.81	µg/g FW	3
	16 (1.6)	µg/g (mg/100 g)	48
	2.3–6.4	µg/g FW	34
	5.45–12.14	µg/g	50
Baeburn	9.45–271.20	µg/g	38
	$C_{50} = 0.12$	µg	14
Topaz	2.0–6.4	µg/g FW	40
	6.3–16.1	µg/g	39
	<1–25	µg/g FW	45
Santana	0.5, 2.3, about 5.0	µg/g FW	49
Elise	0.25–17	µg/g FW	45
Fuji	11.50	µg/g FW	3
	5.4, 11.5	µg/g	28
	32.84–455.01	µg/g	38
	50.8	µg/g	47
Boskoop	$C_{50} = 2$	µg	14
	1–25	µg/g FW	45
Jonagold	7 (0.7)	µg/g (mg/100 g)	48
	3.33–5.5	µg/g FW	50
	1.3–8.7	µg/g FW	40
	12.98–38.82	µg/g	38
	17.2	µg/g	47
Idared	8 (0.8)	µg/g (mg/100 g)	48
Gloster	4 (0.4)	µg/g (mg/100 g)	48
Gala	14.6	µg/g FW	40

Abbreviations: C_{50} , concentration of protein causing 50% inhibition of IgE binding from patients sera; FW, fresh weight.

reduce the usage of chemicals with anti-fungal properties in its cultivation,⁵¹ thus the use of organic cultivation of this variety may led to reduce the amount of allergenic proteins. In a recent study of allergenic potential of apples cultivars, tested by prick-to-prick skin

tests and provocation test in 52 patients with birch pollen hay fever and OAS, significant differences among various cultivars were revealed. Red-fleshed cultivars gave the mildest reactions, being proposed as potentially useful tool in oral immunotherapy treatment

TABLE 3 Fungi disease susceptibility and allergenicity

Apple variety	Apple scab	Powdery mildew	Allergenicity	Study
Golden delicious	S	VS	High	54
Granny smith	S	VS	Low	55
Braeburn	R	R	Low/high	14,55
Elstar	S	S	Low	55
Topaz	R	R	Low	55
Elise	S/R	S	Low	55
Santana	R	S	Low	55

Abbreviations: R, resistant; S, susceptible; VS, very susceptible.

in patients with birch pollen allergy and OAS due to birch-apple cross-reactivity.⁵⁷ Post-harvest treatment may have additional role in apple fruit allergenicity. Hsieh et al.²³ revealed that prolonged storage at 4°C of Golden Delicious and Granny Smiths fruits can elevate Mal d 1 and Mal d 2 protein levels. In low allergenic cultivars like Santana and Elise, Mal d 1 proteins increased along with storage time, but after treatment with MCP-1-inhibiting ripening, the content of Mal d 1 protein was reduced.⁴⁵

2 | CONCLUSIONS

In Northern and Central Europe, apple allergies are mostly related to birch pollen sensitisation and are caused by cross-reactive proteins Bet v 1 and Mal d 1. In the Mediterranean, apple allergies are less frequent but severe and associated with sensitisation to LTPs (Mal d 3).

Variation in the Mal d 1 isoforms expression may account for the variability of allergenic potency of apple cultivars, which suggests that genetic factors could have a major role in controlling the Mal d 1 allergenicity in mature apples.

The differences in the allergenic potential of apple fruits can be also the effect of the degree of ripeness of the fruit, as a result of an accumulation of Mal d 1 protein during maturation. Similarly, the time and conditions of fruit storage affect the accumulation of the Mal d 1 and Mal d 2 allergens as shown in Golden Delicious and Granny Smiths varieties.

The total anti-oxidative status of apple fruits and interactions of polyphenols with Mal d 1 protein can affect the allergenic potential and the ability to bind IgE antibodies.

Currently, only the Topaz, Elise and Santana varieties are considered to be well tolerated by apple allergic patients.

Selecting cultivars with low potential of allergenicity, removing apple peel and heat treatment could reduce the risk of severe allergy reaction incidence and presumably can be used in birch pollen immunotherapy. Knowledge of the molecular mechanism of apples allergenicity and factors that modify the reaction severity could

facilitate medical counselling and improve patients' care with allergies related with apple fruits.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was co-financed within the framework of the Polish Ministry of Science and Higher Education's program: 'Regional Initiative Excellence' in the years 2019–2022 (no. 005/RID/2018/19), financing amount 12,000,000 PLN.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there are no conflict of interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Aleksandra Siekierzyńska made substantial contributions to conception and design and drafted the manuscript. Aleksandra Siekierzyńska, Aleksander Myszka and Marta Burzyńska participated in literature study. Dorota Piasecka-Kwiatkowska, Barbara Sozanska and Tomasz Sozanski revised critically for important intellectual content.

ORCID

Aleksandra Siekierzyńska  <https://orcid.org/0000-0003-1261-3050>

REFERENCES

- Kalinowska M, Bielawska A, Lewandowska-Siwkiewicz H, Priebe W, Lewandowski W. Apples: content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. *Plant Physiol Biochem*. 2014;84: 169-188. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942814002873>
- Breinholt V. Desirable versus harmful levels of intake of flavonoids and phenolic acids. In *Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition, Health and Disease*. Elsevier; 1999.
- Marzban G, Puehringer H, Dey R, et al. Localisation and distribution of the major allergens in apple fruits. *Plant Sci*. 2005.
- Hassan AKG, Venkatesh YP. An overview of fruit allergy and the causative allergens. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2015.
- Popescu F-D. Cross-reactivity between aeroallergens and food allergens. *World J Methodol*. 2015.
- Fernández-Rivas M, Bolhaar S, González-Mancebo E, et al. Apple allergy across Europe: how allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. *J Allergy Clin Immunol*. 2006.
- Asero R, Ariano R, Aruanno A, et al. Systemic allergic reactions induced by labile plant-food allergens: seeking potential cofactors. A multicenter study. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2020.
- WHO/IUIS. *Allergen Nomenclature Home Page*. <http://www.allergen.org/>. Accessed July 8, 2020.
- Gao ZS, Van De Weg WE, Schaart JG, et al. Genomic cloning and linkage mapping of the Mal d 1 (PR-10) gene family in apple (*Malus domestica*). *Theor Appl Genet*. 2005.
- Markovic-Housley Z, Degano M, Lamba D, et al. Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its biological function. *J Allergy Clin Immunol*. 2002.
- Neudecker P, Schweimer K, Nerkamp J, et al. Allergic cross-reactivity made visible. Solution structure of the major cherry allergen Pru av 1. *J Biol Chem*. 2001.
- Pühringer H, Moll D, Hoffmann-Sommergruber K, Watillon B, Katinger H, Da Machado Câmara ML. The promoter of an apple

- Ypr10 gene, encoding the major allergen Mal d 1, is stress- and pathogen-inducible. *Plant Sci* 2000.
13. Bolhaar STHP, Van De Weg WE, Van Ree R, et al. In vivo assessment with prick-to-prick testing and double-blind, placebo-controlled food challenge of allergenicity of apple cultivars. *J Allergy Clin Immunol*. 2005.
 14. Vieths S, Jankiewicz A, Schöning B, Aulepp H. Apple allergy: The IgE-binding potency of apple strains is related to the occurrence of the 18-kDa allergen. *Allergy*. 1994.
 15. Pagliarani G, Paris R, Arens P, et al. A qRT-PCR assay for the expression of all Mal d 1 isoallergen genes. *BMC Plant Biol*. 2013.
 16. Gao Z, Weg EWVDe, Matos CI, et al. Assessment of allelic diversity in intron-containing Mal d 1 genes and their association to apple allergenicity. *BMC Plant Biol*. 2008.
 17. Krebitz M, Wagner B, Ferreira F, et al. Plant-based heterologous expression of Mal d 2, a thaumatin-like protein and allergen of apple (*Malus domestica*), and its characterization as an antifungal protein. *J Mol Biol*. 2003.
 18. Oh DH, Song KJ, Shin YU, Chung WII. Isolation of a cDNA encoding a 31-kDa, pathogenesis-related 5/thaumatin-like (PR5/TL) protein abundantly expressed in apple fruit (*Malus domestica* cv. Fuji). *Biosci Biotechnol Biochem*. 2000.
 19. Breiteneder H, Radauer C. A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2004.
 20. Gao ZS, Van De Weg WE, Schaart JG, et al. Genomic characterization and linkage mapping of the apple allergen genes Mal d 2 (thaumatin-like protein) and Mal d 4 (profilin). *Theor Appl Genet*. 2005.
 21. Botton A, Lezzer P, Dorigoni A, Barcaccia G, Ruperti B, Ramina A. Genetic and environmental factors affecting allergen-related gene expression in apple fruit (*Malus domestica* L. Borkh.). *J Agric Food Chem*. 2008.
 22. Smole U, Bublin M, Radauer C, Ebner C, Breiteneder H. Mal d 2, the thaumatin-like allergen from apple, is highly resistant to gastrointestinal digestion and thermal processing. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008.
 23. Hsieh LS, Moos M, Lin Y. Characterization of apple 18 and 31 kD allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening. *J Allergy Clin Immunol*. 1995.
 24. Poltronieri P, Hong Y. Applied plant genomics and biotechnology. *Appl Plant Genomics Biotechnol*. 2015.
 25. Gao ZS, Van De Weg WE, Schaart JG, et al. Linkage map positions and allelic diversity of two Mal d 3 (non-specific lipid transfer protein) genes in the cultivated apple (*Malus domestica*). *Theor Appl Genet*. 2005.
 26. Andersen MBS, Hall S, Dragsted LO. Identification of European allergy patterns to the allergen families PR-10, LTP, and profilin from Rosaceae fruits. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2011.
 27. Gomez F, Aranda A, Campo P, et al. High prevalence of lipid transfer protein sensitization in apple allergic patients with systemic symptoms. *PLoS One*. 2014.
 28. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S, Falagiani P. Analysis of the heat stability of lipid transfer protein from apple [2]. *J Allergy Clin Immunol*. 2003.
 29. Jin C, Hantusch B, Hemmer W, Stadlmann J, Altmann F. Affinity of IgE and IgG against cross-reactive carbohydrate determinants on plant and insect glycoproteins. *J Allergy Clin Immunol*. 2008.
 30. Homann A, Schramm G, Jappe U. Glycans and glycan-specific IgE in clinical and molecular allergology: sensitization, diagnostics, and clinical symptoms. *J Allergy Clin Immunol*. 2017.
 31. Hemmer W, Wohrl S, Wantke F, Altmann F. Immunocap cellulose displays cross-reactive carbohydrate epitopes and can cause false-positive test results in patients with anti-CCD IgE antibodies. *J Allergy Clin Immunol*. 2014.
 32. Van Der Veen MJ, Van Ree R, Aalberse RC, et al. Poor biologic activity of cross-reactive IgE directed to carbohydrate determinants of glycoproteins. *J Allergy Clin Immunol*. 1997.
 33. Cerutti AK, Bruun S, Donno D, Beccaro GL, Bounous G. Environmental sustainability of traditional foods: the case of ancient apple cultivars in Northern Italy assessed by multifunctional LCA. *J Clean Prod*. 2013.
 34. Szamos J, Takács K, Szabó EE, Kovács E, Gelencsér E. Purification of natural Mal d 1 and Mal d 2 allergens and monitoring of their expression levels during ripening in Golden Delicious apple. *Food Res Int*. 2011.
 35. Yang XT, Song J, Campbell-Palmer L, Walker B, Zhang Z. Allergen related gene expression in apple fruit is differentially controlled by ethylene during ripening. *Postharvest Biol Technol*. 2012.
 36. Vegro M, Eccher G, Populin F, et al. Old apple (*Malus domestica* L. Borkh.) varieties with hypoallergenic properties: an integrated approach for studying apple allergenicity. *J Agric Food Chem*. 2016.
 37. Zuidmeer L, Van Leeuwen WA, Budde IK, et al. Lipid transfer proteins from fruit: cloning, expression and quantification. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005.
 38. Zuidmeer L, Van Leeuwen WA, Budde IK, et al. Allergenicity assessment of apple cultivars: hurdles in quantifying labile fruit allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006.
 39. Schmitz-Eiberger M, Matthes A. Effect of harvest maturity, duration of storage and shelf life of apples on the allergen Mal d 1, polyphenoloxidase activity and polyphenol content. *Food Chem* 2011.
 40. Matthes A, Schmitz-Eiberger M. Apple (*Malus domestica* L. Borkh.) allergen Mal d 1: effect of cultivar, cultivation system, and storage conditions. *J Agric Food Chem*. 2009.
 41. Wagner A, Szwed A, Buczyłko K, Wagner W. Allergy to apple cultivars among patients with birch pollinosis and oral allergy syndrome. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2016.
 42. Cudowska B, Kaczmarek M, Restani P. Immunoblotting in the diagnosis of cross-reactivity in children allergic to birch. *Rocz Akad Med w Białymstoku*. 2005.
 43. Carnés J, Ferrer A, Fernández-Caldas E. Allergenicity of 10 different apple varieties. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2006.
 44. Vlieg-Boerstra BJ, Van De Weg WE, Van Der Heide S, Dubois AEJ. Where to prick the apple for skin testing? *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2013.
 45. Kiewning D, Schmitz-Eiberger M. Effects of long-term storage on Mal d 1 content of four apple cultivars with initial low Mal d 1 content. *J Sci Food Agric*. 2014.
 46. Kootstra HS, Vlieg-Boerstra BJ, Dubois AEJ. Assessment of the reduced allergenic properties of the Santana apple. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2007.
 47. Sancho AI, Foxall R, Browne T, et al. Effect of postharvest storage on the expression of the apple allergen Mal d 1. *J Agric Food Chem*. 2006.
 48. Son DY, Scheurer S, Hoffmann A, Hausteiner D, Vieths S. Pollen-related food allergy: cloning and immunological analysis of isoforms and mutants of Mal d 1, the major apple allergen, and Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Eur J Nutr*. 1999.
 49. Romer E, Chebib S, Bergmann KC, et al. Tiered approach for the identification of Mal d 1 reduced, well tolerated apple genotypes. *Sci Rep*. 2020.
 50. Asero R, Marzban G, Martinelli A, Zaccarini M, Laimer Da Câmara Machado M. Search for low allergenic apple cultivars for birch pollen-allergic patients: is there a correlation between in vitro assays and patient response? *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2006.
 51. Schenk MF, Van Der Maas MP, Smulders MJM, et al. Consumer attitudes towards hypoallergenic apples that alleviate mild apple allergy. *Food Qual Prefer*. 2011.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
52. Takács K, Szamos J, Szabó EE, Szabó Z, Nyéki J, Gelencsér É. Apple allergens as affected by cultivation technolog and variental factors. *Int J Horti Sci*. 2010.
53. Savazzini F, Ricci G, Tartarini S. Apple allergens genomics and biotechnology: unravelling the determinants of apple allergenicity. *Appl Plant Genomics Biotechnol*. 2015.
54. Barden JA, Marini RP. Incidence of diseases on fruit of nine apple genotypes as influenced by six fungicide treatments. *Fruit Var J*. 1998.
55. Vlieg-Boerstra BJ, Van De Weg WE, Van Der Heide S, et al. Identification of low allergenic apple cultivars using skin prick tests and oral food challenges. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2011.
56. Matthes A, Schmitz-Eiberger M. Polyphenol content and antioxidant capacity of apple fruit: effect of cultivar and storage conditions. *J Appl Bot Food Qual*. 2009.
57. Nothegger B, Reider N, Covaciu CE, et al. Allergen-specific immunotherapy with apples: selected cultivars could be a promising tool for birch pollen allergy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020.

How to cite this article: Siekierzyńska A, Piasecka-Kwiatkowska D, Myszka A, Burzynska M, Sozanska B, Sozanski T. Apple allergy: Causes and factors influencing fruits allergenic properties—Review. *Clin Transl Allergy*. 2021;1–8. <https://doi.org/10.1002/ctt2.12032>

54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106

[My Articles](#)

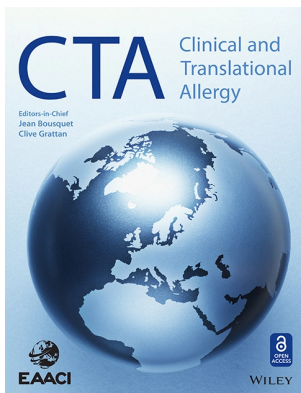
[Communication History](#)

[Order History](#)

[My Author Profile](#)

[← Back to Dashboard](#)

Manage this article



Clinical and Translational Allergy

Apple allergy: causes and factors influencing fruits allergenic properties

DOI: 10.1002/ctt2.12032

Status: In Production

Grow the impact of your research

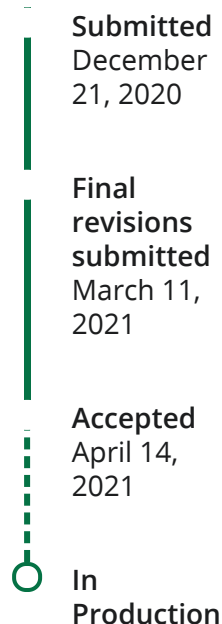


Extend your reach with a Video Abstract

Turn your findings into engaging and accessible overviews, perfect for sharing on web sites and social media.

[Learn more](#)

Publication History



[Help](#)



Article

Molecular and Immunological Identification of Low Allergenic Fruits among Old and New Apple Varieties

Aleksandra Siekierzynska ^{1,*}, Dorota Piasecka-Kwiatkowska ², Wojciech Litwinczuk ¹, Marta Burzynska ², Aleksander Myszkowski ³, Pawel Karpinski ^{4,5}, Elzbieta Zygala ⁶, Narcyz Piorecki ^{6,7}, Ewa Springer ⁸ and Tomasz Sozanski ⁹

- ¹ Department of Physiology and Plant Biotechnology, Institute of Agricultural Sciences, Land Management and Environmental Protection, University of Rzeszow, Cwiklinskiej 2, 35-601 Rzeszow, Poland; wlitw@ur.edu.pl
- ² Department of Food Biochemistry and Analysis, Poznan University of Life Sciences, Mazowiecka 48, 60-623 Poznan, Poland; dorota.piasecka-kwiatkowska@up.poznan.pl (D.P.-K.); marta.burzynska@up.poznan.pl (M.B.)
- ³ Institute of Medical Sciences, University of Rzeszow, Rejtana 16 c, 35-959 Rzeszow, Poland; amyszka@ur.edu.pl
- ⁴ Department of Genetics, Wroclaw Medical University, Marcinkowskiego 1, 50-368 Wroclaw, Poland; polemiraza@poczta.fm
- ⁵ Laboratory of Genomics & Bioinformatics, Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, 53-114 Wroclaw, Poland
- ⁶ Arboretum and Department of Physiography in Bolestraszyce, 37-700 Przemysl, Poland; e.zygala@wp.pl (E.Z.); arboretum@poczta.onet.pl or npiorecki@ur.edu.pl (N.P.)
- ⁷ Department of Human Sciences, Institute of Physical Culture Sciences, University of Rzeszow, Towarnickiego 3, 35-959 Rzeszow, Poland
- ⁸ Center for Allergy Diagnostics and Treatment SNZOZ Alergologia Plus, 60-693 Poznan, Poland; alergologiaplus@wp.pl
- ⁹ Department of Pharmacology, Wroclaw Medical University, Jana Mikulicza-Radeckiego 2, 50-345 Wroclaw, Poland; tsoz@wp.pl
- * Correspondence: ola_sk@wp.pl; Tel.: +48-17-785-4385



Citation: Siekierzynska, A.; Piasecka-Kwiatkowska, D.; Litwinczuk, W.; Burzynska, M.; Myszkowski, A.; Karpinski, P.; Zygala, E.; Piorecki, N.; Springer, E.; Sozanski, T. Molecular and Immunological Identification of Low Allergenic Fruits among Old and New Apple Varieties. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3527. <https://doi.org/10.3390/ijms22073527>

Academic Editor: Daniel P. Potaczek

Received: 28 February 2021

Accepted: 23 March 2021

Published: 29 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: About 50–70% of patients allergic to birch pollen suffer from sensitization after apple ingestion. Apple allergenicity was established in only few varieties. Studies were performed on apple fruits of 21 traditional and nine modern varieties organically, intensively, or integratively produced. The aim of the study was to assess whether the factors like cultivation method, maturity stage, genotype, or type of tissue place an impact on the allergenic potential of apples. To answer these questions, we used semiquantitative real-time PCR, ELISA, and immunoblotting. Apple allergen genes present divergent expression across apple cultivars. Expression of the *Mal d 1.06A* correlates with the Mal d 1 level and is affected by the cultivation method and maturity of the fruit. The content of the main allergen Mal d 1 varied widely across cultivars. Interestingly, in our study, the Gala variety presented a low Mal d 1 concentration regardless of the cultivation method. Based on the *Mal d 1.06A* expression, the Mal d 1 protein content, and the immunoreactivity assay, the Kandil Sinap, Kosztela, Rumianka from Alma-Ata, Kantówka Gdańska, Reinette Coulon, and Gala cultivars emerged as potentially hypoallergenic apple cultivars. Our study allowed distinguishing between potentially low, medium, and highly allergenic varieties.

Keywords: apple allergy; Mal d 1; gene expression; immunoreactivity; old apple varieties; hypoallergenic

1. Introduction

About 5–8% of children and 2–3% of adults suffer from a food allergy [1]. In Northern and Central Europe, sensitization to apples is associated with the cross-reactive birch pollen aeroallergen due to the structural homology of allergenic proteins. About 50–70% of pollen-sensitized patients suffer from oral allergy syndrome (OAS) after fresh apple ingestion [2].

So far, in apples (*Malus domestica* Borkh.), four clinically relevant allergens have been identified: Mal d 1, Mal d 2, Mal d 3, and Mal d 4 [3]. In Northern Europe, Mal d 1 is the major allergen that causes allergic reactions to fruit. Mal d 1 is very similar to the main birch pollen allergen Bet v 1 and has similar epitopes for IgE antibodies, resulting in cross-reactions [4].

Two other proteins, Mal d 2 and Mal d 4 of less clinical importance, are also associated with hyperreactivity to apples. In Mediterranean countries, allergic reactions are mainly caused by the Mal d 3 protein [5–7].

The content of allergens and/or the expression of genes encoding the main apple fruit allergenic proteins has been characterized in only few varieties. Currently, only cv. Santana, cv. Elise, and cv. Topaz are considered to be less allergenic and well-tolerated by allergic patients [8–10]. The previous findings showed a relationship between the risk of allergic reaction with the variant (genotype), degree of maturity and storage behavior, mainly concerning the *Mal d 1* gene expression or the protein level. These analyses were carried out only on the Golden Delicious, Granny Smith, Fuji, Santana, Cox's Orange Pippin, Topaz, and Braeburn cultivars [7]. There is an interesting question of whether other apple tree cultivars, traditional/old and new ones (bred before and after the "Green Revolution", respectively), can have a low allergic potential. The issue of the expression of genes encoding all four main allergens in apples is poorly understood. There is also insufficient information about the influence of the cultivation method, maturity degree, and storage time, and only in the abovementioned apple cultivars.

The present study aimed to assess the level of the expression of genes encoding four main apple allergens and also the level of the Mal d 1 protein in 21 traditional/old and nine modern/new apple fruit varieties. We hypothesized that the factors like cultivation method, maturity stage, genotype, or type of tissue place an impact on allergenicity. To answer these questions, we used semiquantitative real-time PCR, ELISA, and immunoblotting techniques.

2. Results

The Results section shows the average expression of the analyzed genes, the content of the Mal d 1 protein, and the results of a serum immunoreactivity assay. The supplementary data show the gene expression in individual cultivars. Clustering analysis is presented in the Discussion.

2.1. Mal d 1

We investigated the expression of two isoforms of the *Mal d 1* gene (*Mal d 1.06A* and *Mal d 1.01*) and Mal d 1 protein concentration in all of the analyzed cultivars (Tables 1 and 2, Figures S1–S4).

Table 1. Mean expression of genes encoding four main apple allergens in arbitrary units (AU).

Tissue	Gene	Old Cultivars		New Cultivars		
		Organic	All New	Organic	Intensive	Integrated
Flesh	<i>Mal d 1.06A</i>	3.43	2.90	2.74	3.04	2.99
	<i>Mal d 1.01</i>	3.61	3.37	3.44 (g)	3.38	2.95 (g)
	<i>Mal d 2.01</i>	4.12 (b,d,p)	3.69 (d)	3.35 (a,b,c)	4.01 (c)	3.66 (a)
	<i>Mal d 3.01</i>	3.05 (e)	2.88	3.13	2.77	2.61
	<i>Mal d 4.01</i>	3.30	3.23	3.29	3.2	2.96
Skin	<i>Mal d 1.06A</i>	3.90 (h)	3.33	3.40	3.51	2.93
	<i>Mal d 1.01</i>	4.32 (h)	3.78	3.91	4.01	2.9
	<i>Mal d 2.01</i>	3.56 (p)	3.31	3.05	3.67	2.96
	<i>Mal d 3.01</i>	4.97 (e)	4.54	4.94	4.96	3.02
	<i>Mal d 4.01</i>	2.81	2.89	2.85	2.93	2.78
Average	<i>Mal d 1.06A</i>	3.67 (f,l)	3.12 (l)	3.07	3.28	2.96
	<i>Mal d 1.01</i>	3.97 (f,n)	3.57 (n)	3.68 (m)	3.70	2.93 (m)
	<i>Mal d 2.01</i>	3.84 (j,k)	3.50 (j)	3.20 (i,k)	3.84 (i)	3.31
	<i>Mal d 3.01</i>	3.99	3.71	4.04 (r)	3.86 (r)	2.81 (r)
	<i>Mal d 4.01</i>	3.05	3.06	3.07	3.10	2.87

a–n,p,r—the same letter indicates groups whose means differ significantly at $p < 0.05$.

Table 2. Mal d 1 protein content in apple flesh.

	Apple Cultivars	Mal d 1 Content (µg/g FW ¹)
Old organic farming	Kantówka Gdańska	0.3
	Kosztela	0.6
	Antonovka Usual	1.8
	Sztetyna	1.9
	Rumianka from Alma-Ata	2
	Reinette Coulon	2.5
	Żeleźniak	3.5
	Kandil Sinap	4.6
	Bukówka	7.3
	Emperor Alexander Apple	7.6
	Jonathan	7.7
	Antonovka One and a Half Pound	7.7
	Grochówka	8.2
	Oberland Raspberry Apple	10
	Winter Banana	12.9
	Jakub Lebel	17.5
	Gloria Mundi	20.9
	Gray French Reinette	23.5
	Reinette de Canada	28.8
Berner Rose	37.7	
	Median	7.65
New organic farming	Gala	1.3
	Golden Delicious	1.8
	Jonagored	5.8
	Idared	6
	Santana	8.5
	Trinity I (x Gold Millennium)	12.7
	Gold Millennium	13.2
Trinity II (x Ligol)	15	
	Median	7.25
New intensive farming	Gold Millennium	2.3
	Gala	2.4
	Idared	2.4
	Golden Delicious	5.8
	Jonagored	9.5
	Trinity	13.6
	Median	4.1
	Median in new	5.9

¹ FW—fresh weight.

2.2. *Mal d 1.06A*

We observed that the gene expression of *Mal d 1.06A* is higher in old apple cultivars than in new ones ($p = 0.000143$). The expression of *Mal d 1.06A* was higher in the skin than in the flesh in old varieties ($p = 0.053$). The cultivation method did not influence the expression. In cv. Golden Delicious, cv. Idared, cv. Jonagored, cv. Gold Millennium, and cv. Gala, the expression of *Mal d 1.06A* positively correlated with the fruit maturity (Pearson's r coeff. = 0.52, $p = 0.038$, Table 3). The expression of *Mal d 1.06A* positively correlated with the immunoreactivity of patients' sera (Table 4).

Table 3. Correlation between the mean expression and fruit maturity.

	<i>Mal d 1.06A</i>	<i>Mal d 1.01</i>	<i>Mal d 2.01</i>	<i>Mal d 3.01</i>	<i>Mal d 4.01</i>
Pearson's r	0.5211	0.6129	0.3461	0.4012	0.6175
p -value	0.038	0.012	0.189	0.123	0.011

Table 4. Correlation between immunoreactivity of patients' sera, *Mal d 1.06A* expression, and Mal d 1 content.

		Mal d1 ($\mu\text{g/g FW}^1$)	Serum 1	Serum 2	Serum 3	Serum 4
Expression of <i>Mal d 1.06A</i>	Pearson's r coeff.	0.38	0.4	0.34	0.4	0.37
	p -value	0.036	0.027	ns	0.028	0.046
Mal d1 ($\mu\text{g/g FW}$)	Pearson's r coeff.	-	0.24	0.25	0.22	0.39
	p -value	-	ns	ns	ns	0.031

¹ FW—fresh weight; ns—not significant.

2.3. *Mal d 1.01*

We observed that the gene expression of *Mal d 1.01* significantly differs between old and new apple cultivars ($p = 0.013$). The level of the *Mal d 1.01* transcript was higher in organically farmed apples than in the apples cultivated using the integrated method ($p = 0.01$) (Figure S4). The expression of *Mal d 1.01* was higher in the skin than in the flesh in old varieties ($p = 0.00001$). Our study revealed that in cv. Golden Delicious, cv. Idared, cv. Jonagored, cv. Gold Millennium, and cv. Gala, the expression of *Mal d 1.01* positively correlated with the fruit maturity (Pearson's r coeff. = 0.61, $p = 0.012$, Table 3). We observed a positive correlation of the *Mal d 1.01* expression with immunoreactivity (Pearson's r coeff. = 0.3851, $p = 0.036$).

2.4. *Mal d 1.06A* vs. *Mal d 1.01*

Among old varieties, the level of *Mal d 1.06A* expression was lower than of *Mal d 1.01* in the average expression and in the skin ($p = 0.008$ and $p = 0.018$, respectively) (Table 1).

2.5. *Mal d 1 Protein*

The content of the Mal d 1 protein was assessed in the apple flesh among old organic, new organic, and new-intensively cultivated apple trees (Table 2). Differences in medians between the analyzed groups were not statistically significant. We revealed that *Mal d 1.06A* expression correlates with the Mal d 1 protein content (Pearson's r coefficient = 0.38, $p = 0.036$) (Table 3). Nonetheless, *Mal d 1.01* expression did not correlate with the main allergen content. We observed a positive correlation between the Mal d 1 content and immunoreactivity ($r = 0.37$, $p = 0.04$) (Table 4).

2.6. *Mal d 2.01*

The average expression in the group of old varieties differs significantly from all new and organic new cultivars ($p = 0.043$ and $p = 0.025$, respectively) (Table 1, Figure S5). The method of cultivation influences the *Mal d 2.01* gene expression ($p < 0.04$). The organic

method, contrary to the intensive method, decreased the level of average expression and expression in the flesh ($p < 0.05$) (Table 1, Figure S6).

The expression of *Mal d 2.01* did not correlate with fruit maturity and immunoreactivity of patients' sera.

2.7. *Mal d 3.01*

Old and new cultivars did not differ with regard to the *Mal d 3.01* transcript level. Across cultivars, we found that apple skin contains about two times more *Mal d 3.01* transcripts than the flesh ($p < 0.05$). Among old cultivars, only in cv. Oberland Raspberry Apple, cv. Kandil Sinap, and cv. Grochówka, the gene expression was raised in the flesh as much as in the skin (Figure S7). The organic and intensive methods, contrary to the integrated method, significantly enhance the expression in the skin ($p < 0.05$) (Figure S8). There was no correlation between expression, maturity status, and immunoreactivity of patients' sera.

2.8. *Mal d 4.01*

New cultivars are characterized by the similar expression level both in the skin and flesh (Pearson's r coeff. = 0.71, $p < 0.01$) (Figures S9 and S10). The method of cultivation did not influence the *Mal d 4.1* expression. The maturity level positively correlated with the expression of *Mal d 4.01* ($r = 0.62$, $p = 0.011$). There was no correlation with immunoreactivity.

2.9. Hierarchical Classification on Principal Components (HCPC)

The gene expression data (assessed in the fruit flesh) were integrated by means of principal component analysis to give an overview how the different cultivars behave in terms of all of the measured parameters. The first two components explained 55.6% of the total variance. The first principal component was able to explain 32.6% of the total variance observed in the analysis. The second component explained 23% of the total variance and led us to distinguish cultivar groups of low (in green), medium (in red), and high expression (in blue). Most of the old varieties display higher variability than the new ones (Figure 1).



Figure 1. Hierarchical classification on principal components (HCPC) based on the gene expression of *Mal d 1.01*, *Mal d 1.06A*, *Mal d 2.01*, *Mal d 3.01*, and *Mal d 4.01*, in the flesh. Sample names are listed in Table 5.

Table 5. Characteristics of apple fruit samples used in the study.

Type of Varieties	Sample Name	Cultivar Name	Cultivation Method	Sample Origin
Old	X_15	Rumianka from Alma-Ata	organic	Bolestraszyce
	X_17	Sztetyna	organic	Bolestraszyce
	X_19	Gloria Mundi	organic	Bolestraszyce
	X_21	Kosztela	organic	Bolestraszyce
	X_23	Reinette Coulon	organic	Bolestraszyce
	X_25	Emperor Alexander Apple	organic	Bolestraszyce
	X_27	Kantówka Gdańska (Danzinger Kantapfel)	organic	Bolestraszyce
	X_29	Żeleźniak (Rother Eiserapfel)	organic	Bolestraszyce
	X_31	Jonathan	organic	Bolestraszyce
	X_33	Reinette de Canada	organic	Bolestraszyce
	X_35	Oberland Raspberry Apple (Callville d'Automne Raye)	organic	Bolestraszyce
	X_37	Bukówka	organic	Bolestraszyce
	X_39	Jakub Lebel	organic	Bolestraszyce
	X_41	Winter Banana	organic	Bolestraszyce
	X_43	Kandil Sinap	organic	Bolestraszyce
	X_45	Parker's Pippin	organic	Bolestraszyce
	X_47	Gray French Reinette	organic	Bolestraszyce
	X_51	Grochówka (Grosser Bohnapfel)	organic	Bolestraszyce
	X_53	Berner Rose	organic	Bolestraszyce
	X_103	Antonovka Usual	organic	Bolestraszyce
X_105	Antonovka One and a Half Pound	organic	Bolestraszyce	
Modern	X_80B	Jonagored	organic	Wojciechow
	X_81B	Jonagored	intensive	Wojciechow
	X_82A	Gold Millennium	organic	Wojciechow
	X_83A	Gold Millennium	intensive	Wojciechow
	X_84B	Gala	organic	Wojciechow
	X_85A	Gala	intensive	Wojciechow
	X_86A	Idared	organic	Wojciechow
	X_87A	Idared	intensive	Wojciechow
	X_88A	Golden Delicious	organic	Wojciechow
	X_89A	Golden Delicious	intensive	Wojciechow
	X_91A	Trinity	intensive	Wojciechow
	X_93A	Trinity I (× Gold Millennium)	organic	Wojciechow
	X_94A	Trinity II (× Ligol)	organic	Wojciechow
	X_96A	Idared	integrated	Brzezna
	X_97A	Gala	integrated	Brzezna
	X_99A	Golden Delicious	integrated	Brzezna
	X_108	Golden Delicious 2	organic	Wojciechow
	X_109	Golden Delicious 2	intensive	Wojciechow
	X_110	Idared 2	intensive	Wojciechow
	X_111A	Idared 2	organic	Wojciechow
X_112A	Santana	organic	Bielsko-Biała	
X_113B	Golden Delicious 2	integrated	Brzezna	

3. Discussion

Our goal was to determine if apple allergenicity relies on factors like genotype, tissue type, cultivation method, maturity stage, and patients' sera immunoreactivity. We showed that some of the old cultivars like Kandil Sinap, Ruminaka from Alma-Ata, Kantówka Gdańska, and Reinette Coulon, and new ones (Gala) can be hypoallergenic. By involving gene expression analysis, we could show that divergent isoforms of the *Mal d 1* gene could have a different impact on apple allergenicity.

Patients sensitized to apples report the severity of their symptoms depends on the variety and fruit maturity [11]. *Mal d 1* is heat-labile and susceptible to digestion and symptoms are mainly connected with OAS, rarely with the gastrointestinal tract. Variability in the allergic potency might result from the different expression level of the *Mal d* isoforms.

In our study, we determined the factors affecting the expression of genes encoding four main apple allergens.

Mal d 1 presents divergent expression across apple cultivars. The expression of *Mal d 1.06A* and *Mal d 1.01* was lower in apple flesh contrary to apple skin, similarly to the study of Pagliarani et al. [12]. Furthermore, Schmitz–Eibereger et al. revealed a higher content of the main apple allergen Mal d 1 in the skin than in the flesh [13]. Elevated expression in the skin can be due to the protein function connected with fungal and bacterial infection response [14]. We indicated that the expression of *Mal d 1.06A*, contrary to *Mal d 1.01*, correlates with the Mal d 1 protein level (Pearson's r coeff. = 0.38, p = 0.036) (Table 1); this indication is consistent with the results of other authors [5,7]. Moreover, we observed that *Mal d 1.01* expression was higher than of *Mal d 1.06A*, similar to the findings of Yang et al. [15].

According to our research, the cultivation method significantly influences the expression of *Mal d 1.01*. This is the first report revealing that organically and intensively farmed apples have a significantly elevated expression of *Mal d 1.01* compared to the integratively farmed ones (Table 1). It suggests that the *Mal d 1.01* isoform can be involved in response to the anti-pathogenic reaction and pesticide treatment as well. This hypothesis is consistent with the findings of Matthes and Schmitz–Eiberger et al. [9] who showed that pesticide treatment lead to an even more robust response than any biotic factors. What is more, Beuning [16] showed an elevated level of PR (pathogenesis-related proteins, including Mal d 1) during ripening, disease infection, and in response to environmental factors.

We observed that *Mal d 1.06A* is significantly correlated with immunoreactivity of patients' sera, opposite to *Mal d 1.01*; this suggests that the *Mal d 1.06A* isoform has a major impact on apple allergenicity.

Our study also revealed the expression of *Mal d 1.06A* and *Mal d 1.01* positively correlates with fruit maturity (Pearson's r coeff. = 0.52, p = 0.038; Pearson's r coeff. = 0.61, p = 0.012, respectively, Table 3); this is consistent with the findings of Schmitz-Eiberger and Matthes [13].

Molecular studies of another apple allergen Mal d 2 are very few up to date. In our study, old apple cultivars had a higher transcription level of the *Mal d 2.01* isoform than new cultivars (p = 0.043). The method of cultivation influences the *Mal d 2.01* gene expression, e.g., the organic method decreased the transcript level in the flesh (p < 0.05). These findings indicate that genotype and farming method have an impact on the *Mal d 2.01* expression. Differences in the expression can be connected with the plant–pathogen reaction due to the Mal d 2 protein belonging to class PR-5. Gau et al. [17] showed that a high protein content of Mal d 2 was detected in scab-resistant cultivar Remo, suggesting a protective role against pathogens. Moreover, in a susceptible cultivar Elstar, after inoculation of pathogens, the concentration of the Mal d 2 protein increased [17].

Hsieh et al. [18] identified Mal d 2 as an in vitro reactive allergen among 75% of apple allergic patients in the USA; in turn, we did not observe the correlation of the gene expression with immunoreactivity, which may result from different etiology of sensitization to Mal d 1 and Mal d 2.

We established that the cultivation method affected the *Mal d 3.01* gene expression in the skin, but not in the flesh, in the group of new apple cultivars. Those findings are consistent with the Borges group [19], who proved the stable level of the *Mal d 3.01* gene in the flesh and the accumulation of the transcript in the skin. The biological role of the protein is participation in the cutin synthesis, and it can be accumulated in the epidermal layer of a plant [20]. This could explain why the expression of the *Mal d 3.01* gene isoform in the skin was elevated compared to apple flesh. Taking into account environmental factors affecting the expression of PR proteins, Gau et al. [17] showed that Mal d 3 is down-regulated during the pathogen infection. In turn, we observed the enhanced expression in the apple skin in organic and intensive methods (Table 1).

Mal d 3 allergen mostly sensitizes patients with a previous allergy to peaches, mainly in the Mediterranean. Unlike the allergy to Mal d 1, the symptoms whereof are pre-

dominantly limited to OAS, sensitization to Mal d 3 has serious, even life-threatening consequences. Mal d 3 is one of the non-specific lipid transfer proteins resistant to temperature or digestive enzymes, which is believed to be the factor causing reactions from mild to severe after ingestion [5]. It is worth noting that Fernandez–Rivas et al. [21] found that birch pollen sensitization was associated with 3.5-times decreased risk of Mal d 3 sensitization, whereas the allergy to mugwort and plane trees increased this risk 2.3–2.8-fold, respectively. The results of our study showed that *Mal d 3* expression does not correlate with immunoreactivity of sera of the patients sensitized to birch pollen, which is consistent with the above findings.

The last of the main analyzed allergens in apples was Mal d 4, profilin. We observed a stable expression level across the analyzed cultivars with a similar level in the flesh and skin, which might be a consequence of the Mal d 4's biological function. Profilins are probably involved in signal transduction cascades and cytoskeleton organization, covering essential cellular functions [22], with a constitutive expression similar to actin [15]. We assumed the positive correlation of *Mal d 4.01* expression with fruit maturity (Pearson's r 's coefficient = 0.62, $p = 0.011$); however, in case of prolonged storage, the Mal d 4 gene expression can be downregulated as shown by Botton et al. [7]. Mal d 4 causes rather mild symptoms in allergic patients, mostly OAS [23]. Profilins are quite sensitive to heat denaturation and gastric digestion, and thus food allergies caused by profilin are usually confined to the oral allergy syndrome elicited by fresh apple consumption. Sensitization to Mal d 4 occurs in Northern and Central Europe, similar to Mal d 1. Nevertheless, in the SAFE study, the prevalence of IgE specific to profilin was higher in Southern Europe patients than in the Central and Northern Europe patients [24]. Moreover, sera from patients with pollen allergy sensitized to profilin commonly show IgE cross-reactivity to fruits and vegetables. In the birch–Rosaceae fruit and the birch–mugwort–celery–spice cross-reactivity, profilin can play the role of the sensitizing agent [24]. However, in our studies, *Mal d 4.01* expression did not correlate with immunoreactivity of birch pollen-sensitized patients' sera, what could stem from different sensitizing factor.

Assessing the simultaneous expression of four main allergen genes across all the studied cultivars, we used hierarchical classification on principal components (HCPC) and we revealed three clusters, the cluster in green covering low-expressed, the cluster in blue covering highly expressed, and the cluster in red covering medium-expressed apple allergen genes (Figure 1). We noticed that most of the old varieties display higher variability in gene expression than the new ones. What is more, the Mal d 1 protein content also varied widely across cultivars (from 0.3 up to 37.7 $\mu\text{g/g}$ FW), showing a wide range of biodiversity (coefficient of variation—99.6% and 68.6% in old and new varieties, respectively). The large variation in respect to the content of Mal d 1 in the old varieties compared to the new ones indicates old varieties as a rich source of potentially low allergenic apples (Table 2).

Marzban et al. [25] classified apple cultivars as potentially low allergenic according to the Mal d 1 protein content, setting the threshold of allergenicity at 5 $\mu\text{g/g}$. In our study, we applied unsupervised integrative clustering (UIC) (Figure 2) taking into consideration not only the Mal d 1 content, but also the expression of *Mal d 1.06A* and the immunoreactivity datasets. We obtained three groups, potentially low (the right side of the chart), medium and highly allergenic cultivars (the left side of the chart) (Figure 2). Based on clustering (UIC) and the Marzban [25] criteria, we selected the following cultivars as potentially hypoallergenic: Kandil Sinap, Kosztela, Rumianka from Alma-Ata, Kantówka Gdańska, Reinette Coulon, and Gala (a new one).

In the present report, we assumed cv. Gala can be considered low allergenic for patients with Mal d 1 sensitization due to the low level of the Mal d 1 protein and encoded gene expression; even the immunoreactivity of all the patients' sera with the fruit extract was low regardless of the apple fruit production method. Moreover, this genotype is easily accessible to consumers because of its popularity as a very good dessert variety.

According to Vlieg–Boerstra et al. [26], the prick-to-prick and skin prick test are not effective to determine the allergenicity of apple cultivars; therefore, we applied protein

slot blotting with an immunoassay as a more reliable approach to assess fruit allergenicity. In the further study, we are going to extend the immunoreactivity analysis using sera of individuals sensitized not only to birch pollen and/or apples, but also to peaches.

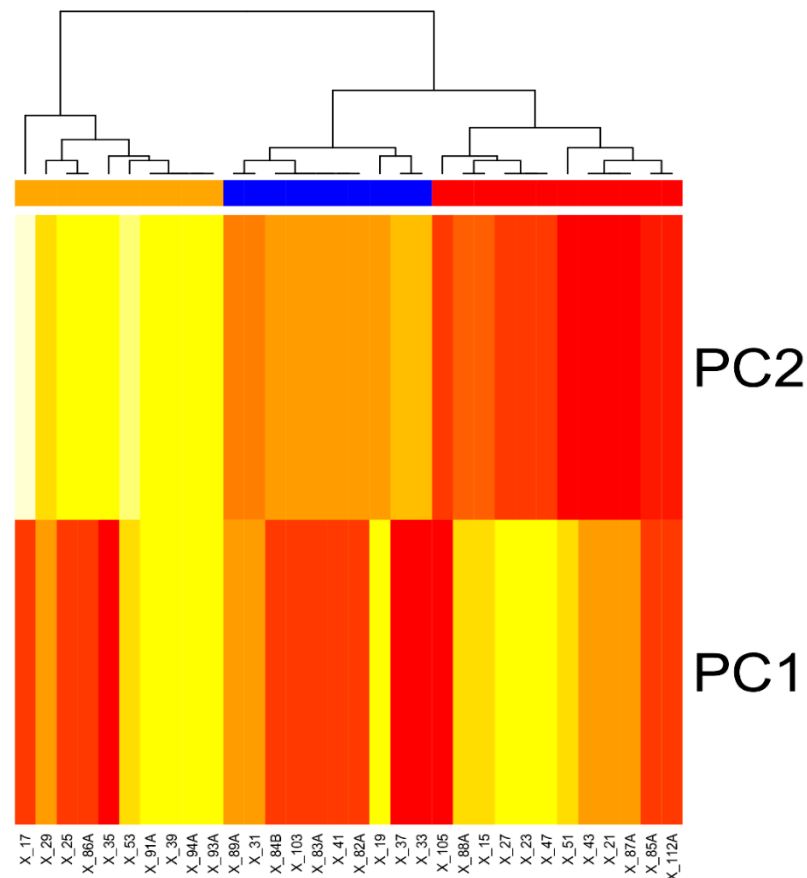


Figure 2. Unsupervised integrative clustering (UIC) based on the expression of *Mal d 1.06A*, *Mal d 1* protein concentration, and immunoreactivity of patients' sera with apple extracts. Sample names are listed in Table 5.

The limitation of our study was the use of indigenous varieties that are not well-known, growing in small orchards or gene banks; however, old varieties could be an important source of low allergenic apples, as we have shown thereby.

To sum up, our approach to the issue of apple allergenicity made it possible to detect potentially low, medium and highly allergenic varieties. Up to date, only Topaz, Elise, and Santana varieties are considered to be well-tolerated by apple allergic patients [26,27]. Thanks to our study, we can expand the list by five old and one new cultivar that emerged as potentially hypoallergenic apples for patients sensitized to birch pollen exhibiting apple allergy. Our research showed that old varieties are a rich source of potentially hypoallergenic varieties.

This report extends the knowledge on the regulation of gene expression of apple allergens under the influence of genotype, farming method, or maturity of fruits, which may be useful in assessing the risk of allergic reaction occurrence after apple ingestion. We provide basis to consider the *Mal d 1.06A* isoform as more important in the determination of apple allergenicity than *Mal d 1.01*. The knowledge of the molecular mechanism of apple allergenicity and factors that modify reaction severity could facilitate medical counselling and improve care of patients with food allergies.

4. Materials and Methods

4.1. Plant Material

Apple fruits of 21 old apple cultivars (*Malus x domestica* Borkh.) (before the Green Revolution) organically farmed were collected from the Arboretum and Institute of Physiology in Bolestraszyce, Poland (Table 1). Eight modern apple cultivars, organically and intensively grown, were collected from “BioGrim” company, Wojciechow, Poland. Three apple cultivars were collected from trees farmed integratively at the Institute of Horticulture in Brzezna, Poland. Fruits of the Santana cultivar (*Malus x domestica* Borkh. cv. Santana) were collected from a private orchard located near Bielsko-Biała, Poland. Apple skin and flesh of apple fruits were collected separately and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. RNA purification followed sample lyophilization.

4.2. Human Samples

The four patients participating in the study were tested using the skin prick test and diagnosed with an allergy to birch pollen and other tree pollens. All participants provided informed consent for participation in this research program, which was approved by the Ethics Committee of Poznan University of Medical Sciences, Poland, document number 178/19.

4.3. RNA Extraction

RNA extraction was performed according to the method used by Reid et al. [28] with some modifications. The tissue was ground in a prechilled mortar to a fine powder and then added to a prewarmed ($65\text{ }^{\circ}\text{C}$) extraction buffer at a proportion of 0.15 g of tissue per 7.5 mL and shaken vigorously. The RNA extraction buffer contained 2% CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 2 M NaCl, 300 mM Tris-HCl (pH = 8.0) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 0.25 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 0.05% spermidine (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 1% polyvinylpyrrolidone (PVP) K-30 (soluble) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), and 2% β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) added directly before use. The tubes were incubated in a water bath at $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10–15 min and shaken for 10–15 s every 3 min. Subsequently, tubes were left to cool down to room temperature and equal volumes of chloroform/isoamyl alcohol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) (24:1) were added to samples, centrifuged at $3500\times g$ for 20 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The aqueous layer was transferred to a new tube and centrifuged at $30,000\times g$ for 15 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ to remove any insoluble particles in the solution. For nucleic acid precipitation, 0.1 vol 3 M NaOAc (pH = 5.2 ± 0.2) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and 0.6 vol isopropanol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) was added, mixed, and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 min. The samples were centrifuged at $3500\times g$ for 30 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ to collect the nucleic acid pellet. The supernatant was discarded and the pellet was dissolved in 1 mL TE (Tris(hydroxymethyl)aminomethane and ethylenediaminetetraacetic acid; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) buffer (pH 7.5) and transferred to a new 2 mL microcentrifuge tube. Messenger RNA was selectively precipitated by adding 0.3 vol 8 M LiCl (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and stored for 25 h at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, then centrifuged at $20,000\times g$ for 30 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The messenger RNA pellet was then washed by adding 700 μL 70% ice-cold ethanol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and air-dried. The pellet was dissolved in 70–100 μL DEPC (Diethyl pyrocarbonate; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) water.

Quantity and quality of total mRNA were determined spectrophotometrically (Nanodrop Technologies LLC, Wilmington, DE, USA) by measuring OD_{260/230} and OD_{260/280}. RNA integrity was assessed by inspection after agarose gel electrophoresis in the presence of SybrGreen Safe Stain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Only mRNA samples meeting criteria $260/2880 > 1.9$ and $260/280 \geq 2.0$ were taken to cDNA synthesis.

4.4. cDNA Synthesis

Reverse transcription was performed with a TransScriba Kit (A&A Biotechnology, Gdansk, Poland) according to the manufacturer's instructions using oligo(dT) primers and 250 ng total mRNA. Controls with no transcriptase were used to assess the potential contamination of genomic DNA. The cDNA concentration was assessed spectrophotometrically (Nanodrop Technologies LLC, Wilmington, DE, USA).

4.5. Gene Expression

Gene expression was determined by real-time PCR using a thermal cycler (Lightcycler-96; Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA, USA). The oligonucleotide primer sequences used for real-time PCR (Table 6) were adopted from the literature [7,15,29,30]. The amplification efficiency was evaluated for every primer pair using regression and the slope according to the following equation: $10^{(-1/\text{slope})}$ [31]. Relative expression was normalized to the geometric mean of reference gene expression levels (actin and ubiquitin genes) and expressed as arbitrary units (AU).

Table 6. Real-time PCR primers sets.

Gene	Primers	Sequence (5'-3')	Access No.
<i>Mal d 1.01</i>	Md1-1.01F	AAGCTGAAATCCTTGAAGGAA	AJ417551
	Md1-1.01R	GTGCTCTTCCTTGATTTC AATG	
<i>Mal d 1.06A</i>	Mal d 1.06AF	TTGTTGCCAGATGGATGGTC	AY428580
	Mal d 1.06AR	TTGATGCTGACAATCTCATT	
<i>Mal d 2.01</i>	Mal d 2.01 F	GTGTGCCCGGCTCCACTT	AJ243427
	Mal d 2.01 R	TTCGAATCACCAAACGCAAG	
<i>Mal d 3.01</i>	Mal d3.01F	GTGACCAGCAGCCTTGCG	AF221502
	Mal d 3.01R	TTCAGGCAGTTGCAAGCAGT	
<i>Mal d 4.01</i>	Mal d 4.01F	GCTCTGGTGGCGTAACTGTG	AF129426
	Mal d 4.01R	CCTGGAGTCAAAGGCTCCTC	
<i>MdUBI</i>	UBI-F	TTGATCTTTGCTGGGAAACAG	CN491263
	UBI-R	CACCACCATCATTCAACACC	
<i>MdActin</i>	Actin-F	TGACCGAATGAGCAAGGAAATTACT	CN938023
	Actin-R	TACTCAGCTTTGGCAATCCACATC	

4.6. Extraction of Apple Proteins

Frozen apple flesh in the amount of 0.5 g was shaken with 5 mL of 10 mM PBS buffer (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), pH = 5.4, for 1 h at room temperature followed by centrifugation at 4 °C for 30 min at maximum speed. Every sample was extracted in duplicate.

For further analysis, 2 mL of a supernatant were taken and centrifuged at 15,000 rpm for 10 min, and then the supernatant was transferred to a new tube. Supernatants were stored at −80 °C until used in the following procedure.

4.7. Protein Slot Blotting

Blotting was performed using a Slot Blotter (Geneflow, Lichfield, England). In the procedure, 150 µL of the extracted protein solution were taken. Before blotting, a PVDF membrane (Merck, Darmstadt, Germany) (4.5 cm × 4.4 cm) was activated by immersion in methanol and soaked with a transfer buffer (12 mM Tris, 96 mM glycine, and 20% methanol) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) for 5 min. The activated membrane was placed between the tissue paper soaked with the transfer buffer beforehand in the apparatus. After immobilization of apple proteins, the membrane was incubated with the blocking solution containing 1% BSA (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in a TBS buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 500 mM NaCl) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) for 45 min with gentle shaking at room temperature. Blocking was followed by washing three times for 5 min in a TBS–Tween buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), pH 7.4.

For the immunoassay, human sera (containing IgE primary antibodies) were 10–100× diluted with a 1% BSA–TBS buffer. Membranes were then incubated with a diluted solution of sera for 45 min and washed five times with a TBS–Tween buffer. For immunodetection, 1:1000 diluted secondary polyclonal goat antihuman IgE antibody conjugated with alkaline phosphatase (Invitrogen) was used for 45 min. Incubation was followed by five washes with TBS–Tween, pH 7.4. Blots were then stained with 5 mg BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and 10 mg NBT (nitro-blue tetrazolium chloride; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) for 20 min. The reaction was stopped by washing with water. After staining, membranes were air-dried and photographed.

4.8. ELISA

Microtiter plates were activated with 200 µL carbonate/bicarbonate buffer, pH = 9.6, at 37 °C for 30 min. After activation, microtiter plates were coated with 100 µL of apple protein extracts at 37 °C for 120 min. As standards, rMal d1 (Mal d1.0108, Biomay, Wien, Austria) (1000 ng/mL–7.81 ng/mL) and rBet v1-A (Cusabio Technology LLC, Houston, TX, USA) (138 ng/mL–1.08 ng/mL) allergen proteins were used. Free binding sites were blocked with 1% BSA in a TBS buffer, pH = 7.4, for 45 min. Specific Bet v 1 rabbit IgG polyclonal antibody (100 µL; diluted 1:2000) was added and the plate was incubated at 37 °C for 90 min. Immunocomplexes of Mal d 1 and IgG were detected by monoclonal anti-rabbit IgG peroxidase antibody (1:400,000; SIGMA A1949; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and incubated at 37 °C for 60 min without mixing. Color reaction was developed after the addition of 200 µL o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and incubated for 30 min. The reaction was stopped by adding 50 µL 3M H₂SO₄ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). The absorbance was measured at 492 nm using a spectrophotometer.

4.9. Statistical Analysis

The data are expressed as the means or medians and were analyzed using the statistical program Statistica v.13 (StatSoft, Krakow, Poland). *P*-values < 0.05 were considered statistically significant. The homogeneity of variance for all the data was assumed using the Levene's test. The one-way analysis of variance (ANOVA) was used for assessing differences between groups. Differences between the average values of the old and new apple cultivars were analyzed using the unpaired *t*-test. For evaluating correlations, the Pearson's procedure (normally distributed data) was used, in which the *p*-value was considered to be statistically significant at < 0.05. Differences between groups of differentially cultivated apple trees were assessed using the Tukey's test.

Unsupervised, integrative clustering. The integration of gene expression (mRNA), immunoreactivity, and protein expression was performed using the R/Bioconductor package moCluster [32]. In brief, this method relies on multiblock multivariate analysis that defines a set of latent variables representing joint patterns across input datasets, which is further passed to a hierarchical clustering algorithm (Euclidean distance measurement and Ward linkage) in order to discover joint clusters. The decision on an optimal number of clusters was made based on the gap statistic [33].

Hierarchical classification on principal components (HCPC) using gene expression data using the FactoMineR R package was performed.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22073527/s1>, Figure S1. *Mal d 1.06A* expression in fruits of old and new varieties organically cultivated; Figure S2. *Mal d 1.06A* expression in fruits of the selected new cultivars differentially farmed; Figure S3. *Mal d 1.01* expression in fruits of old and new varieties organically cultivated; Figure S4. *Mal d 1.01* expression in fruits of the selected new cultivars differentially farmed; Figure S5. *Mal d 2.01* expression in fruits of old and new varieties organically cultivated; Figure S6. *Mal d 2.01* expression in fruits of the selected new cultivars differentially farmed; Figure S7. *Mal d 3.01* expression in fruits of old and new varieties organically cultivated; Figure S8. *Mal d 3.01* expression in fruits of the selected new cultivars differentially farmed; Figure S9. *Mal d 4.01*

expression in fruits of old and new varieties organically cultivated; Figure S10. *Mal d 4.01* expression in fruits of the selected new cultivars differentially farmed.

Author Contributions: Conceptualization, A.S.; methodology, A.S., D.P.-K.; software, P.K.; validation, A.S.; formal analysis, A.S.; investigation, A.S.; resources, W.L., M.B., E.Z., N.P., and E.S.; data curation, A.S.; writing—original draft preparation, A.S.; writing—review and editing, A.S., A.M., and T.S.; visualization, A.S., P.K.; supervision, D.P.-K., T.S.; project administration, A.S.; funding acquisition, A.S., T.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by the program of the Ministry of Science and Higher Education, “Regional Initiative of Excellence,” in the years 2019–2022, project number 026/RID/2018/19, the amount of financing PLN 9 542 500.00.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethics Committee of Poznan University of Medical Sciences, Poland (protocol number 178/19, approved on 7 February 2019).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all the subjects involved in the study. Written informed consent was obtained from the patient(s) to publish this paper.

Data Availability Statement: Supporting data are in the Supplementary Data section.

Acknowledgments: Authors thank Maria Buczek from the Institute of Horticulture in Brzezna, Poland, for the opportunity to collect apple fruits from the tree varieties cultivated integratively. We thank also Grzegorz Maryniowski from “BioGrim” company, Wojciechow, Poland, for providing apple fruits of eight modern apple cultivars farming organically and intensively as well.

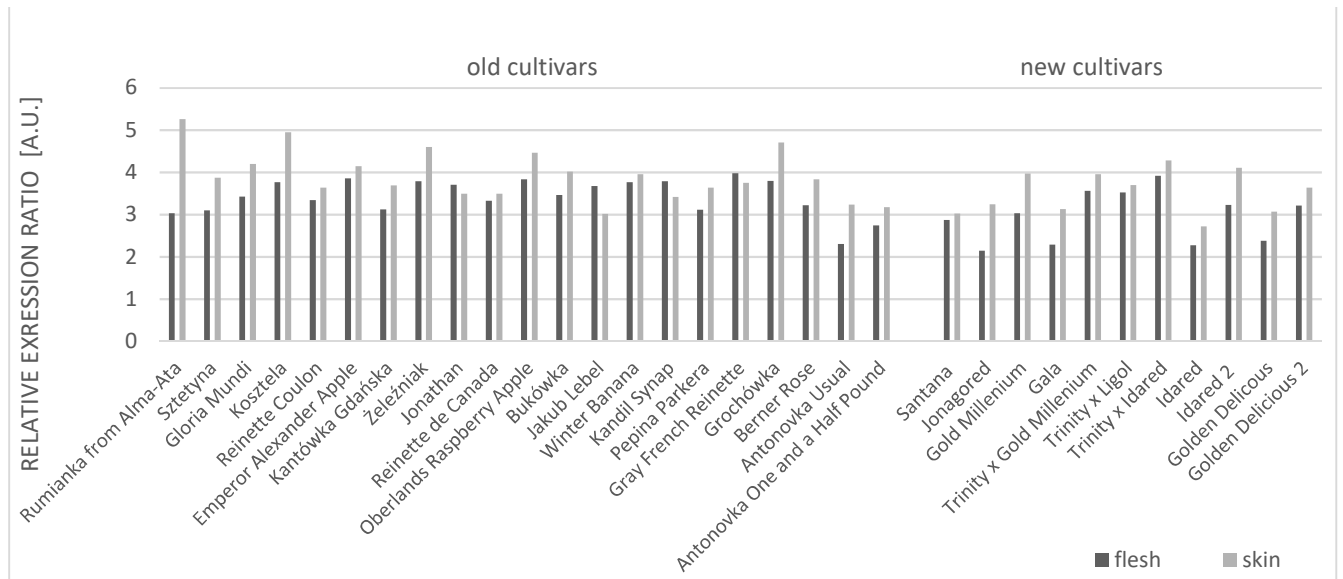
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Hassan, A.K.G.; Venkatesh, Y.P. An overview of fruit allergy and the causative allergens. *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.* **2015**, *47*, 180–187.
- Gao, Z.; Weg, E.W.V.; De Matos, C.I.; Arens, P.; Bolhaar, S.T.H.P.; Knulst, A.C.; Li, Y.; Hoffmann-Sommergruber, K.; Gilissen, L.J.W.J. Assessment of allelic diversity in intron-containing Mal d 1 genes and their association to apple allergenicity. *BMC Plant Biol.* **2008**. [CrossRef]
- WHO/IUIS Allergen Nomenclature Home Page. Available online: <http://www.allergen.org/> (accessed on 8 July 2020).
- Ebner, C.; Birkner, T.; Valenta, R.; Rumpold, H.; Breitenbach, M.; Scheiner, O.; Kraft, D. Common epitopes of birch pollen and apples—Studies by western and northern blot. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1991**. [CrossRef]
- Sancho, A.I.; Foxall, R.; Rigby, N.M.; Browne, T.; Zuidmeer, L.; Van Ree, R.; Waldron, K.W.; Mills, E.N.C. Maturity and storage influence on the apple (*Malus domestica*) allergen Mal d 3, a nonspecific lipid transfer protein. *J. Agric. Food Chem.* **2006**. [CrossRef]
- Gao, Z.S.; Van De Weg, W.E.; Schaart, J.G.; Van Arkel, G.; Breiteneder, H.; Hoffmann-Sommergruber, K.; Gilissen, L.J.W.J. Genomic characterization and linkage mapping of the apple allergen genes Mal d 2 (thaumatin-like protein) and Mal d 4 (profilin). *Theor. Appl. Genet.* **2005**. [CrossRef]
- Botton, A.; Lezzer, P.; Dorigoni, A.; Barcaccia, G.; Ruperti, B.; Ramina, A. Genetic and environmental factors affecting allergen-related gene expression in apple fruit (*Malus domestica* L. Borkh.). *J. Agric. Food Chem.* **2008**. [CrossRef] [PubMed]
- Bolhaar, S.T.H.P.; Van De Weg, W.E.; Van Ree, R.; Gonzalez-Mancebo, E.; Zuidmeer, L.; Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M.; Fernandez-Rivas, M.; Jansen, J.; Hoffmann-Sommergruber, K.; Knulst, A.C.; et al. In vivo assessment with prick-to-prick testing and double-blind, placebo-controlled food challenge of allergenicity of apple cultivars. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2005**. [CrossRef]
- Matthes, A.; Schmitz-Eiberger, M. Apple (*Malus domestica* L. Borkh.) allergen Mal d 1: Effect of cultivar, cultivation system, and storage conditions. *J. Agric. Food Chem.* **2009**. [CrossRef] [PubMed]
- Kootstra, H.S.; Vlieg-Boerstra, B.J.; Dubois, A.E.J. Assessment of the reduced allergenic properties of the Santana apple. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **2007**. [CrossRef]
- Vieths, S.; Jankiewicz, A.; Schöning, B.; Aulepp, H. Apple allergy: The IgE-binding potency of apple strains is related to the occurrence of the 18-kDa allergen. *Allergy* **1994**, *49*, 262–271. [CrossRef]
- Pagliarani, G.; Paris, R.; Arens, P.; Tartarini, S.; Ricci, G.; Smulders, M.M.J.; van de Weg, W.E. A qRT-PCR assay for the expression of all Mal d 1 isoallergen genes. *BMC Plant Biol.* **2013**. [CrossRef]
- Schmitz-Eiberger, M.; Matthes, A. Effect of harvest maturity, duration of storage and shelf life of apples on the allergen Mal d 1, polyphenoloxidase activity and polyphenol content. *Food Chem.* **2011**. [CrossRef]

14. Pühriinger, H.; Moll, D.; Hoffmann-Sommergruber, K.; Watillon, B.; Katinger, H.; Da Câmara Machado, M.L. The promoter of an apple Ypr10 gene, encoding the major allergen Mal d 1, is stress- and pathogen-inducible. *Plant Sci.* **2000**, *152*, 35–50. [[CrossRef](#)]
15. Yang, X.T.; Song, J.; Campbell-Palmer, L.; Walker, B.; Zhang, Z. Allergen related gene expression in apple fruit is differentially controlled by ethylene during ripening. *Postharvest Biol. Technol.* **2012**. [[CrossRef](#)]
16. Beuning, L.L.; Bowen, J.H.; Persson, H.A.; Barraclough, D.; Bulley, S.; MacRae, E.A. Characterisation of Mal d 1-related genes in *Malus*. *Plant Mol. Biol.* **2004**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Gau, A.E.; Koutb, M.; Pitrowski, M.; Kloppstech, K. Accumulation of pathogenesis-related proteins in the apoplast of a susceptible cultivar of apple (*Malus domestica* cv. Elstar) after infection by *Venturia inaequalis* and constitutive expression of PR genes in the resistant cultivar Remo. *Eur. J. Plant Pathol.* **2004**, *110*, 703–711. [[CrossRef](#)]
18. Hsieh, L.S.; Moos, M.; Lin, Y. Characterization of apple 18 and 31 kD allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1995**, *96*, 960–970. [[CrossRef](#)]
19. Borges, J.P.; Jauneau, A.; Brulé, C.; Culerrier, R.; Barre, A.; Didier, A.; Rougé, P. The lipid transfer proteins (LTP) essentially concentrate in the skin of Rosaceae fruits as cell surface exposed allergens. *Plant Physiol. Biochem.* **2006**. [[CrossRef](#)]
20. Kader, J.C. Lipid-transfer proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1996**. [[CrossRef](#)]
21. Fernández-Rivas, M.; Bolhaar, S.; González-Mancebo, E.; Asero, R.; van Leeuwen, A.; Bohle, B.; Ma, Y.; Ebner, C.; Rigby, N.; Sancho, A.I.; et al. Apple allergy across Europe: How allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2006**. [[CrossRef](#)]
22. Machesky, L.M.; Poland, T.D. Profilin as a potential mediator of membrane-cytoskeleton communication. *Trends Cell Biol.* **1993**. [[CrossRef](#)]
23. Zuidmeer, L.; Goldhahn, K.; Rona, R.J.; Gislason, D.; Madsen, C.; Summers, C.; Sodergren, E.; Dahlstrom, J.; Lindner, T.; Sigurdardottir, S.T.; et al. The prevalence of plant food allergies: A systematic review. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2008**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Zuidmeer, L.; Van Leeuwen, W.A.; Budde, I.K.; Breiteneder, H.; Ma, Y.; Mills, C.; Sancho, A.I.; Meulenbroek, E.J.; Van De Weg, E.; Gilissen, L.; et al. Allergenicity assessment of apple cultivars: Hurdles in quantifying labile fruit allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2006**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Marzban, G.; Puehringer, H.; Dey, R.; Brynda, S.; Ma, Y.; Martinelli, A.; Zaccarini, M.; Van Der Weg, E.; Housley, Z.; Kolarich, D.; et al. Localisation and distribution of the major allergens in apple fruits. *Plant Sci.* **2005**. [[CrossRef](#)]
26. Vlieg-Boerstra, B.J.; Van De Weg, W.E.; Van Der Heide, S.; Kerkhof, M.; Arens, P.; Heijerman-Peppelman, G.; Dubois, A.E.J. Identification of low allergenic apple cultivars using skin prick tests and oral food challenges. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2011**. [[CrossRef](#)]
27. Shenk, M.F.; Maas, M.P.; van der Smulders, M.J.M.; Gilissen, L.J.W.J.; Fischer, A.R.H.; Lans, I.A. van der Jacobsen, E.; Frewer, L.J. Consumer attitudes towards hypoallergenic apples that alleviate mild apple allergy. *Food Qual. Prefer.* **2011**, *22*, 83–91. [[CrossRef](#)]
28. Reid, K.E.; Olsson, N.; Schlosser, J.; Peng, F.; Lund, S.T. An optimised grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol.* **2006**. [[CrossRef](#)]
29. Gao, Z.S.; Van De Weg, W.E.; Schaart, J.G.; Schouten, H.J.; Tran, D.H.; Kodde, L.P.; Van Der Meer, I.M.; Van Der Geest, A.H.M.; Kodde, J.; Breiteneder, H.; et al. Genomic cloning and linkage mapping of the Mal d 1 (PR-10) gene family in apple (*Malus domestica*). *Theor. Appl. Genet.* **2005**. [[CrossRef](#)]
30. Wiersma, P.A.; Zhang, H.; Lu, C.; Quail, A.; Toivonen, P.M.A. Survey of the expression of genes for ethylene synthesis and perception during maturation and ripening of “Sunrise” and “Golden Delicious” apple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* **2007**. [[CrossRef](#)]
31. Ramakers, C.; Ruijter, J.M.; Lekanne Deprez, R.H.; Moorman, A.F.M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* **2003**. [[CrossRef](#)]
32. Meng, C.; Helm, D.; Frejno, M.; Kuster, B. moCluster: Identifying Joint Patterns Across Multiple Omics Data Sets. *J. Proteome Res.* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Tibshirani, R.; Walther, G.; Hastie, T. Estimating the number of clusters in a data set via the gap statistic. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Stat. Methodol.* **2001**. [[CrossRef](#)]

Figure S1. *Mal d 1.06A* expression in fruits of old and new varieties organically cultivated



The number 2 followed the names of Idared and Golden Delicious indicates higher maturity status

Figure S2. *Mal d 1.06A* expression in fruits of the selected new cultivars differentially farmed

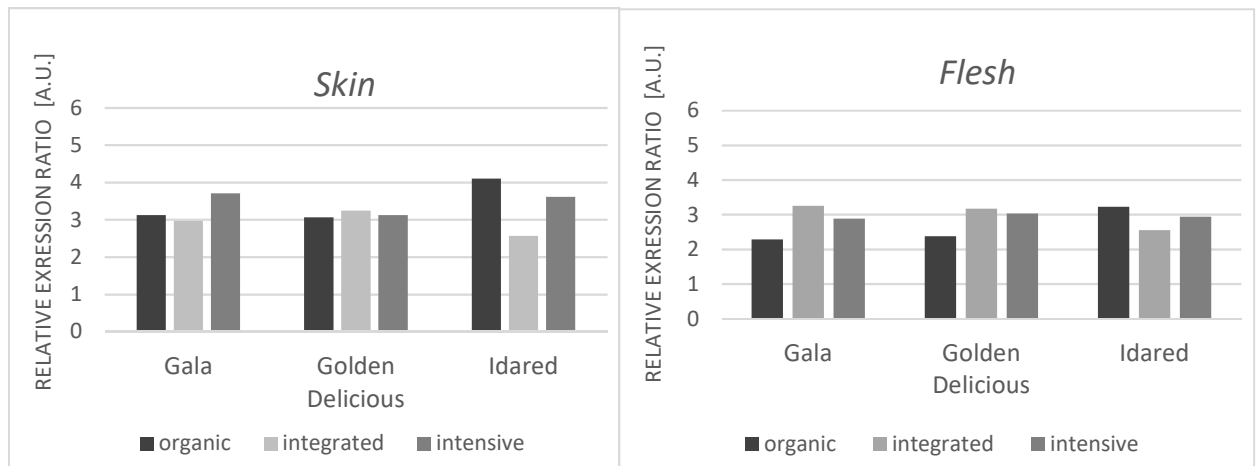
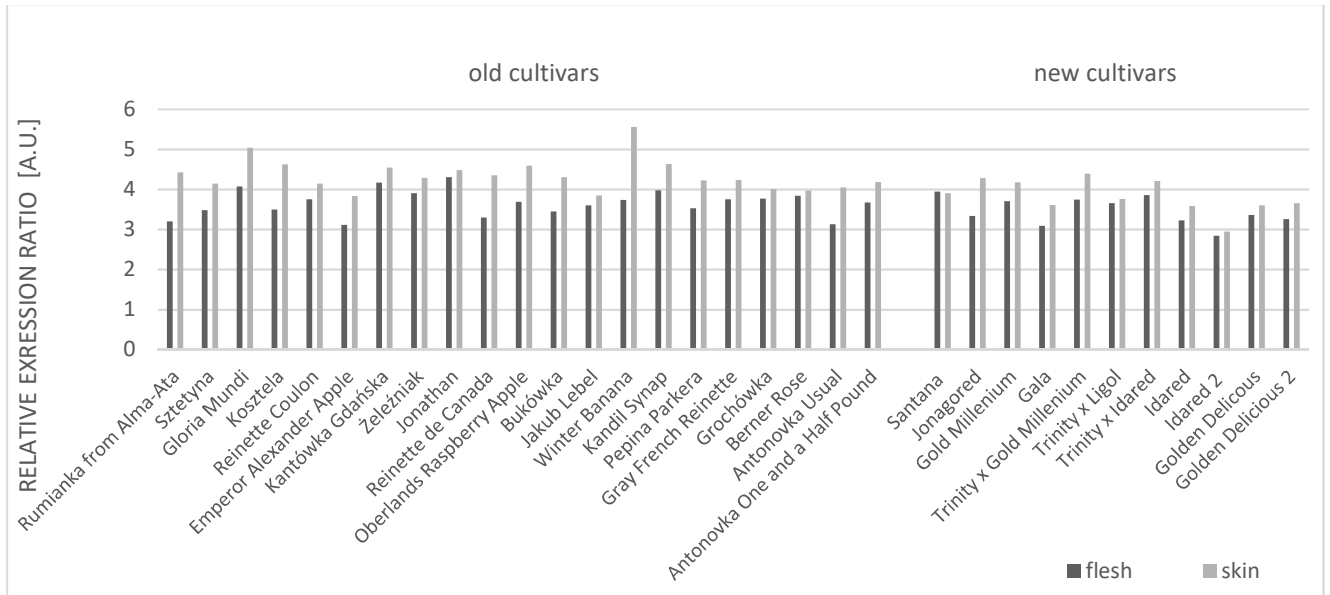


Figure S3. *Mal d 1.01* expression in fruits of old and new varieties organically cultivated



The number 2 followed the names of Idared and Golden Delicious indicates higher maturity status

Figure S4. *Mal d 1.01* expression in fruits of the selected new cultivars differentially farmed

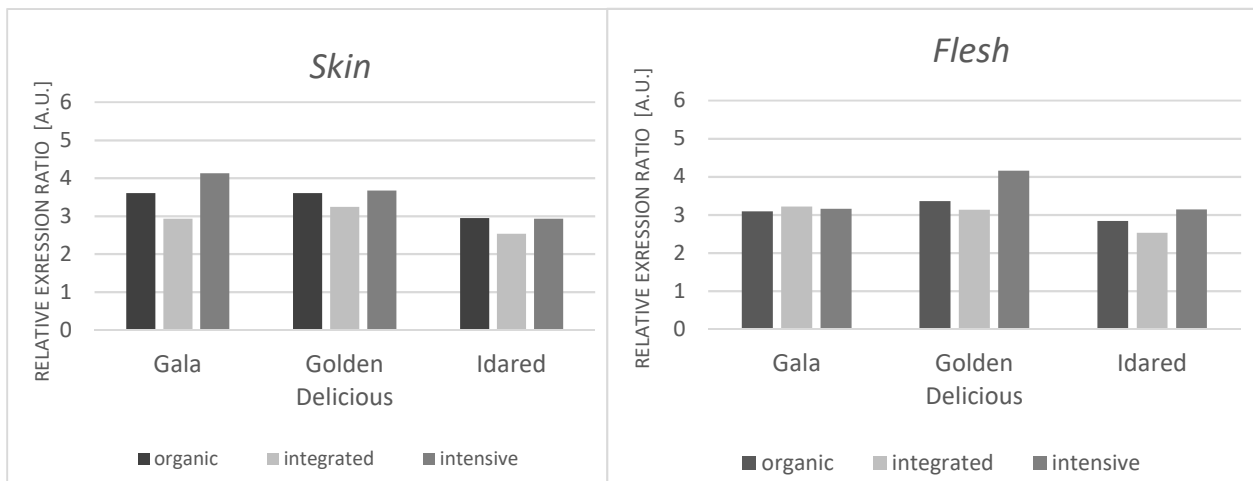
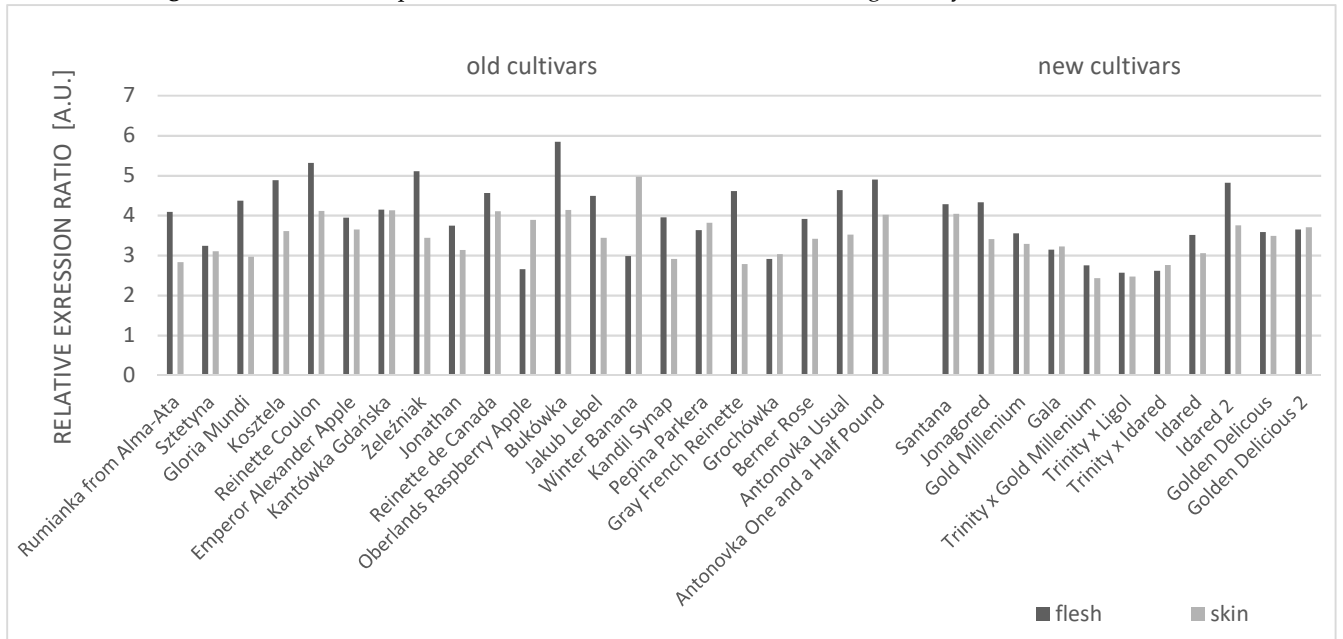


Figure S5. *Mal d 2.01* expression in fruits of old and new varieties organically cultivated



The number 2 followed the names of Idared and Golden Delicious indicates higher maturity status

Figure S6. *Mal d 2.01* expression in fruits of the selected new cultivars differentially farmed

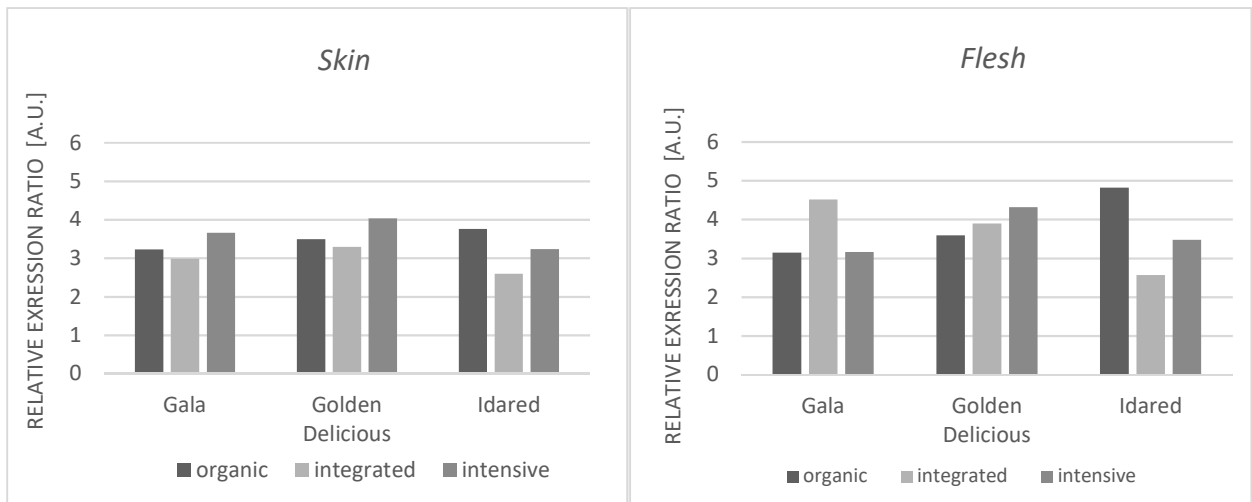
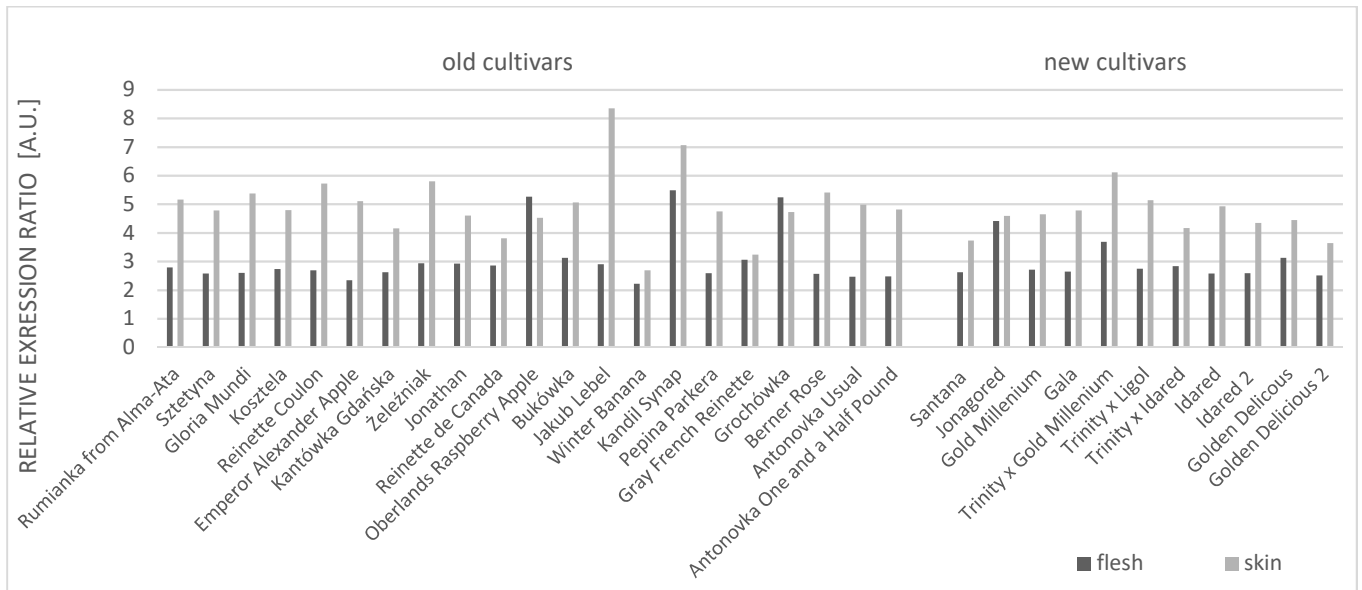


Figure S7. *Mal d 3.01* expression in fruits of old and new varieties organically cultivated



The number 2 followed the names of Idared and Golden Delicious indicates higher maturity status

Figure S8. *Mal d 3.01* expression in fruits of the selected new cultivars differentially farmed

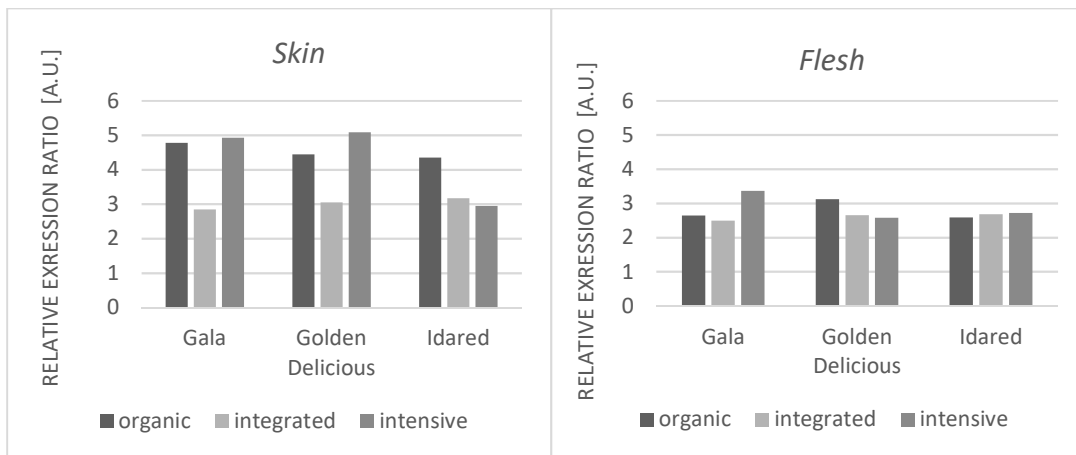
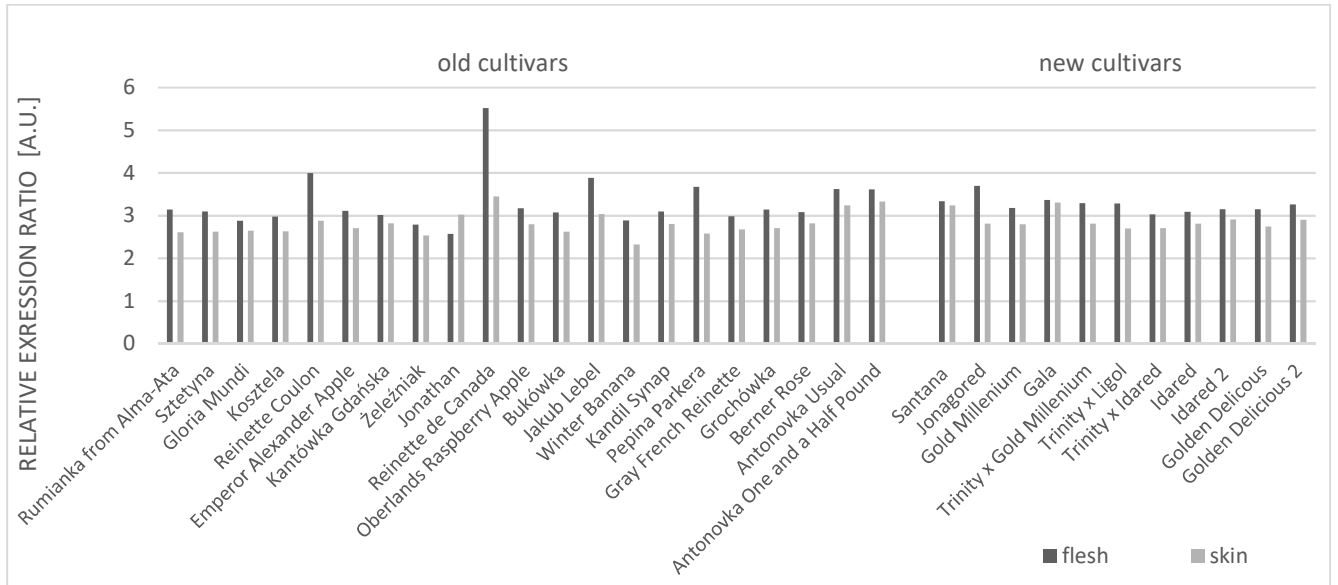
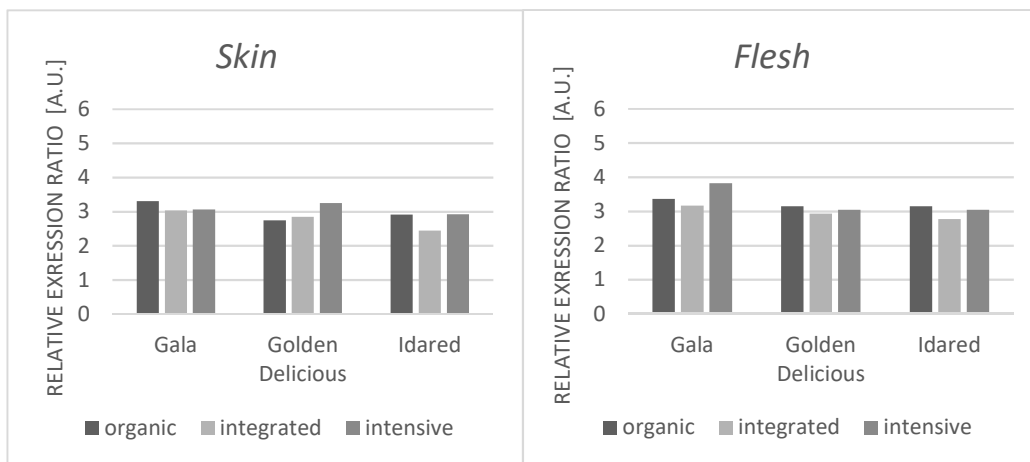


Figure S9. *Mal d 4.01* expression in fruits of old and new varieties organically cultivated



The number 2 followed the names of Idared and Golden Delicious indicates higher maturity status

Figure S10. *Mal d 4.01* expression in fruits of the selected new cultivars differentially farmed



Streszczenie w języku polskim

Około 50–70% pacjentów uczulonych na pyłek brzozy po spożyciu świeżych jabłek cierpi na zespół alergii jamy ustnej. W Europie Północnej i Środkowej Mal d 1 jest głównym alergenem wywołującym reakcje alergiczne na owoce jabłoni. W krajach śródziemnomorskich natomiast reakcje alergiczne wywoływane są głównie przez białko Mal d 3. Ryzyko reakcji alergicznych po spożyciu jabłek zależy od genotypu, stopnia dojrzałości i czasu przechowywania. Potencjał alergenny jabłek został oceniony tylko w kilku powszechnie uprawianych odmianach.

Celem niniejszej pracy była ocena alergenicności jabłek starych i nowych odmian uprawianych różnymi metodami, poprzez badanie poziomu białka Mal d 1, ocenę immunoreaktywności surowic oraz ocenę ekspresji genów i ich izoform kodujących cztery główne alergeny jabłek.

Materiałem do badań stanowiły próbki jabłek 21 tradycyjnych/starych i dziewięciu nowoczesnych odmian oraz surowice 4 pacjentów uczulonych na pyłek brzozy. Do oceny ekspresji genów i ich izoform *Mal d 1.01*, *Mal d 1.06A*, *Mal d 2.01*, *Mal d 3.01* i *Mal d 4.01* zastosowano technikę Real-Time PCR. Immunoreaktywność surowic pacjentów uczulonych na pyłek brzozy z ekstraktami jabłek oceniono z zastosowaniem techniki slot-blot. Poziom głównego alergenu jabłka Mal d 1 oceniono za pomocą techniki ELISA.

Izoformy genu Mal d 1 wykazują różny poziom ekspresji w zależności od genotypu, stopnia dojrzałości, rodzaju uprawy a także tkanki. Stwierdzono, iż skórka zawierała wyższy poziom transkryptu *Mal d 1.06A* niż miąższ. Wykazano także, iż ekspresja izoformy *Mal d 1.06A* koreluje z poziomem białka Mal d 1. Zawartość głównego alergenu Mal d 1 jest bardzo zróżnicowana pomiędzy odmianami (0,6 - 37,7 $\mu\text{g/g}$). W niniejszych badaniach, odmiana Gala charakteryzowała się niskim stężeniem Mal d 1 ($\sim 2 \mu\text{g/g}$), niezależnie od metody uprawy. Na podstawie ekspresji *Mal d 1.06A*, zawartości białka Mal d 1 oraz testu immunoreaktywności wyłoniono odmiany Grochówka, Kandil Sinap, Kosztela, Reinette Coulon i Gala jako potencjalnie hipoalergenne.

Poznanie molekularnego mechanizmu alergenicności jabłek i czynników modyfikujących może ułatwić poradnictwo medyczne i polepszyć opiekę nad pacjentami z alergiami pokarmowymi.

Streszczenie w języku angielskim

About 50-70% of patients allergic to birch pollen suffer from oral allergy syndrome after apple ingestion. In Central and Northern Europe, Mal d 1 is the major cause of allergic reactions, in the Mediterranean the Mal d 3 protein. The risk of allergenic reaction to apples depends on plant genotype, maturity and storage. The apple allergenicity was established only in few varieties.

The aim of study was to determine the apple allergenicity of old and new varieties and modifying factors, based on Mal d family genes expression, Mal d 1 protein content and sera immunoreactivity assays.

Molecular studies were performed on RNA extracted from apple fruits of 21 traditional and 9 modern varieties organically, intensively or integratively produced.

Expression of apple allergen genes *Mal d 1.01*, *Mal d 1.06A*, *Mal d 2.01*, *Mal d 3.01*, and *Mal d 4.01* was determined by Real-Time PCR. ELISA was used to measure the Mal d 1 protein content in apple samples. Immunoreactivity of apple extracts was determined by protein slot-blotting with serum from patients allergic to birch pollen.

Apple allergen Mal d 1 gene isoforms present divergent expression across apple cultivars, and was lower in the flesh than the peel. Expression of the *Mal d 1.06A* correlates with the Mal d 1 level, and is affected by cultivation method and maturity. The content of main allergen Mal d 1 varied widely across cultivars (0.6 - 37.7 µg/g), interestingly Gala variety presents low Mal d 1 concentration (~2 µg/g), regardless to cultivation method. Based on *Mal d 1.06A* expression, Mal d 1 protein content and the immunoreactivity assay Grochówka, Kandil Sinap, Kosztela, Reinette Coulon and Gala cultivars emerged as potentially low allergenic. The results of our study could facilitate the medical counseling for patients with allergies.