



SZENT ISTVÁN EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR

Mezőgazdasági biotechnológus MSc, levelező tagozat

**NEM PROLAMIN JELLEGŰ ALLERGÉN FEHÉRJÉK AZONOSÍTÁSA ÉS
JELLEMZÉSE GABONAFÉLÉKBEN**

Készítette:
Kovács Krisztina

Belső témavezető:
Dr. Kiss Erzsébet, egyetemi tanár
Szent István Egyetem Genetika és Biotechnológiai Intézet

Külső témavezetők:
Dr. Juhász Angéla, tudományos osztályvezető
Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézet
Alkalmazott Genomikai Osztály

Dr. Gell Gyöngyvér, tudományos munkatárs
Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézet
Alkalmazott Genomikai Osztály

Gödöllő

2014

TARTALOMJEGYZÉK

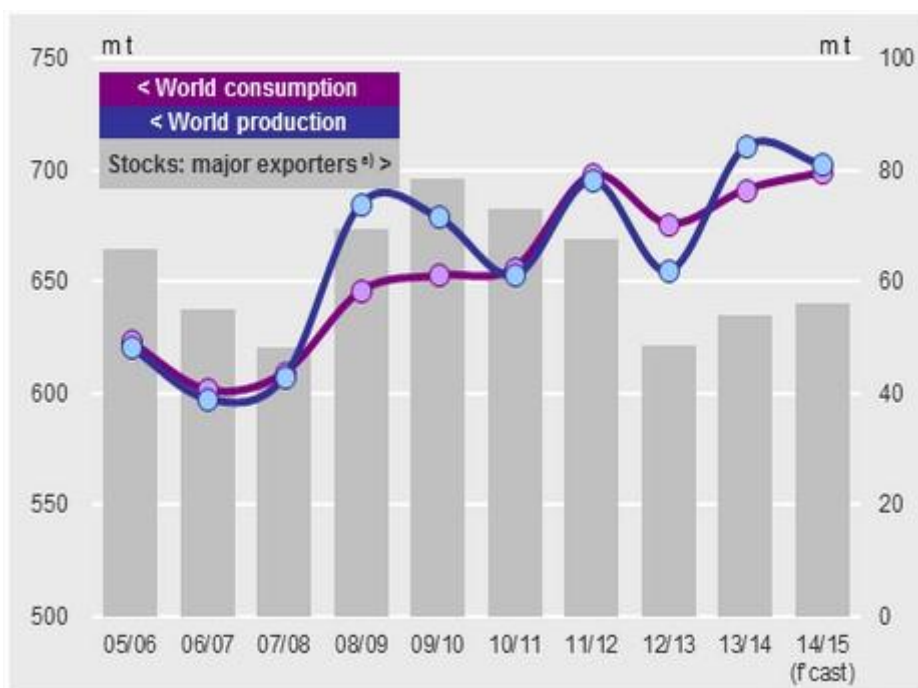
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
1. BEVEZETÉS.....	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	6
2.1. Élelmiszerallergia	6
2.2. Élelmiszer-allergének általános jellemzése.....	7
2.3. Búza által kiváltott túlérzékenységi reakciók	9
2.3.1. Búzaallergia.....	10
2.4. Búza magfehérjék jellemzői.....	12
2.5. Allergén fehérjecsaládok.....	14
2.6. Búzafajok, genomdonorok és vadfajok allergén tulajdonságai	19
2.7. Gabonaallergének azonosítási módszerei	19
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	22
4. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	23
4.1. Vizsgált növényanyag.....	23
4.2. Genomi DNS-izolálás	23
4.3. Primerek tervezése allergén fehérjét kódoló régióra.....	23
4.4. DNS amplifikáció PCR módszerrel	23
4.5. Agaróz gélelektroforézis	25
4.6. DNS-izolálás agaróz gélből.....	25
4.7. A-tailing.....	25
4.8. Klónozás.....	25
4.9. Szekvenálás	27
4.10. Bioinformatikai elemzések.....	27
4.10.1. Nukleinsav-szekvenciák elemzése	27
4.10.2. Fehérjeszekvenciák elemzése	27
4.10.3. Epitóp elemzések.....	27
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	28
5.1. Szekvenáláshoz szükséges DNS kivonása	28
5.2. Nukleinsav-szekvenciák elemzése	29
5.3. Fehérje alapú elemzések	34
5.4. Epitóp elemzések	37
5.5. Eredmények összesítése	42
6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	43
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	44
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	45
9. IRODALOMJEGYZÉK	46
10. MELLÉKLETEK	51

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

DBPCFC	Double-Blind Placebo-Controlled Food Challenge (kettős-vak placebó-kontrollált provokációs teszt)
ELISA	Enzyme - Linked Immunosorbent Assay; enzim-kapcsolt immunszorbens vizsgálat
EMA	Endomysial antibodies; endomízium elleni antitest
IgE	Immunoglobulin E
LMW	Low Molecular Weight; kis molekulatömegű
PCR	Polymerase Chain Reaction; polimeráz láncreakció
PR	Pathogenesis-related; patogenezissel kapcsolatos
RAST	Radio-allergosorbent test; radio-allergoszorbens teszt
tTG	anti-tissue transglutaminase; anti-szöveti transzglutamináz
WDEIA	Wheat Dependent Exercise Induced Anaphylaxis; mozgás által kiváltott búzafüggő anafilaxia

1. BEVEZETÉS

A búza az emberiség egyik legfontosabb energiaforrása; emellett vitamin-, ásványi anyag- és rosttartalma is jelentős. A kukoricát és a rizst követően a harmadik legnagyobb területen termesztett gabonaféle a világon (<http://faostat.fao.org>). A legfrissebb adatok alapján a világ összfogyasztása 702 millió tonna (International Grains Council 2014; <http://www.igc.int>) (1. ábra).



1. ábra: A világ búza termesztése és fogyasztása 2014-ben (International Grains Council, 2014; <http://www.igc.int>)

Magyarország összes betakarított termése 4 millió tonna, melyből 1,2 millió tonna kerül humán ételmezésre, 1,4 millió tonna exportra, 1,1 tonna takarmány felhasználásra (<http://www.ksh.hu>).

A búza (*Triticum*) a valódi fűfélék (*Poaceae*) családjába tartozó növénynemzetség, változatos éghajlati igényű és jó alkalmazkodóképességű fajtáinak köszönhetően széles körben elterjedt. A mediterrán régióból származó ősi leletek alapján a Közel-Kelet első kultúrnövényeként tartják számon, termesztése körülbelül 10-12 ezer éve kezdődött. Alap genomösszetétele 7 kromoszómából áll ($n=7$). Genomösszetételét tekintve diploid ($2n=14$), tetraploid ($4n=28$) és hexaploid ($6n=42$) formái különböztethetők meg. Mai hexaploid kenyérbúzáink három homológ, de egymással nem rekombinálo (azaz homoeológ) genommal rendelkeznek: A, B és D genom, mely a tetraploid emmer búza (*Triticum diccocooides*, AABB)

és a diploid kecskebúza (*Aegilops tauschii*, DD) hibridizációjával keletkezett körülbelül nyolcezer évvel ezelőtt. A 3 ősi genom közül az A és a D genom valószínűleg a *T. urartu* és *Ae. tauschii* diploid fajokból eredeztethetők, míg a B genom eredete nehezebben azonosítható, de feltehetően az *Aegilops* fajok S genomjából származik (Brenchley és mtsai 2012).

A búza a rizs és kukorica mellett az emberiség egyik legfontosabb energiabeviteli forrása. Számos kedvező élettani hatása mellett azonban az egyik leggyakoribb allergénforrás mind a gabonaallergiás, mind a cöliákias betegek körében. Jelenlegi tudásunk szerint az élelmiszerallergiák és egyéb típusú rendellenességek egyetlen hatékony kezelése olyan élethosszig tartó diéta betartása, mely nem tartalmaz tüneteket kiváltó komponenseket. A gabonafogyasztás kiváltotta tünetek sokfélesége és súlyossága az emberi genetikai tényezőkön felül jelentős mértékben függ az elfogyasztott allergén tulajdonságaitól is. Éppen ezért vált indokolttá a gabonafélék széles körben való komplex kutatása, immunológiai-, orvosi-, és molekuláris alapú vizsgálata.

A gabonafélék okozta megbetegedések számának az elmúlt évtizedekben tapasztalt emelkedésével mind nagyobb igény mutatkozik olyan búza genotípusok előállítására, melyekből a betegek számára is fogyasztható élelmiszerek készíthetők. A búza rokon termesztett és vadfajok számos agronómiailag kedvező tulajdonsággal rendelkeznek, melyek nemesítési felhasználásával a kenyérbúza környezeti stresszekhez való alkalmazkodó képessége, vagy például minőségi tulajdonságai jelentősen növelhetők, speciális igényekhez alakíthatók. Így többek között nemesítési alapanyagul szolgálhatnak alacsony allergén tartalmú illetve nem toxikus gabonaforrások előállításához is. Ezeknek a fajoknak az allergén tulajdonságairól azonban jelenleg kevés ismerettel rendelkezünk.

Dolgozatom célja több allergiát okozó fehérje vizsgálatára kiterjedő kísérletsorozat részleteinek bemutatása a martonvásári Gabona Génbankban fellelhető különböző *Aegilops* és *Triticum* fajok genotípusainak nem prolamin jellegű allergén fehérjéinek vizsgálatán keresztül.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Élelmiszerallergia

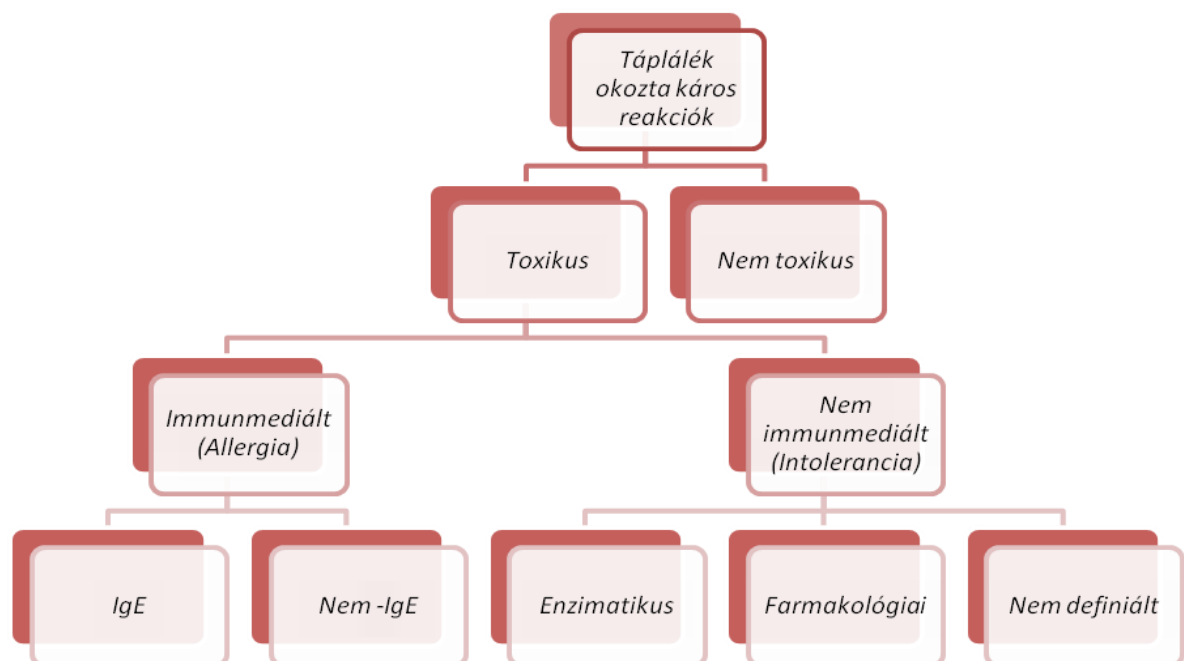
Az élelmiszerek okozta megbetegedések száma az elmúlt évtizedekben jelentős mértékben nőtt, a Járványkezelési- és Megelőzési Központ (Centers for Disease Control and Prevention) felmérése szerint a humán populáció kb. 2-6%-át érinti, azonban ez az arány gyermekek körében jóval magasabb, 5-8% (Sicherer és mtsai 2006, 2010). Az élelmiszerallergiás reakciók 50-90%-át mindössze nyolc élelmiszerfélése váltja ki – ezek a tej, tojás, földimogyoró, dió, szója, búza, hal és a tenger gyümölcsei (2. ábra) (Taylor és mtsai 2001).



2. ábra: A nyolc élelmiszerallergén (www.foodallergygal.com)

Az élelmiszerek által kiváltott káros reakciók az adott étel elfogyasztása utáni abnormális válaszként definiálhatók, melyek két csoportba oszthatóak: toxikus és nem-toxikus válaszok (3. ábra). A reakciókat toxikus komponensek váltják ki, melyek lehetnek az alapanyagban természetesen megtalálható összetevők, vagy olyan mértékben jelenlévő szennyező anyagok, melyek nem kívánatos válaszokat fejtenek ki egyes embereknél. A nem-toxikus reakciók egyéni fogékonyságtól függőek, és IgE- vagy nem-IgE-kapcsolt immunmechanizmuson alapulnak (allergia, hiperszenzitivitás), esetleg nem immunkapcsoltak (intolerancia). Az immunkapcsolt reakcióknak köszönhetően az úgynevezett egyes típusú

ételallergia (IgE közvetítő szerepe) szélesebb körben tanulmányozott területté vált. E csoportba tartozik az élelmiszerallergiák nagy hányada. Jellegzetességük, hogy a táplálék egésze vagy bizonyos alkotóelemei immunológiai folyamatot, IgE termelést indítanak be (Ortolani and Pastorello 2006). A nem IgE-mediált reakciók esetében nem mutatható ki IgE típusú antitest, a reakció kiváltásában különböző izotípusú antitestek (IgG, IgM, IgA) vagy egyéb sejtek (pl.: limfocita) játszanak főszerepet. Ebbe a csoportba tartozik többek között a cöliákia (celiac disease) és az ekcéma (atopic dermatitis) (Johansson és mtsai 2001). Azonban az étel által kiváltott nemkívánatos reakciók közül mégis az intolerancia fordul elő a leggyakrabban, amely nem immunválaszon alapul, hanem a páciens anyagcsere-folyamataival (pl.: tej-intolerancia elsődleges vagy másodlagos laktáz-hiány következménye) vagy az elfogyasztott táplálék összetételével, esetleg a nem-specifikus hisztion-felszabadító jellegével (pl.: magas koncentrációjú lektin, prolamin, poliamin stb) kapcsolatos (Sampson 1999, 2004).



3. ábra: Táplálék okozta káros reakciók (Ortolani és Pastorello 2006)

2.2. Élelmiszer-allergének általános jellemzése

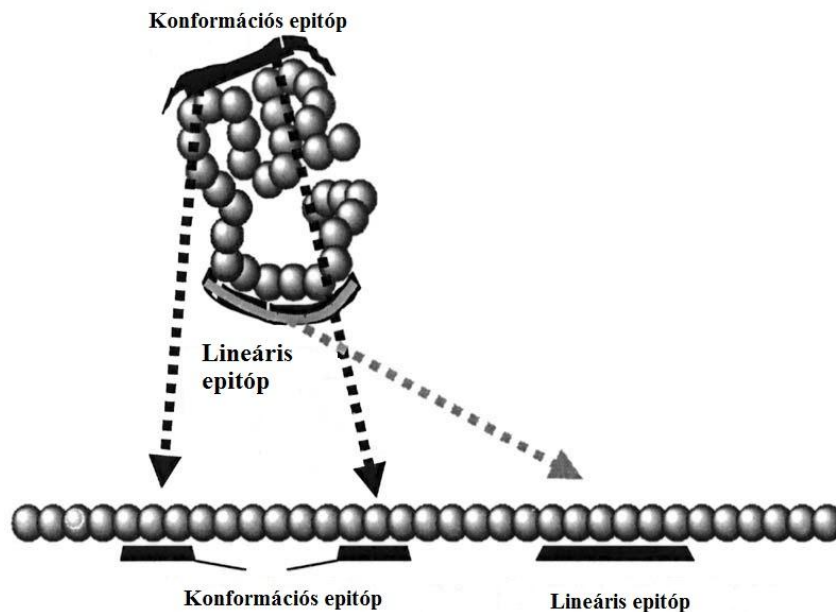
Az élelmiszer-allergének olyan molekulák, melyek képesek az IgE ellenanyag termelődését kiváltani, továbbá a beteg szervezetének adott fehérjével szembeni érzékenyítésében is nagy szerepet játszanak. Az IgE-mediált élelmiszer-allergia esetében az

allergének általában az élelmiszerekben természetesen előforduló fehérjék, illetve glikoproteinek. Egy garnélakrákban található transzfer RNS az egyetlen ismert kivétel, mely allergén hatással rendelkezik. Commins és munkatársai 2009-ben írtak le egy allergén glikoproteint, melynek szénhidrát egysége (galaktóz- α -1,3-galaktóz) váltotta ki a tüneteket (Sicherer és mtsai 2010). Az élelmiszerekben előforduló fehérjék igen kis hányada képes a túlérzékenységi reakció kiváltására. Ezek a molekulák az esetek többségében ellenállnak a feldolgozási folyamatoknak (pl. hőkezelés) illetve az emésztésnek.

Egy fehérje immunogenitása alapvetően aminosav-szekvenciájával és 3D szerkezetével áll összefüggésben. Több feltétel teljesülése szükséges ahhoz, hogy egy allergén fehérje specifikus IgE ellenanyaghoz tudjon kötődni. Az egyik legfontosabb kritérium a fehérje megfelelő mérete két IgE molekula közötti híd képzéséhez, a másik pedig az egynél több IgE-kötőhely megléte. Utóbbiaknak megfelelő távolságra kell lenniük egymástól, hogy a két ellenanyag közötti hidat kialakíthassák.

Egy molekula allergén aktivitásáért nagy részben felelős a mérete, a fehérje immunogenitása, a bélrendszer áteresztőképessége és a már említett hídképzési képesség. Ennek értelmében az allergén molekulák mérettartománya 10 és 70 kDa közé tehető, ugyanis a 10 kDa-nál kisebb molekulák nagyon alacsony immunogén hatással rendelkeznek, míg a 70 kDa-nál nagyobbak nagy valószínűséggel nem jutnak át „épségben” a bélnyálkahártyán (Taylor 1992, Sampson 1999, 2004, Sicherer és mtsai 2010).

Az ellenanyag antigénkötő helye által felismert fehérjeszakaszt epitópnak nevezzük. Megkülönböztetünk lineáris (v. szekvenciális) illetve konformációs epitópokat (4. ábra). A lineáris epitópok kialakításában csak a fehérje elsődleges szerkezete játszik szerepet, a fehérjelánc összefüggő részét képezik, így nagyrészt hőstabilak. A konformációs epitópok a fehérje harmadlagos szerkezetének kialakulásával jönnek létre: az aminosav-szekvenciában akár egymástól távol eső szakaszok a térszerkezet kialakulása következtében egymás mellé kerülve alakítják ki őket. Ennek következtében a molekula szerkezetében bekövetkező változások az antigenicitás elvesztésével járhatnak (Jackson 2003, Mills és mtsai 2003).



4. ábra: Lineáris és konformációs epitópok kialakulása (Sampson 2004)

Azoknál az egyéneknél, akiknél az IgE-mediált reakciót lineáris epitópok váltják ki, az élelmiszer minden formájának (nyers, feldolgozott) elfogyasztása tünetek megjelenésével jár. Ezzel szemben, akiknél a konformációs epitópok következtében alakul ki a reakció, jól tolerálják a hőkezelt vagy részlegesen hidrolizált élelmiszereket, ugyanis a fehérje térszerkezetének változása következtében ezek az epitópok megsemmisülnek. Az epitópok vizsgálata, pontos meghatározása elősegíti az allergiás reakció súlyosságának megállapítását, ugyanis klinikai vizsgálatok számolnak be arról, hogy azok a betegek, akiknek IgE ellenanyagai több epitóppal is reagálnak, komolyabb tüneteket produkálnak (Sampson 2004).

2.3. Búza által kiváltott túlérzékenységi reakciók

Az élelmiszerallergiában szenvedők 10-20%-a szenved búza okozta megbetegedésben, ami jelentős egészségügyi problémát jelent a fejlett országokban (Hischenhuber és mtsai 2006).

A búza fehérjéi több különböző típusú túlérzékenységi reakciót okozhatnak, melyek közül a legjelentősebbek a következők (Chapman és mtsai 2006, Sapone és mtsai 2012):

- immunmediált, azonnali választ kiváltó (klasszikus allergia, WDEIA, pékasztma),
- immunmediált nem azonnal választ kiváltó (cöliákia, irritábilis bél szindróma) és
- nem immunmediált (hiperszenzitivitás) reakciók.

Patogenezis szempontjából az alábbi búza által kiváltott rendellenességek a leggyakoribbak:

- autoimmun betegségek (cöliákia, gluten ataxia, dermatitis herpetiformis)
- allergiás reakciók (ételallergiaallergia, WDEIA, pékasztna, csalánkiütés)
- nem allergiás, nem autoimmun betegségek (nem-cöliakiás gluténérzékenység)

A **cöliákia** (gluténszenzitív enteropátia) a vékonybél nyálkahártyájának elváltozásával járó autoimmun, krónikus, gyulladásos rendellenesség, mely felszívódási problémákhoz vezet. A betegség előfordulási gyakorisága kb. 1-4%. A cöliákia környezeti, genetikai és immunológiai faktorok komplex kölcsönhatása során alakul ki. A betegséget egy gliadin-specifikus T-sejt-válasz indukálja, amit a szöveti transzglutamináz enzim által deaminált gliadin vált ki. A tünetek súlyosságától függetlenül a betegség kezelési módja az élethosszig tartó, szigorú gluténmentes diéta, mely kizárja a búza, a rozs és az árpa fogyasztását is (Taylor és mtsai 2001, Sapone és mtsai, 2012).

A **búzaallergiát** a búza fehérjék által kiváltott kedvezőtlen immunválaszként tartják számon. Az allergének tulajdonságai és az alapvető immunmechanizmus alapján a klasszikus ételallergia csoportba, míg az allergéneknek való kitettség és az immunológiai mechanizmusok alapján a következő csoportokba sorolhatók: klasszikus allergia, mozgás által kiváltott búzafüggő anafilaxia, pékasztna (a kiváltó komponensek belégzése váltja ki) és érintkezéssel csalánkiütés. Az IgE antitestek központi szerepet játszanak a betegség patogenezisében. A betegség kezelési módja a betegségeket kiváltó fehérjéket elhagyó diéta. (Sapone és mtsai 2012).

A harmadik csoportba a **nem-cöliakiás gluténérzékenység** sorolható. E betegség tünetei nagymértékben hasonlóak a cöliakiához, azonban a betegek negatív allergia és cöliákia tesztekkel (anti-tTG és anti-EMA) rendelkeznek (Sapone és mtsai 2012)

2.3.1. Búzaallergia

A búzaallergiás tünetek megjelenése, előfordulása igen eltérő lehet mind életkor, mind étkezési szokások tekintetében. Míg az ekcéma inkább gyermekek körében, a WDEIA és a csalánkiütés felnőtt korban jellemző allergiás tünet. A pékasztna az egyik legelterjedtebb légúti allergia a liszttel dolgozók körében. Élelmiszer-érzékeny gyermekek nagy hányada életük első 3-5 évében kinövi az adott étel iránti érzékenységet, míg felnőttkorban kialakuló intolerancia hosszantartó betegséget von maga után (Sampson 1999).

A túlérzékenységi reakciók kiváltó oka lehet az élelmiszerrel való közvetlen érintkezés, vagy az élelmiszer elfogyasztása. A tünetek változatosak, enyhétől az életveszélyesig terjedhetnek. Csoportosításuk legegyszerűbben az érintett szerv, szervrendszer alapján lehetséges:

- Bőrön jelentkező tünetek: csalánkiütés, ekcéma, herpeszszerű bőrgyulladás
- Légzőszervi tünetek: orrnyálkahártya-gyulladás, asztma
- Emésztőrendszeri tünetek: hányás, hasmenés, hasi görcsök, bélgyulladás, gyomor- és bélhurut
- Több szervrendszert együttesen érintő tünetek: anafilaxia (extrém súlyosságú, hirtelen fellépő, több szervrendszert érintő allergiás reakció, a légzőrendszer és a keringési rendszer összeomlása estén halálhoz vezethet)

A búzaallergének esetében az emésztőrendszeri panaszok a leggyakoribbak, főként a nem-IgE-mediált allergének tekintetében. A bőrt és légzőszerveket érintő tünetek az IgE-mediált reakciók estén jellemzőek (Taylor és mtsai 2001, Sampson 1999, 2004).

A gabonafélék okozta túlérzékenységi reakciók pontos diagnózisához négy vizsgálat elvégzése szükséges: kórtörténet tanulmányozása, bőrtesztek (karcolásos – SPT próba, szérum tesztek (RAST), és provokációs tesztek (nyílt, egyszeres vak, kettős-vak placebo-kontrollált - DBPCFC) alkalmazása. Ezeken kívül hasznos lehet a diagnózis felállításához különböző allergén-eliminációs diéták alkalmazása is (Chapman és mtsai 2006, Sampson 2004). A RAST tesztet egy specifikus allergén által okozott allergia kimutatására alkalmazzák. A vizsgálat során az IgE antitest mennyiségét határozzák meg vérből. Napjaink standard kimutatási módszere az ImmunoCAP® test (Pharmacia Diagnostics), a korábbi tesztek továbbfejlesztett változata, mely szintén humán vérszérumból történő allergén specifikus IgE mennyiségi kimutatására alkalmas in vitro módszer. ImmunoCAP technológia alapja egy, allergén fehérjét megkötő, cellulóz membrán. A teszt kiértékelése fluoreszcens jel detektálása alapján történik (Johansson 2004).

Az élelmiszer okozta allergiás tünetek kezelhetők bizonyos gyógyszerekkel, mint például antihisztaminok, kortikoszteroidok, epinefrin. A gyógyszeres kezelés modernebb, költségesebb változata az immunterápia. Ez esetben az immundomináns epitópot aminosav-szubsztitúcióval módosítják, aminek következtében jelentős mértékben csökken az IgE-kötő képessége (Sampson 2004, Sicherer és mtsai 2006). Egy másik immunterápiás stratégia a kiméreafehérjék alkalmazása, melyek az allergén-specifikus IgE molekulákkal komplexet képezve akadályozzák meg a tünetek kialakulását (Sampson 2004).

Jelenleg a betegség kialakulásának megelőzésére nincs hatékony módszer, az egyetlen javaslat olyan diéta betartása, mely nem tartalmaz tüneteket kiváltó molekulákat, fehérjéket. A diéta felállításánál azonban fokozott figyelmet kell fordítani arra, hogy a megváltozott étrend ne vezessen hiányos táplálkozáshoz, táplálkozási zavarokhoz (Sicherer és mtsai 2010). Allergiás betegek szinte kivétel nélkül tudnak spelta (*Triticum spelta*) búzát fogyasztani, míg búzát, árpat, rozst nem a tünetek megjelenése nélkül. A spelta búza gyakorlatilag a kenyérbúzával azonos prolamin alléleket tartalmaz, tehát búzaallergia esetében a prolaminok szerepe mellett hangsúlyosabb a nem prolamin jellegű allergének szerepe (Armentia és mtsai 2012).

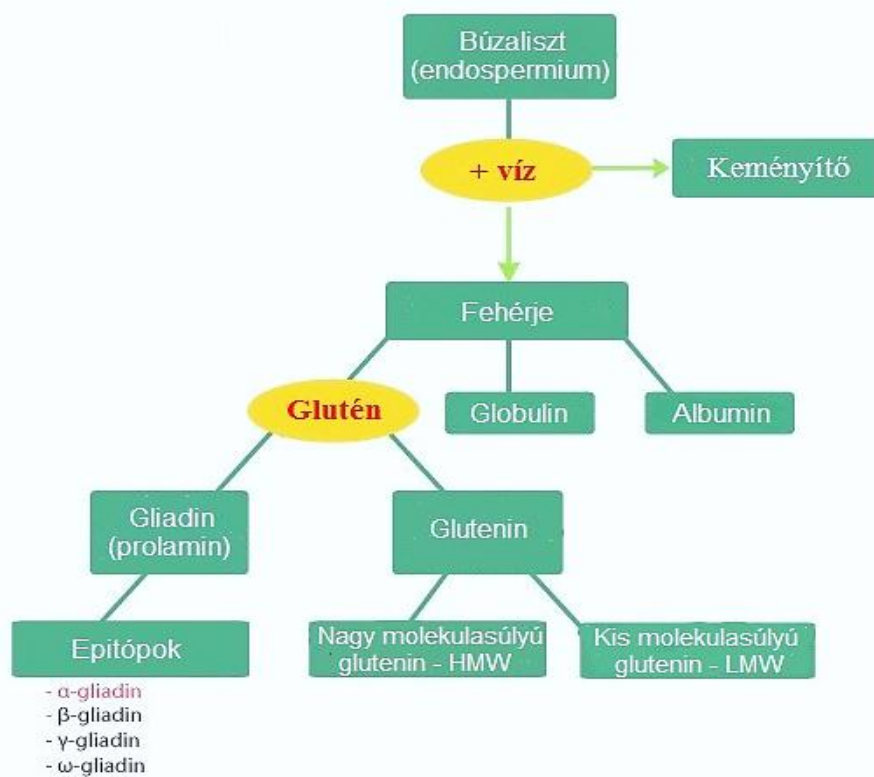
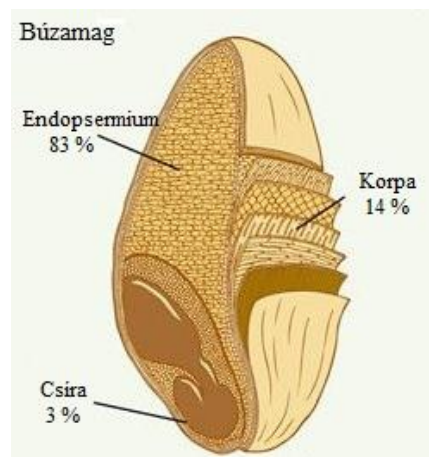
2.4. Búza magfehérjék jellemzői

A búza genetikai összetétele meghatározó a lisztből készült élelmiszerek minőségi tulajdonságainak kialakításában, de a gének expressziójának, továbbá az expressziót befolyásoló különböző környezeti faktoroknak is fontos szerepe van.

A búzamagot tömeg alapján három fő részre különíthetjük el: endospermium (~83%, korpa ~ 14%, és embrió (csíra) ~3% (5. ábra). Az endospermium nagy részét (65-75%) keményítő alkotja, kisebb hányadát pedig fehérjék (10-15%), lipidek (1-2%) és víz (7-8%) építik fel (Igrejas és mtsai 2001).

Az endospermiumban található felhalmozódott fehérjék körülbelül 80%-t teszik ki a N és S raktározásban kiemelt szerepet játszó tartalékfehérjék. A tartalékfehérjék minőségi és mennyiségi összetétele jelentős mértékben járul hozzá a gabona magvakból örölt liszt minőségéhez, beltartalmi tulajdonságaihoz, illetve az egészségre káros allergén vagy toxikus fehérjék mennyiségéhez. A búza és rokonfajok fehérjéi kémiai, fizikai és molekuláris tulajdonságaik alapján négy nagyobb csoportra oszthatóak (Osborne 1907) (5. ábra). A búza víz- illetve sóoldható fehérjéi az albuminok és globulinok, az vizes alkoholban oldható fehérjék a monomer gliadinok, míg a híg savban vagy lúgban oldható fehérjék a polimer képzésre hajlamos gluteninek (Osborne 1907). A molekuláris genetikai vizsgálatok elterjedésének köszönhetően egyre több információ derült ki az ezeket a fehérjéket kódoló gének szerkezetéről, tulajdonságairól. Ezek az új ismeretek vezettek a Shewry és mtsai. (1999) által kidolgozott nevezéktanhoz, ahol az egyes gének hasonlóságának mértéke alapján mind a korábban monomer prolaminnak nevezett gliadinokat, mind pedig a polimerképzésre hajlamos gluteninet egységesen prolaminnak nevezik. A későbbi vizsgálatok során bizonyították, hogy a búza a nagy és kis molsúlyú (HMW- és LMW-) glutenin alegységei prolamin tulajdonságokkal rendelkeznek, azaz alkoholban oldható polipeptidek.

A búzaliszt fehérjetartalmának nagy részét (65-70%) alkotó gliadinok és gluteninek kiemelkedő szerepet játszanak a lisztből készült tésztafélék és sütőipari termékek minőségének kialakításában: míg HMW- és LMW- gluteninek a tészta elasztikus tulajdonságainak kialakulásában játszanak szerepet, addig a monomer alfa-, gamma- és omega-gliadinok a tészta nyújthatóságáért felelősek. Emellett azonban speciális aminosav összetételüknek, nagy prolin és glutamin tartalmuknak köszönhetően kulcsszerepet játszanak az arra érzékenyeknél az allergiás illetve a cöliákiás tünetek kialakításában (Mills és mtsai 2012).

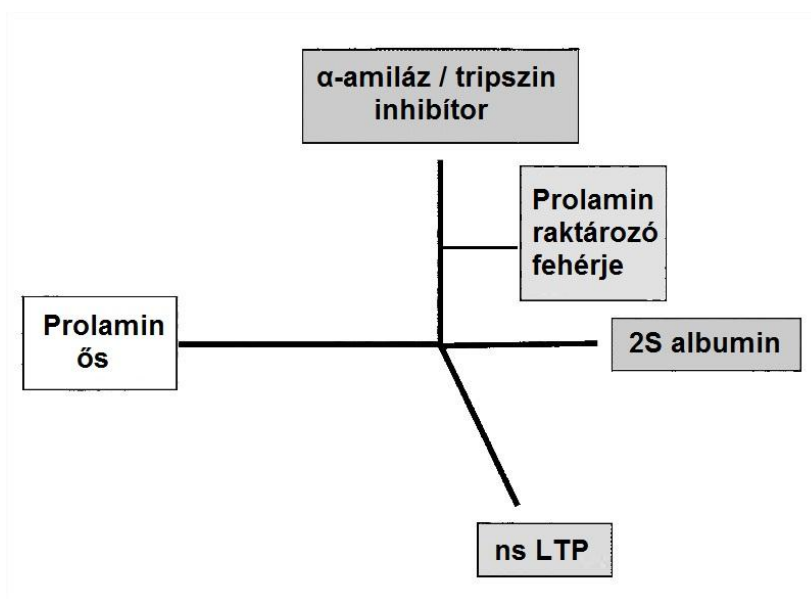


5. ábra: A búzamaz felépítése, és fehérjeösszetétele (<http://www.cerealsandhealth.com>)

2.5. Allergén fehérjecsaládok

A legtöbb élelmiszerallergén fehérje, köztük a gabonaallergének is mindössze néhány fehérjecsaládba sorolhatóak, jelezve, hogy a konzerválódott struktúrák és a biológiai aktivitás fontos szerepet játszik az allergizáló tulajdonságok meglétében. A Pfam fehérje adatbázis (Bateman és mtsai 2004) a növényi fehérjeszekvenciákat homológia alapján rendezi csoportokba, mely a konzerválódott háromdimenziós szerkezettel és a funkcióval függ össze. Ezek alapján a legtöbb allergén raktározó vagy védelmi funkciót betöltő fehérje. A legelterjedtebb gabonaallergén fehérjéket tartalmazó szupercsaládok: a prolaminok, kupinok, és a védelmi funkciót betöltő fehérjék (Breiteneder és Radauer 2004).

A prolamin szupercsalád több nagyobb allergéncsoportot foglal magába, ezek a valódi prolaminok (gliadinok, HMW és LMW-gluteninek), a 2S albuminok, nem-specifikus lipid transzfer proteinek (nsLTP) és alfa-amiláz/tripszin inhibítor fehérjék (Breiteneder és Radauer 2004; Mills és mtsai 2004) (6. ábra).



6. ábra: Evolúciós kapcsolat a prolamin szupercsalád tagjai közt (Mills és mtsai 2004)

A szupercsalád valamennyi tagjára jellemző a nyolc ciszteinből álló konzervatív gerinc (C–X_n–C–X_n–C–X_n–C–X–C–X_n–C–X_n–C); négy, diszulfid-kötésekkel stabilizált jobbsaváros α-hélix, és összehajtott levél szerkezet (Mills és mtsai 2004). A prolaminok kulcsszerepet játszanak számos búza okozta rendellenességben. A kén-gazdag prolaminok, mint az alfa-gliadinok és a LMW-gluteninek a búza allergia kiváltásáért felelősek, az alfa-amiláz inhibítorok és a nem-specifikus lipidtranszfer proteinek pékasztmát okozó epitópokat tartalmaznak, az omega-gliadin a búzafüggő mozgás által kiváltott anafilaxia (WDEIA) az alfa- és gamma

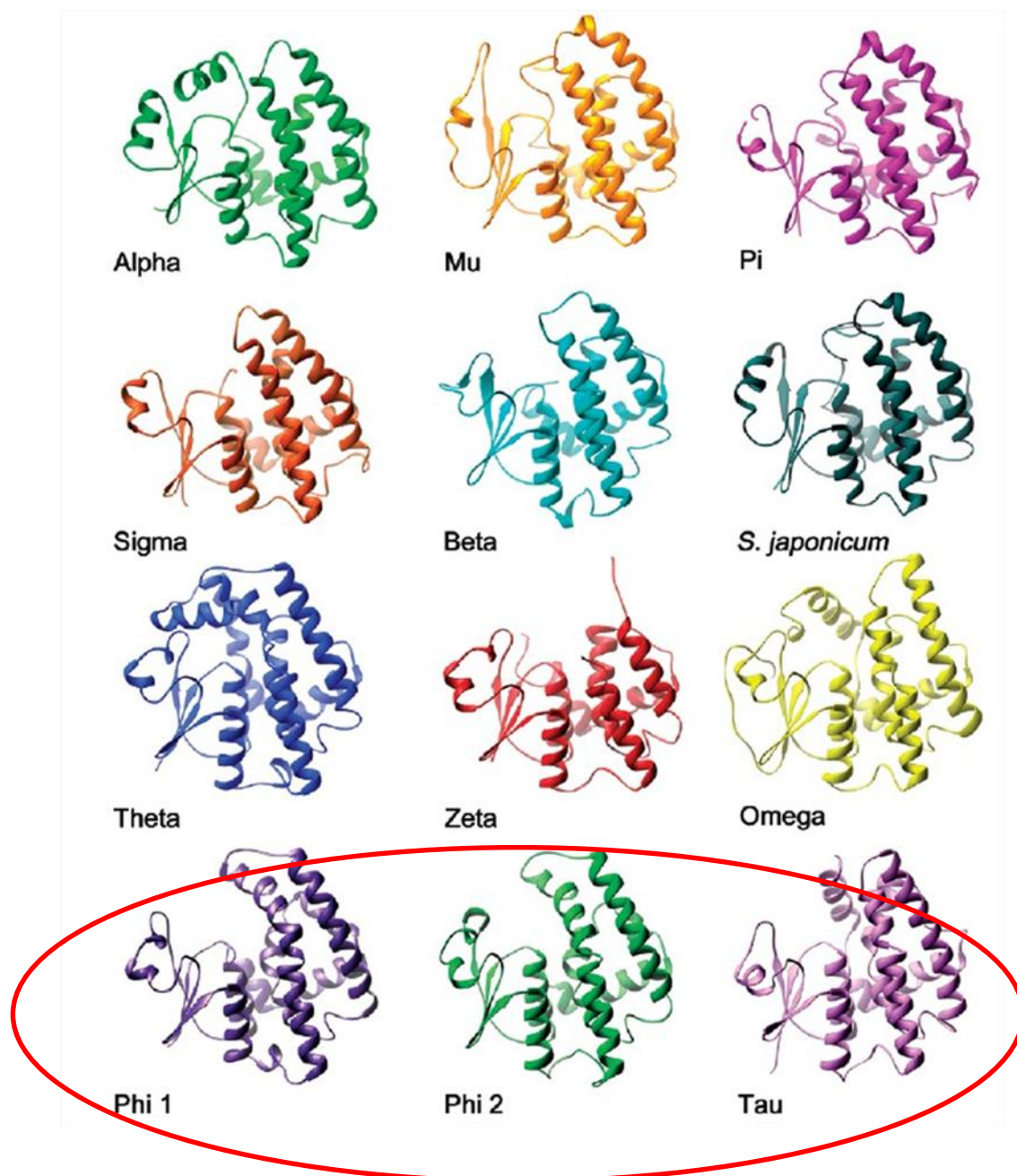
gliadinok pedig a cöliákiához kapcsolt toxikus peptideket tartalmazhatnak (Juhász és mtsai 2012).

A kupin szupercsalád változatos fehérjék csoportja, melyek közös jellemzője a kétszeresen felcsavarodott béta-hélix szerkezet. Két fő csoportja a 7S (vicillinek) és a 11S (leguminok) globulinok, melyek hüvelyesek és magvak tartalékfehérjéiként fordulnak elő. A 7S globulinok 50 kDa tömegű monomerekből felépülő trimerek, míg a 11S globulinok 60 kDa tömegű monomerek hexamerjei. A kismértékű szekvencia hasonlóság ellenére a harmadlagos szerkezetükben számos konzervált régió található. A 7S globulinok cisztein mentesek, ennek következtében nem tartalmaznak diszulfid-hidakat (Mills et al, 2004; Sommergruber and Mills 2009).

A védelmi funkciót betöltő fehérjék csoportja PR (pathogenesis-related) fehérjéket, proteázokat és proteáz-inhibitorokat foglalja magába. A PR fehérjéket biotikus és abiotikus stresszel szemben termelik a növények, ennek következtében az adott faj különböző egyedeiben eltérő mennyiségben lehetnek jelen. Gabona okozta rendellenességek szempontjából a thaumatin-szerű fehérjék (TLP) fontosak, melyek a pékasztma okozói lehetnek, illetve a proteáz inhibitorok csoportja, mely fehérjék szintén a búzaallergia betegségkör kiváltói közé tartoznak (Mills és mtsai 2004; Sampson 2004). További védelmi funkciót betöltő ismert fehérje a cys-peroxiredoxin, a glutation-S-transzferáz és a dehydrin. A cys-peroxiredoxin és a glutation transzferáz a thioredoxin-szerű fehérjék csoportjába tartozik, alapvető funkciójuk a stressztolerancia kialakítása herbicid-detoxifikáció katalizálása révén, továbbá transzportfehérje, illetve antioxidáns tulajdonságokkal is rendelkeznek. A peroxidázok oxidatív stressz kiváltása céljából hidrogén- és alkilperoxidok katalizálásáért felelősek. Csaknem minden élő szervezetben előfordulnak, növények esetében jelentős szerepet játszanak a fotoszintézisben (Hofmann és mtsai 2002). Számos kutatási eredmény bizonyítja, hogy e két csoport (GST, peroxidázok) egy közös őstől származnak. Erre utal a hasonló struktúrájuk, konzervált aminosavszekvenciájuk (Copley és mtsai 2004). A dehydrinek erőteljesen hidrofób fehérjék. Expressziójuk a növények normál fejlődésmenete esetén a késői embriogenezis idején megkezdődik, azonban környezeti stressz (szárazság, alacsony hőmérséklet, magas sótartalom) hatására túltermelődésük figyelhető meg (Rorat 2006; Pahr és mtsai 2012). A profilinokat sejtváz alkotóként tartják számon, számos konzervált aminosav-régiót tartalmaznak, emiatt jelentős keresztallergének. Az expanszinok multigén családot alkotnak, melyek a búzán kívül a legtöbb gabonafélében is megtalálhatóak. Fő funkciójuk a sejtfal- mátrix módosításában, ezáltal a sejtnövekedésben is rejlik, továbbá a patogénrezisztenciában is szerepet játszanak (Breen és

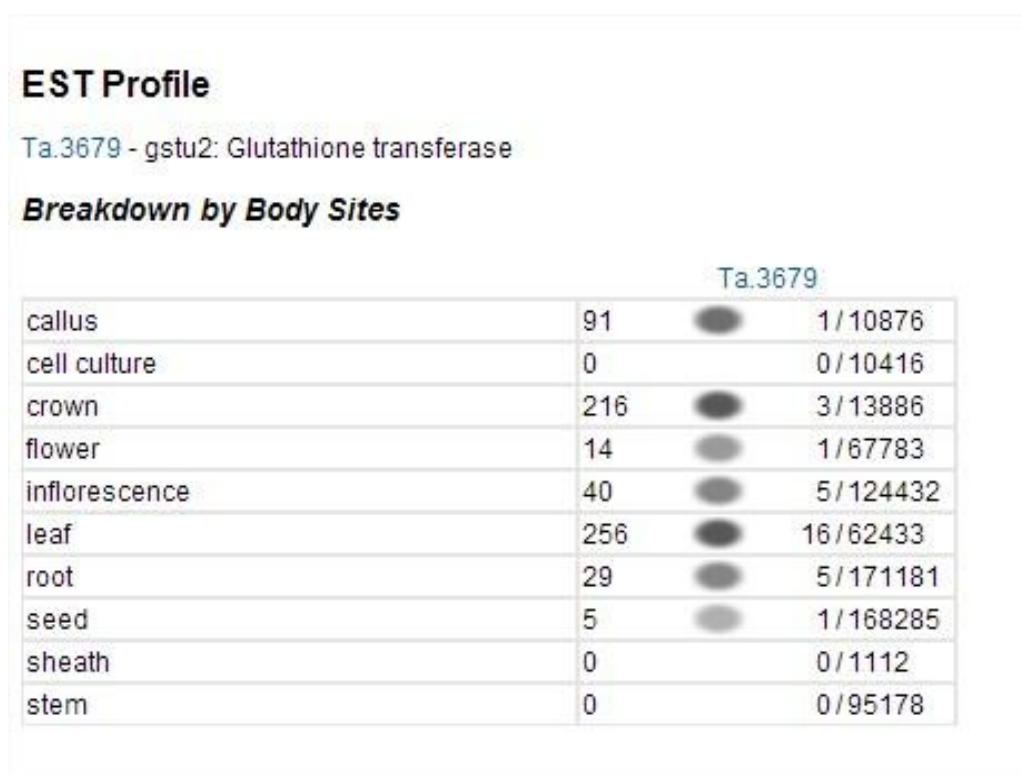
mtsai 2010). Növényekben két csoportjuk található meg, az alfa-expanszinok és a béta-expanszinok. Fő allergénként a béta-expanszinokat tekintik (Cosgrove és mtsai 1997).

A glutation-S-transzferáz a növényi védekező-rendszer részét képezi biotikus és abiotikus stresszformákkal szemben, mint például szárazság hatására bekövetkező oxidatív stressz, patogénekkal szembeni védelem, xenobiotikumok detoxifikálása (Marrs 1996). A glutation-S-transzferázok egy igen heterogén enzimesalád, struktúra alapján 13 osztályba sorolhatóak: alpha, beta, delta, epsilon, zeta, theta, mu, nu, pi, sigma, tau, phi, and omega. A tau és a phi osztályok csak a növényvilágra jellemzőek (7. ábra).



7. ábra: Glutathione-S-transzferáz osztályai (Thom és mtsai 2002)

A glutation-S-transzferáz régóta ismert allergén, mely légúti és emésztőrendszeri tüneteket vált ki. Phar és mtsai (2012) különböző típusú allergiában szenvedő betegeket vizsgáltak. Arra az eredményre jutottak, hogy a glutation-S-transzferáz legnagyobb szerepe a légzési allergiák, illetve a pékasztna kiváltásában van. De nem zárható ki teljesen, hogy táplálékallergénként is funkcionál, mert jelentős mértékű keresztallergiát mutat egyéb búza eredetű táplálékallergénekkel is (Aalberse 2007). Az általunk vizsgált glutation-S-transzferáz fehérje génjei búza EST adatbázis információk alapján legnagyobb mennyiségben a levélben, a hajtáscsúcsban, a virágzatban, és a magban is expresszálnak (8. ábra), ezáltal elfogyasztva és belélegezve is allergiát okoznak (táplálékallergia, pékasztna). A glutation-S-transzferáz az ismert búza transzkriptom adatbázisok adatait felhasználva a növény számos szövetében, így jelentős mennyiségben a magban is termelődik.



8. ábra: Glutathion transzferáz (Ta.3679) expressziós profilja különböző búza szövetekben (fentről lefelé: kallusz, sejtkultúra, hajtáscsúcs, virág, virágzat, levél, gyökér, mag, levélhüvely, szár)

A tau típusú glutathion-S-transzferáz kristályszerkezetét egy *Aegilops tauschii* genotípusból határozták meg (PDB adatbázis azonosító 1GWC). Ennek köszönhetően volt

viszonyítási alap mintáink vizsgálatához. A PDB adatbázisban található 230 aminosav hosszú fehérje másodlagos szerkezete, szubsztrátkötő-helyei, doménjei láthatók a 9. ábrán.

Molecular Description		Hide
Classification:	Transferase	
Structure Weight:	76045.35	
Molecule:	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TSI-1	
Polymer:	1	Type: protein Length: 230
Chains:	A, B, C	
EC#:	2.5.1.18	
Organism	Aegilops tauschii	
Gene Name	F775_30353	
UniProtKB:	Protein Feature View Search PDB O04941	

UniProtKB

O04941

Motif

UP Sites

SCOP domains

PDB Sites

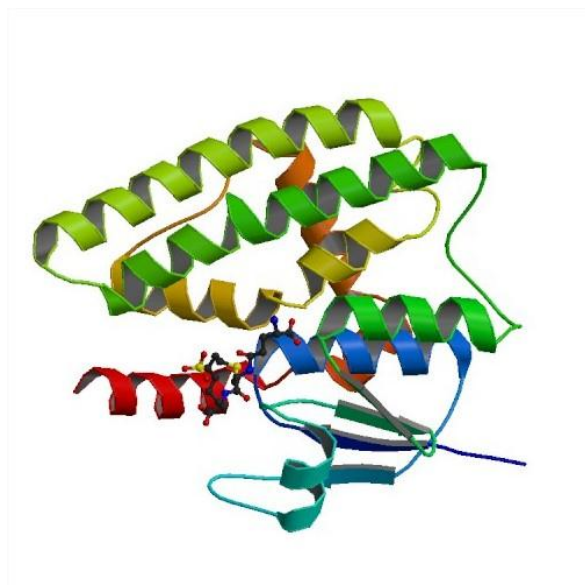
Secstruc

1GWC.C

1GWC.A

1GWC.B

PDB



9. ábra: Glutation-S-transzferáz kristályszerkezetéből adódó információk (<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1GWC>)

2.6. Búzafajok, genomdonorok és vadfajok allergén tulajdonságai

A búza rokon termesztett és vadfajok allergén tulajdonságairól jelenleg kevés ismerettel rendelkezünk. A prolamin szupercsalád monofiletikus eredete következtében az ősi fűféléktől

kezdve minden búzafajban, genomdonorban és vadfajban megtalálhatóak az allergén fehérjék (Mills és mtsai 2004, Gell és mtsai 2014). Simonato és munkatársai (2002) által végzett *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok a *T. turgidum* ssp. *turanicum*, ismertebb nevén kamut, ősi búzafajjal kapcsolatban azt eredményezték, hogy nem mutatható ki szignifikáns különbség allergénitást tekintve a kamut és a kenyérbúza között. Ez a megállapítás nem meglepő, hisz az ősi gabonafélék közeli rokonságban állnak ma termesztett búzafajtáinkkal. Ennek következtében gabonaallergiában szenvedő egyéneknek nem ajánlott a kamut lisztjéből készült termékek fogyasztása sem.

Egy másik vizsgálat szignifikáns különbségeket bizonyít különböző gabonafajok antigenitásában. A világ különböző pontjairól származó 324 búzafajta (*Triticum aestivum*, *Triticum compactum*, *Triticum durum*, *Triticum dicoccum*, *Triticum monococcum*, *Triticum polonicum*, *Triticum spelta*, *Triticum turgidum* különböző fajtái) elemzése néhány genotípusban alacsonyabb allergénitást eredményezett. Ezek a fajták - 'CM32859' (Mexikó) 'Hinkorn' (ismeretlen származás), 'WnJaza' (Ecuador), 'Hsin Mai 2' (Kína) - ELISA alapján a fő allergénekre (gliadin, glutenin és alfa-amiláz inhibitor) jelentős mértékben alacsonyabb választ adtak (Nakamura és mtsai 2005).

2.7. Gabonaallergének azonosítási módszerei

A túlérzékenységi reakciókat kiváltó fehérjekomponensek és főbb tulajdonságaik a klinikai szempontok mellett a kimutatásukra és mennyiségi meghatározásukra szolgáló analitikai módszerek fejlesztésében és a módszerek teljesítményjellemzőinek alakításában is fontos szerepet játszanak (Krska és mtsai 2004). Az allergén fehérjék meghatározására alkalmas módszereknek több követelménynek kell megfelelniük: specifikusnak és érzékenynek; az allergén fehérjék alacsony koncentrációban történő meghatározására alkalmasnak kell lenniük; az allergén fehérjéket feldolgozott állapotban, összetett mátrixban is képesek legyenek kimutatni; gyors, könnyen használható eszközöket igénylők legyenek; illetve a megbízhatóság és költséghatékonyság is fontos elvárás használatuk során. (Besler 2001, Goodwin 2004, Krska és mtsai 2004).

Jelenleg több, alapelveikben különböző, a túlérzékenységi reakciókat kiváltó fehérjék meghatározására alkalmas módszercsoport áll rendelkezésre. A módszerek vagy közvetlenül a problémát okozó fehérje kimutatását célozzák, vagy egy olyan markerét (pl. specifikus fehérje vagy DNS fragmentum), mely jelzi a tüneteket kiváltó fehérjét tartalmazó élelmiszer jelenlétét. A fehérje alapú módszerek általában fehérje gélelektroforézises elválasztást követő

immunoblottot, ELISA-t (Enzyme - Linked Immunosorbent Assay), illetve bioinformatikai elemzéseket foglalják magukba. Rutinmódszerként leginkább az ELISA módszer terjedt el specifikussága, érzékenysége, viszonylagos pontossága, egyszerű kivitelezhetősége és a standardizálás lehetősége miatt. A nukleinsav marker alapú módszerek közül a génspecifikus PCR (polimeráz láncreakció), illetve az allergének mennyiségi meghatározására is alkalmas real time PCR használatos. Azonban a nukleinsav alapú módszerek nem közvetlenül a potenciális allergén hatást mérik, hiszen a valódi allergén komponens fehérje, melynek szerkezetét, allergenicitását a feldolgozási folyamatok is befolyásolják. Ugyanakkor a PCR alapú módszerek alkalmasak lehetnek az allergén fehérjék génjeinek gyors azonosítására, azaz annak megállapítására, hogy az adott allergén megléte az adott genotípusra jellemző-e (Goodwin 2004, Krska és mtsai 2004, Poms és mtsai 2004).

Az allergénanalitika területén is egyre nagyobb teret hódító modern módszertan a proteomika, amely a fehérjék több lépésben történő elválasztásából, majd tömegspektrometriai meghatározásából, végül az adatok bioinformatikai eszközökkel történő értékeléséből épül fel (Sancho és mtsai 2010). A proteomika módszertánán belül az allergén fehérjék meghatározásának legújabb módszere az ún. allergenomikai megközelítés. Az allergenomika több egymást követő módszer ötvözése, melynek célja egy élelmiszer összes allergén fehérjéjének egyidejű meghatározása. Először az allergénforrás összes fehérjéjét oldatba viszik erős nemionos detergenssek és karbamid segítségével, majd a fehérjéket 2D gélelektroforézissel elválasztják. Ezt követően az IgE- aktivitással rendelkező fehérjék detektálása történik betegek vérérumában jelen levő IgE- antitesteket felhasználó immunblott segítségével. Végül az allergén fehérjék azonosítása a fehérjék fragmentálását követő tömegspektrometriai meghatározással történik (Akagawa és mtsai 2007).

Allergének azonosítási módszereinek nem elhanyagolható eszköze a bioinformatika, mely nemcsak számos hasznos alkalmazást nyújt az allergének vizsgálatához, hanem a tradicionális laboratóriumi kísérletek *in silico* megerősítésére is használható. Általános szekvencia elemzések, mint például nukleotid szekvencia illesztések, transzlációk, a fehérjékben peptidmotívumok keresése, fehérjeszekvenciák ismeretlen szakaszainak feltérképezése, az allergénnek vélt gének és fehérjék nukleotid-, illetve fehérje szintű jellemzésére, kategorizálására, laboratóriumi kísérletek megerősítésére alkalmasak. Speciálisabb bioinformatikai eszközök másodlagos-, harmadlagos fehérjeszerkezetek, allergenitás, keresztreakciók, B- és T-sejtes epitópok, IgE-kötő helyek becslésére, jóslására használatosak. Továbbá a bioinformatikai alkalmazások nagy pontosságának köszönhetően

kísérletek megtervezését, potenciális allergénekkal kapcsolatos eredmények gyors és költséghatékony kiértékelését teszik lehetővé (Brusic és mtsai 2003).

Napjainkban számos, eltérő szemponttal és részletességgel rendelkező adatbázis foglalkozik allergén fehérjékkel, azonban csak a Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) allergén adatbázisa (AllergenOnline; www.allergenonline.org) és az Immune Epitope Database (www.iedb.org) rendelkezik nemzetközileg elfogadott, ellenőrzött tartalommal. A szekvencia alapú adatbázisok a vizsgált allergén fehérjének csak az aminosav-, illetve nukleinsav szekvenciáját tartalmazzák (GeneBank - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, SWISS PROT - <http://www.expasy.org/>, Protein Data Bank (PDB) - <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), míg a molekuláris adatbázisok a szekvencián kívül a fehérje szerkezetéről, és az allergén epitóp elhelyezkedéséről is információt adnak (Structural Database of Allergenic Proteins; <http://fermi.utmb.edu/SDAP/>; Allergome: <http://www.allergome.org>) (Gendel 2009).

3. CÉLKITŰZÉSEK

Az élelmiszerekkel szemben jelentkező túlérzékenységi reakciók komoly közegészségügyi és élelmiszerbiztonsági problémát jelentenek. A táplálékallergiában szenvedő betegek száma világszerte, így hazánkban is folyamatosan emelkedik. A gabonafélék okozta rendellenességek a legtöbb esetben csak élethosszig tartó diétával orvosolhatóak. Ennek következtében kiemelten fontos lenne olyan gabonafajták azonosítása, melyek magfehérje-összetétele kedvező a betegek számára is. Diplomamunkám az MTA Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézet Alkalmazott Genomikai Osztály toxikus és allergén gabona magfehérjék vizsgálatával foglalkozó kutatási témájának részét képezi, melynek célja a búza rokon fajok nem-prolamin típusú IgE-mediált allergén fehérjeinek feltérképezése alternatív élelmiszer alapanyagok előállítása céljából.

- Az Alkalmazott Genomikai Osztály nem prolamin típusú allergének vizsgálatával kapcsolatos kísérletsorozata során publikált eredményeket felhasználva kiválasztottunk 8 allergén fehérjét, majd általunk tervezett PCR primerek segítségével elvégeztük kódoló szakaszainak izolálását és jellemzését különböző *Triticum* és *Aegilops* fajokból. A kiválasztott allergének közül a dolgozat az egyik legjelentősebb táplálék- és légúti allergén, a glutation-S-transzferáz filogenetikai vizsgálatával és részletes bioinformatikai elemzésével foglalkozik.
- A dolgozathoz kapcsolódó kísérleteken belül vizsgálni kívántuk a glutation-S-transzferáz génjeinek *Aegilops* és *Triticum* fajok közötti illetve fajon belüli genetikai variabilitását,
- Jellemezni kívántuk a vizsgált allergének aminosav sorrendje ismeretében a prediktált fehérjék szerkezeti tulajdonságait,
- Az aminosav sorrendek alapján vizsgálataink célja a fehérjék különbségeinek kimutatása, potenciális allergén tulajdonságaik jellemzése.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Vizsgált növényanyag

Kísérleteink során a Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézetének génbankjából származó négy *Aegilops* és három *Triticum* faj különböző genotípusaival dolgoztunk (1. táblázat). A magok csíráztatása a MTA ATK MGI Alkalmazott Genomikai Osztályán történt. A 3 napig nedves szűrőpapíron tartott, kicsírázott magvakat Jiffy ültetőkockákba helyeztük. A leveleket 2-3 lombszeves állapotban arattuk.

1. táblázat: Vizsgált növényfajok

Faj	Genotípus
<i>Aegilops umbellulata</i> (UU)	AE740/03, AE714/83, 201001,633, MvGB-637
<i>Aegilops comosa</i> (MM)	TA2760 L, TA2760 Sz, 211001
<i>Aegilops biuncialis</i> (U ^b U ^b M ^b M ^b)	MvGB-382, MvGB-642, AE844/84, TA2661, AE754/90
<i>Aegilops geniculata</i> (U ^g U ^g M ^g M ^g)	AE839/91, AE22/78, AE34/78, AE831/86, AE588/86
<i>Triticum aestivum</i> (AABBDD)	Mv9kr1, Chinese Spring
<i>Triticum spelta</i> (AABBDD)	Spelt 1, Spelt 2
<i>Triticum urartu</i> (A ^u A ^u)	MvGB-589

4.2. Genomi DNS-izolálás

Munkánkat genomi DNS-izolálással kezdtük, melyhez a GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit – et használtuk. A kithez mellékelt protokollt (1. melléklet) az alábbi változtatással alkalmaztuk: a genomi DNS visszaoldásához 30 µl eluáló puffert használtunk. A tökéletesebb visszaoldódás érdekében öt percig szobahőmérsékleten inkubáltuk a csöveket, melyet egy perces, 8000 rpm-es centrifugálás követett. Újabb 20 µl eluáló puffert mértünk az oszlopokra, és két lépcsőben centrifugáltuk: először egy percig 8000 rpm-en, majd egy percig 14000 rpm-en.

4.3. Primerek tervezése allergén fehérjét kódoló régióra

Pahr és munkatársai által 2012-ben közölt cikk alapján több allergiát okozó gént választottunk vizsgálatunk célpontjává, azonban a dolgozatban csak a glutation-S-transzferáz génnel kapcsolatos munka részletes bemutatására kerül sor. Publikus nukleinsav alapú

adatbázisban (NCBI Genbank) található szekvenciák illesztését, majd fehérjére történő fordítását követően azonosítottuk a konzervált szakaszokat, majd a homológ, kódoló régiókra manuálisan terveztünk primereket, melynek részletes információi a 2. táblázatban láthatóak.

2. táblázat: Glutation S-transzferáz gén kódoló régiójára tervezett primerek

Primer	Szekvencia	Tm	Primer-hossz (nt)	GC %	Fragmentum-hossz
F:	5'-ATGGCGGGCGAGAAGGG-3'	61°C	17	70.6	674 bp
R:	5'-CGGCTACTCGATGCCGTACTTCT-3'	60°C	23	56.5	

4.4. DNS amplifikáció PCR módszerrel

A polimeráz láncreakciót Thermo Scientific Phire Hot Start Direct PCR Kit alkalmazásával végeztük Veriti® 96-Well Thermal Cycler készülékben. A PCR Master mix az alábbi összetevőkkel készült (3. táblázat):

3. táblázat: PCR Master mix

DNS (20 ng)		2 µl	
Primer – F (10 µM)		0,5 µl	
Primer – R		0,5 µl	
Puffer (5x)		4 µl	
Enzim (Phire Hot Start II Polymerase + Pfu 40:1)		0,4 µl	
10 mM dNTP		1,4 µl	
MQ		12,2 µl	
Összesen		20 µl	

PCR	1. 1x	2. 35x			3. 1x	
	Inicializáció	Denaturáció	Annealing	Elongáció	Végső elongáció	Tárolás
T	5'	5"	5"	25"	1'	∞
t (°C)	98	98	62	72	72	4

4.5. Agaróz gélelektroforézis

A DNS fragmentumok elválasztására 1.5%-os agaróz gélét készítettünk 1.05 g SeaKem® LE Agarose (Lonza) felhasználásával. Az agarózt 70 ml 1x TAE pufferben oldottuk fel, mely 50x TAE puffer (2. melléklet) hígításával készül. 10 µl PCR-termék és 1.6 µl 6x Loading Dye elegyét vittük fel a gélzsebekbe. A PCR-termékek méretének meghatározásához 10 µl Gene Ruler 100 bp Plus markert használtunk. Horizontális futtatókádban 200 V feszültségen 20 percig futtattuk a mintákat. 10 perc etídium-bromidos festést követően fotót készítettünk AlphaImager™ Gel Imaging System használatával.

4.6. DNS-izolálás agaróz gélből

A kívánt hosszúságú fragmentumok tisztítása agaróz gélelektroforézist követően kereskedelmi forgalomban kapható kittel történt (Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit)(3. melléklet). A DNS eluálásához, a kit útmutatójától eltérően, 30 µl MQ-t használtunk. A tökéletesebb visszaoldódás érdekében két percig szobahőmérsékleten inkubáltuk a csöveket, majd két percig 8000 rpm fordulaton, és fél percig 14000 rpm fordulaton centrifugáltuk. E lépés kivételével a tisztítási folyamat a kit protokollja szerint történt.

4.7. A-tailing

A PCR során alkalmazott enzim blunt end véggel látta el a mintákat, emiatt túlnyúló A-véget kellett kapcsolnunk a termékekhez a sikeres TA-klónozás érdekében. Ennek elvégzéséhez 17 µl gélből izolált terméket, 2 µl 10x Taq puffert, 0.5 µl 100 µM dATP-t és 0.5 µl Taq polimeráz enzimet 72 °C-on 20 percig inkubáltunk.

(<https://wiki.duke.edu/display/rausherlab/A-tailing+of+PCR+products>).

4.8. Klónozás

Ligáláshoz pGEM-T Easy Vector System (Promega) kitet használtunk. A 4. táblázat tartalmazza a ligáláshoz szükséges összetevőket és mennyiségüket:

4. táblázat: Ligálási reakció összetevői

DNS (inszert)	x
pGEM-T Easy Vector	0,5 µl

T4 DNS Ligáz enzim	1 µl
2x T4 DNS Ligáz Puffer	5 µl
MQ	x - 10 µl végtérfogatig
Összesen	10 µl

Az inszert megfelelő mennyiségének meghatározásához a következő képletet vettük alapul:

$$\frac{\text{ng vektor} \times \text{kb inszert}}{\text{kb vektor}} \times 3 = \text{ng inszert}$$

Az elkészült reakcióelegyet egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. A klónozások során E.coli JM109 hőkompetens (Zymo Research) törzset használtunk. Az *Escherichia coli* transzformációkhoz LB (Lauria-Bertani)(4. melléklet) és SOC (5. melléklet) táptalajokat alkalmaztunk.

A kék-fehér szelekcióval (Langley és mtsai, 1975) kiválogatott, inszertet tartalmazó baktériumtelepekről folyékony kultúrát indítottunk négy ismétlésben, 4 ml folyékony 100 mg/ml koncentrációjú ampicillint tartalmazó LB-táptalajban, melyet egy éjszakán keresztül 37 °C-on, 200 rpm rázatással inkubáltunk.

A baktériumokból a plazmid DNS izolálása kereskedelmi forgalomban kapható kittel történt (Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit)(6. melléklet), a mellékelt protokolltól annyi eltéréssel, hogy a DNS-t 30 µl MQ-ban eluáltuk.

A pGEM-T Easy vektorból a specifikus klónozóhelyének köszönhetően az inszert kivágása egy enzimmel megvalósítható, ezt felhasználva NotI enzimmel végeztük el a restrikciós emésztést, melynek összetevői az 5. táblázatban láthatóak.

5. táblázat: Restrikciós emésztés

10 x Orange puffer	1 µl
Not I enzim	0,25 µl
MQ	7,75 µl
DNS	1 µl
Összesen	10 µl

Az emésztés végbemeneteléhez 1 óra 37°C-os inkubáció szükséges. A kapott fragmentek ellenőrzésére agaróz gélelektroforézist használtunk.

4.9. Szekvenálás

A kapott DNS-minták nukleotidsorrendjének meghatározásához külső szolgáltatást vettünk igénybe. A szekvenálás genotípusonként 3-3 ismétlésben történt forward és reverse irányban egyaránt, M13 szekvenáló primer (M13 for: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'; M13 rev: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') segítségével.

4.10. Bioinformatikai elemzések

4.10.1. Nukleinsav-szekvenciák elemzése

A szekvenálás eredményeként kapott kromatogramokat ellenőriztük, az esetleges szekvenálási hibákat korrigáltuk. CLC Genomics Workbench 3.6.5 program alkalmazásával szekvenciaillesztéseket végeztünk, majd a genotípusonként elvégzett ismétlésekből konszenzus szekvenciát határoztunk meg az egyes fajok, genotípusok közti különbségek feltárása céljából DNS alapú filogenetikai elemzéseket hajtottunk végre UPGMA algoritmus Bootstrap = 100 Replicates beállítások mellett.

4.10.2. Fehérjeszekvenciák elemzése

A szekvenciákat mind a hat leolvasási kerettel fordítottuk, majd az ismert Uniprot adatbázisból letöltött glutation-S-transzferáz fehérjeszekvenciákkal összehasonlítva kiválasztottuk a helyes leolvasási keretet. A transzlált szekvenciák illesztését követően másodlagos szerkezeti vizsgálatokat végeztünk az aminosav-összetételben lévő esetleges eltérések hatására bekövetkező szerkezeti változások feltárása céljából.

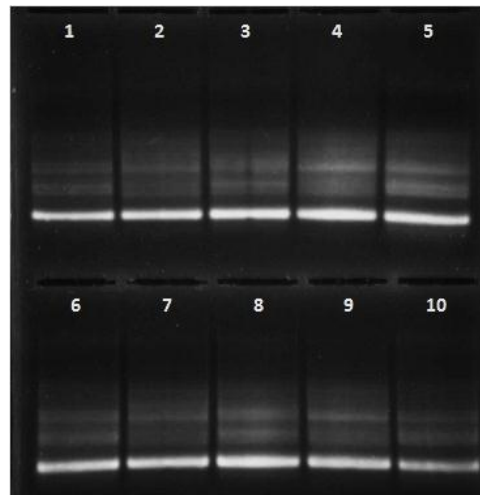
4.10.3. Epitóp elemzések

A fehérje szerkezeti elemzések következő lépéseként lineáris epitóp-vizsgálatokat végeztünk az Immune Epitope Database (IEDB; www.iedb.org) alkalmazásával. Az adatbázisban található algoritmusok alkalmazásával kapott eredmények összevetését követően a további vizsgálatokban a Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity algoritmust vettük alapul, mert a többi algoritmussal ellentétben ez a polipeptid lánc felszínét, polaritását, és antigenitását komplexen vizsgáló algoritmus. Az így prediktált epitópokat az emésztőrendszerben jelenlévő enzimeknek (pepszin, tripszin, kimotripszin) megfelelő *in silico* emésztésnek vetettük alá (PeptideCutter-ExPASy). A szerkezeti epitópok azonosításához az IEDB DiscoTope 2.0 (Kringelum és mtsai 2012) alkalmazását használtuk.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

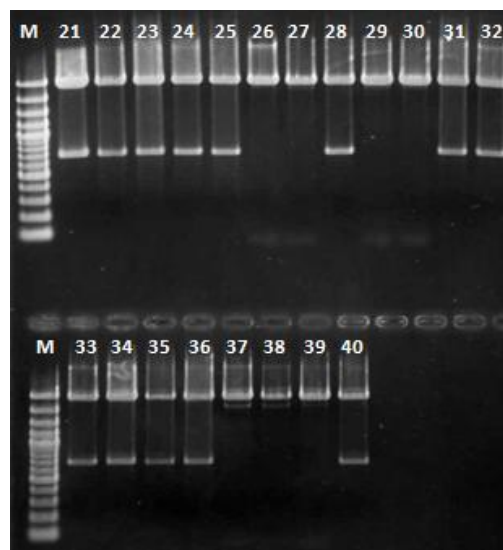
5.1. Szekvenáláshoz szükséges DNS kivonása

A PCR-reakció során felszaporított DNS-mintákat agaróz gélből (10. ábra) izoláltuk a további munkafolyamatokhoz.



10. ábra: 1% agaróz gél, 100 ul minta: 1. *Aegilops geniculata* AE839/91, 2. *Aegilops umbellulata* AE740/03, 3. *Aegilops biuncialis* MvGB-382, 5. *Aegilops comosa* TA2760 L, 6. *Triticum aestivum* 'Chinese Spring', 7. *Triticum aestivum* 'Mv9kr1', 8. *Triticum urartu* MvGB589, 9. *Triticum spelta* 'Spelt 1', 10. *Triticum spelta* 'Spelt 2

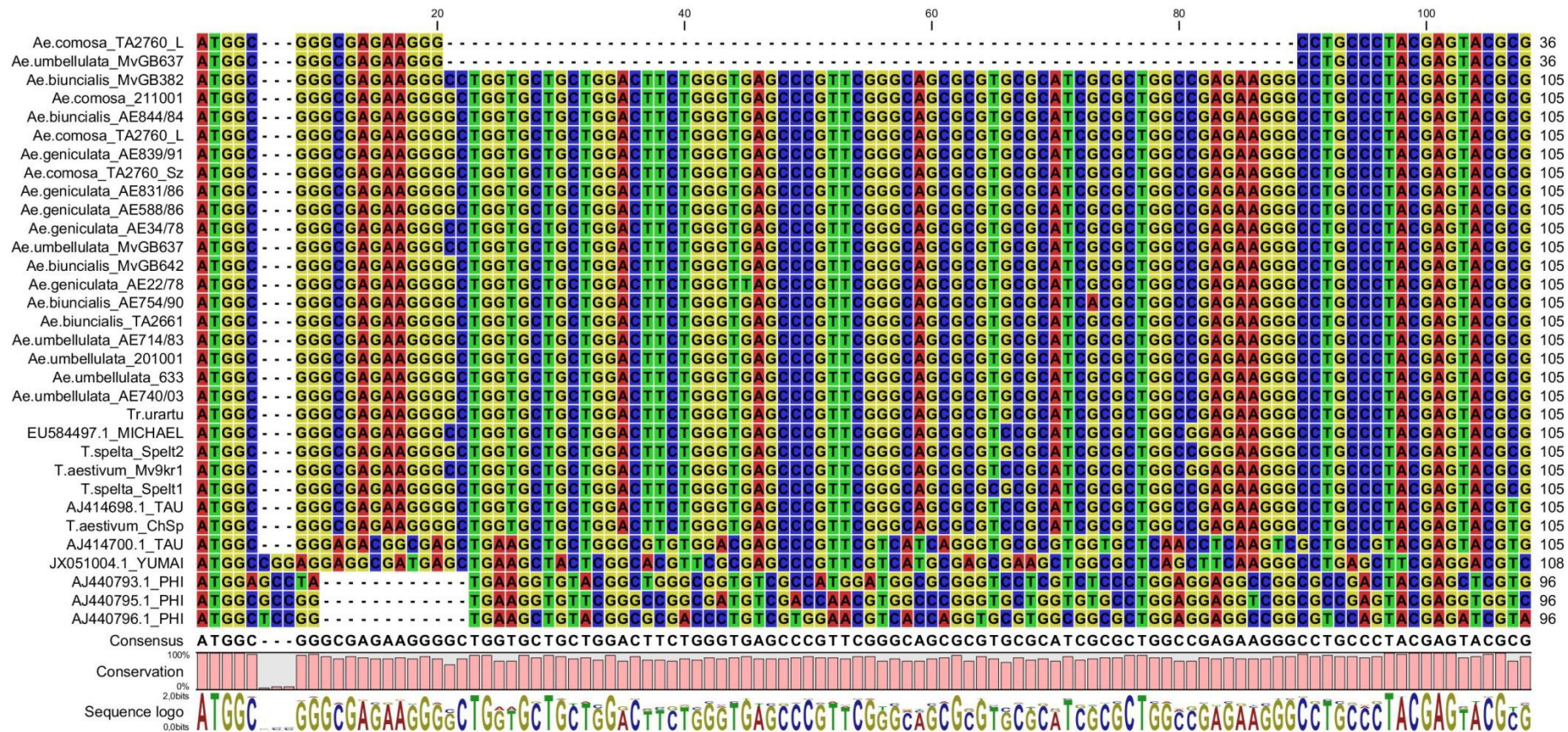
A transzformált baktériumokat négy ismételtsben oltottuk át folyékony táptalajra, majd a restrikciós emésztés eredménye (11. ábra) alapján választottuk ki a szekvenálásra érdemes mintákat.



11. ábra: A vizsgálatainkba bevont genotípusok restrikciós emésztése NotI enzimmal

5.2. Nukleinsav-szekvenciák elemzése

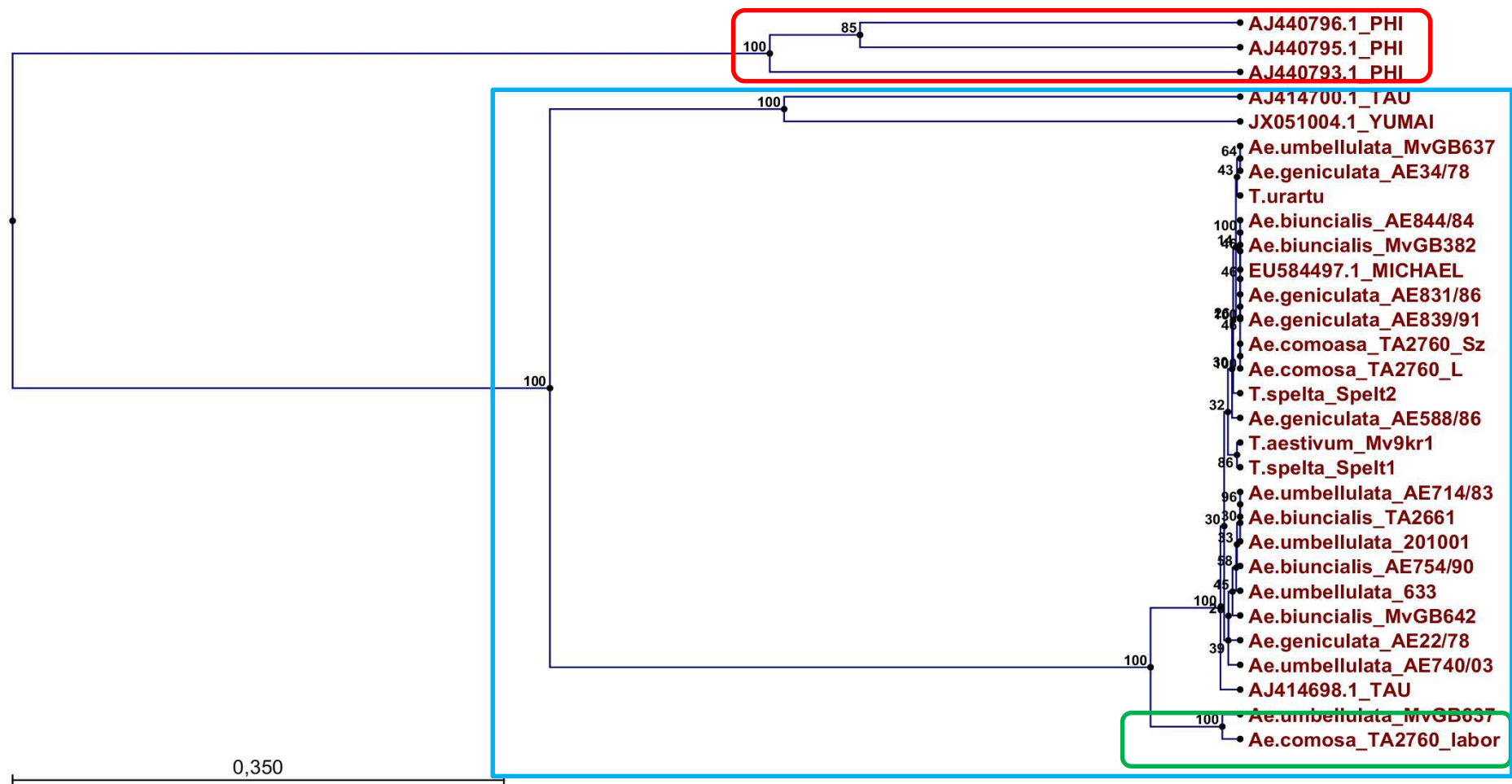
A genotípusonként elvégzett ismétlésekből konszenzus szekvenciákat határoztunk meg, melyeket a CLC Genomic Workbench Clustal alignment eszközével illesztettünk egymáshoz. Az összes genotípust magába foglaló nukleinsavillesztés során mind a vizsgált *Aegilops*, mind a *Triticum* fajok esetében többféle szekvencia variációt azonosítottunk. A *Triticum* genotípusok szekvenciái egyértelműen elkülöníthetőek voltak az *Aegilops* genotípusok szekvenciáiról. A leglényegesebb különbségként két deléciós mutánst azonosítottunk az *Aegilops comosa* TA2760, *Aegilops umbellulata* MvGB637 genotípusokban. A 69 nukleotid hosszú nukleinsav-kiesés mindkét szekvenciában a 21-89. nukleotid pozícióban található (12. ábra). A deléciós mutánsokon felül további variánsokat találtunk. Az ismétlő szekvenálások során valószínűsíthető, hogy e genotípusok két allélváltozata (normál és deléciós) van jelen e genomokban.



12. ábra: A vizsgált genotípusok nukleinsav alapú szekvencia illesztése. 69 bázispár hosszú deléció található az *Ae. comosa* TA2760 és az *Ae. umbellulata* MvGB637 típusokban

További DNS-alapú elemzéshez filogenetikai fát készítettünk, mely alapján egyértelműen elkülöníthetők a glutation-S-transzferáz phi és tau formái. Az általunk vizsgált *Aegilops* és *Triticum* fajok mind a tau típushoz tartoznak, és nagymértékű hasonlóságot mutatnak a referenciaszekvenciával (EU584497.1 *T. aestivum* cv. Michael); néhány, adatbázisbázisból származó szekvencia sorolható a phi csoportba, melyek nukleinsav szintű eltérései az illesztések során is egyértelműen kimutathatóak. A két deléciós genotípus a genomszerkezetüknek megfelelően külön ágon láthatóak (13. ábra).

A rokonság megállapítására, a különböző típusok elkülönítésére a törzsfán kívül genetikai távolság mátrix készítése is alkalmas. Ennek az eredményét mutatja a 14. ábra, mely egy további bizonyítékul szolgál a deléciós mutánsok, illetve a phi és tau típusok elkülönítésére. A 24-25-ös számú szekvencia a két deléciós mutánst jelöli, míg a 28-30-as számúak a phi típusokat képviselik.



13. ábra: A vizsgált genotípusok nukleinsav alapú filogenetikai elemzése UPGMA algoritmus alkalmazásával. A törzsfa alapján a glutation-S-transzferáz gén három csoportra különül el, a piros keret a phi típusokat, a kék keret a tau típusokat, míg a zöld keret a deléciós mutánsokat jelöli.

		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	
Ae.biuncialis_MvGB382	1		100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	99,55	99,55	99,10	99,10	98,65	98,65	98,65	98,20	98,20	99,10	97,75	97,30	97,30	97,75	98,20	98,65	89,64	87,39	37,39	41,25	21,99	21,67	18,91	
Ae.biuncialis_AE844/84	2	100,00		100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	99,55	99,55	99,10	99,10	98,65	98,65	98,65	98,20	98,20	99,10	97,75	97,30	97,30	97,75	98,20	98,65	89,64	87,39	37,39	41,25	21,99	21,67	18,91	
Ae.geniculata_AE839/91	3	100,00	100,00		100,00	100,00	100,00	100,00	99,55	99,55	99,10	99,10	98,65	98,65	98,65	98,20	98,20	99,10	97,75	97,30	97,30	97,75	98,20	98,65	89,64	87,39	37,39	41,25	21,99	21,67	18,91	
Ae.geniculata_AE831/86	4	100,00	100,00	100,00		100,00	100,00	100,00	99,55	99,55	99,10	99,10	98,65	98,65	98,65	98,20	98,20	99,10	97,75	97,30	97,30	97,75	98,20	98,65	89,64	87,39	37,39	41,25	21,99	21,67	18,91	
Ae.comosa_TA2760_L	5	100,00	100,00	100,00	100,00		100,00	100,00	99,55	99,55	99,10	99,10	98,65	98,65	98,65	98,20	98,20	99,10	97,75	97,30	97,30	97,75	98,20	98,65	89,64	87,39	37,39	41,25	21,99	21,67	18,91	
Ae.comosa_TA2760_Sz	6	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00		100,00	99,55	99,55	99,10	99,10	98,65	98,65	98,65	98,20	98,20	99,10	97,75	97,30	97,30	97,75	98,20	98,65	89,64	87,39	37,39	41,25	21,99	21,67	18,91	
EU584497_1_MICHAEL	7	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00		99,55	99,55	99,10	99,10	98,65	98,65	98,65	98,20	98,20	99,10	97,75	97,30	97,30	97,75	98,20	98,65	89,64	87,39	37,39	41,25	21,99	21,67	18,91	
Ae.geniculata_AE34/78	8	99,55	99,55	99,55	99,55	99,55	99,55	99,55		100,00	98,65	99,55	98,20	98,20	98,20	98,20	97,75	97,75	98,65	98,20	96,85	96,85	98,20	97,75	98,20	89,19	86,94	37,82	41,67	21,99	21,67	18,91
Ae.umbellulata_MvGB637	9	99,55	99,55	99,55	99,55	99,55	99,55	99,55	100,00		98,65	99,55	98,20	98,20	98,20	97,75	97,75	98,65	98,20	96,85	96,85	98,20	97,75	98,20	89,19	86,94	37,82	41,67	21,99	21,67	18,91	
Ae.geniculata_AE588/86	10	99,10	99,10	99,10	99,10	99,10	99,10	99,10	98,65	98,65		98,20	97,75	97,75	97,75	97,30	97,30	98,20	96,85	96,40	96,40	96,85	97,30	97,75	88,74	86,49	37,39	41,67	21,99	21,67	18,91	
T.urartu	11	99,10	99,10	99,10	99,10	99,10	99,10	99,10	99,55	99,55	98,20		97,75	97,75	97,75	97,30	97,30	99,10	97,75	96,40	96,40	97,75	98,20	98,65	88,74	86,49	37,39	41,25	21,99	21,67	18,91	
Ae.biuncialis_TA2661	12	98,65	98,65	98,65	98,65	98,65	98,65	98,65	98,20	98,20	97,75	97,75		100,00	100,00	99,55	99,55	97,75	99,10	98,65	98,65	97,30	97,75	98,20	88,29	88,74	36,97	40,83	21,58	21,25	18,49	
Ae.umbellulata_AE714/83	13	98,65	98,65	98,65	98,65	98,65	98,65	98,65	98,20	98,20	97,75	97,75	100,00		100,00	99,55	99,55	97,75	99,10	98,65	98,65	97,30	97,75	98,20	88,29	88,74	36,97	40,83	21,58	21,25	18,49	
Ae.umbellulata_201001	14	98,65	98,65	98,65	98,65	98,65	98,65	98,65	98,20	98,20	97,75	97,75	100,00	100,00		99,55	99,55	97,75	99,10	98,65	98,65	97,30	97,75	98,20	88,29	88,74	36,97	40,83	21,58	21,25	18,49	
Ae.biuncialis_AE754/90	15	98,20	98,20	98,20	98,20	98,20	98,20	98,20	97,75	97,75	97,30	97,30	99,55	99,55	99,55		99,10	97,30	98,65	98,20	98,20	96,85	97,30	97,75	88,29	88,74	36,55	40,83	21,58	21,25	18,07	
Ae.umbellulata_633	16	98,20	98,20	98,20	98,20	98,20	98,20	98,20	97,75	97,75	97,30	97,30	99,55	99,55	99,55	99,10		97,30	98,65	98,20	98,20	96,85	97,30	97,75	87,84	88,29	36,97	40,83	21,58	21,25	18,49	
T.spelta_Spelt2	17	99,10	99,10	99,10	99,10	99,10	99,10	99,10	98,65	98,65	98,20	99,10	97,75	97,75	97,75	97,30	97,30		96,85	96,40	96,40	96,85	98,20	98,65	89,19	86,94	36,97	40,83	21,58	21,25	18,49	
Ae.biuncialis_MvGB642	18	97,75	97,75	97,75	97,75	97,75	97,75	97,75	98,20	98,20	96,85	97,75	99,10	99,10	99,10	98,65	98,65	96,85		97,75	97,75	97,30	96,85	97,30	87,39	87,84	36,97	40,83	21,58	21,25	18,49	
Ae.geniculata_AE22/78	19	97,30	97,30	97,30	97,30	97,30	97,30	97,30	96,85	96,85	96,40	96,40	98,65	98,65	98,65	98,20	96,40	97,75		98,20	95,95	96,40	96,85	86,94	88,29	37,39	41,67	21,16	21,67	18,49		
Ae.umbellulata_AE740/03	20	97,30	97,30	97,30	97,30	97,30	97,30	97,30	96,85	96,85	96,40	96,40	98,65	98,65	98,65	98,20	96,40	97,75	98,20		95,95	96,40	96,85	86,94	87,39	37,39	41,25	21,16	21,67	18,91		
AJ414698_1_TAU	21	97,75	97,75	97,75	97,75	97,75	97,75	97,75	98,20	98,20	96,85	97,75	97,30	97,30	97,30	96,85	96,85	96,85	97,30	95,95	95,95		95,95	96,40	87,39	86,04	38,24	41,67	21,99	21,67	19,75	
T.spelta_Spelt1	22	98,20	98,20	98,20	98,20	98,20	98,20	98,20	97,75	97,75	97,30	98,20	97,75	97,75	97,75	97,30	97,30	98,20	96,85	96,40	96,40	95,95		99,55	88,29	86,94	37,39	40,42	21,16	20,83	18,49	
T.aestivum_Mv9kr1	23	98,65	98,65	98,65	98,65	98,65	98,65	98,65	98,20	98,20	97,75	98,65	98,20	98,20	98,20	97,75	97,75	98,65	97,30	96,85	96,85	96,40	99,55		88,29	86,94	36,97	40,83	21,58	21,25	18,49	
Ae.comosa_TA2760_labor	24	89,64	89,64	89,64	89,64	89,64	89,64	89,64	89,19	89,19	88,74	88,74	88,29	88,29	88,29	88,29	87,84	89,19	87,39	86,94	86,94	87,39	88,29	88,29	97,49	32,77	36,25	19,58	18,41	16,03		
Ae.umbellulata_MvGB637	25	87,39	87,39	87,39	87,39	87,39	87,39	87,39	86,94	86,94	86,49	86,49	88,74	88,74	88,74	88,74	88,29	86,94	87,84	88,29	87,39	86,04	86,94	86,94	97,49	31,93	35,83	18,75	17,99	15,19		
JX051004_1_YUMAI	26	37,39	37,39	37,39	37,39	37,39	37,39	37,39	37,82	37,82	37,39	37,39	36,97	36,97	36,97	36,55	36,97	36,97	36,97	37,39	37,39	38,24	37,39	36,97	32,77	31,93		52,94	18,65	15,48	17,53	
AJ414700_1_TAU	27	41,25	41,25	41,25	41,25	41,25	41,25	41,25	41,67	41,67	41,67	41,25	40,83	40,83	40,83	40,83	40,83	40,83	40,83	41,67	41,25	41,67	40,42	40,83	36,25	35,83	52,94		18,88	16,73	16,53	
AJ440795_1_PHI	28	21,99	21,99	21,99	21,99	21,99	21,99	21,99	21,99	21,99	21,99	21,99	21,58	21,58	21,58	21,58	21,58	21,58	21,58	21,16	21,16	21,99	21,16	21,58	19,58	18,75	18,65	18,88		54,67	58,72	
AJ440793_1_PHI	29	21,67	21,67	21,67	21,67	21,67	21,67	21,67	21,67	21,67	21,67	21,67	21,25	21,25	21,25	21,25	21,25	21,25	21,25	21,67	21,67	21,67	20,83	21,25	18,41	17,99	15,48	16,73	54,67		49,33	
AJ440796_1_PHI	30	18,91	18,91	18,91	18,91	18,91	18,91	18,91	18,91	18,91	18,91	18,91	18,49	18,49	18,49	18,49	18,07	18,49	18,49	18,49	18,49	18,91	19,75	18,49	18,49	16,03	15,19	17,53	16,53	58,72	49,33	

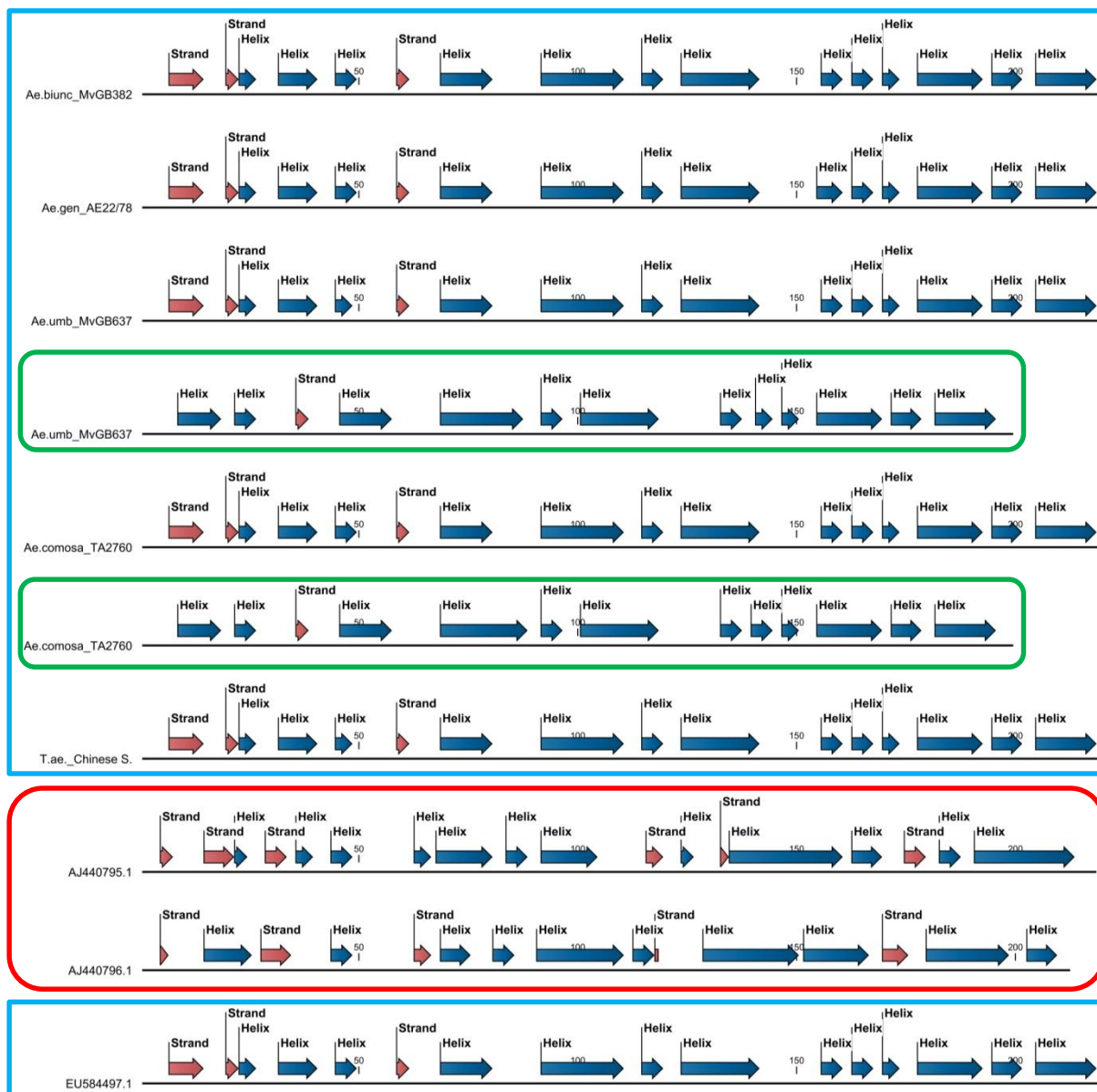
14. ábra: A vizsgált gének genetikai távolság mátrixa. A mátrix jobb felső régiója a genetikai távolságot jelöli, az alsó régiója pedig a gének közötti százalékos egyezést. (Az evolúciós analízis maximum likelihood modell alapján készült)

5.3. Fehérje alapú elemzések

A transzlált szekvenciák illesztése során a mintáink egy részének 50. aminosavánál szerin – alanin, a 66. pozícióban prolin – alanin, a 133-as és 151-es pozícióban aszparaginsav – glutaminsav, a 152-es pozícióban treonin – lizin, a 210-es pozícióban pedig aszparaginsav – glicin változást észleltünk.

Jelentősebb különbség a deléciós mutánsokból hiányzó szerin (18) katalitikus hely, mely a glutation megkötésében játszik szerepet. Hiába képes ugyanis az enzim a szubsztrát megkötésére, átalakítani már nem tudja, ennek következtében nagy valószínűséggel működésképtelen lesz (15. ábra). A szerin (17)-szerin (18)-cisztein (19) triád a glutation-S-transzferáz enzim konzervált katalitikus helye. Dixon és Edwards (2010) *Arabidopsis* növényen mutagenézis kísérleteket végeztek, melynek eredményeként kiderült, hogy ha a katalitikus domén cisztein (19)-es pozíciója hiányzik, vagy más aminosavra cserélik a katalízis végbemegy. A 17-18-as pozícióban lévő szerin cseréje vagy hiánya azonban az enzim működésképtelenné válásához vezet (Dixon és Edwards 2010).

A fehérjék másodlagos szerkezetében nem tapasztalható változás az aminosav-összetételben lévő eltérések hatására. Ellenben a két deléciós mutáns másodlagos szerkezete eltérő a többi genotípusétól, mert a 8-30. szekvenciaszakasz (VLLDFWVSPFPGQVRVIALAEKGL) hiányzik, ennek következtében túlnyomórészt csak alfa-hélix másodlagos szerkezeti egységek találhatók bennük (16. ábra).



16. ábra: A vizsgált glutation-S-transzferáz enzimek másodlagos szerkezet predikciója. A fehérje aminoterminális részén bekövetkezett deléció következtében hiányzik a többi enzimben meglévő jellegzetes béta-redő szerkezet. A prediktált másodlagos szerkezet alapján is jól elkülöníthető az enzim három különböző csoportja. (piros keret: phi típusok, kék keret: tau típusok, zöld keret: deléciós genotípusok)

5.4. Epitóp elemzések

B-sejtes fehérjeszekvencia alapú lineáris epitóp jósláshoz az IEDB B-cell epitope analysis tool Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity alkalmazás (<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>) eredményeként kapott epitóplistából kiválogattuk az antigenitási hajlam határértéke feletti (Threshold = 1) epitópokat (6. táblázat). A kapott potenális epitópokat a CLC Motif search algoritmus segítségével illesztettük a saját izolátumainkból fordított, illetve a publikus fehérje szekvenciákra. A kapott eredmények alapján (17/A ábra) az egyes fajok közt nem találtunk számottevő különbséget epitóptartalmat illetően. Az *Ae. umbellulata* fajnál találtunk a legnagyobb változatosságot, a legtöbb azonosított epitóp 11 (*Ae. umbellulata* MvGB637, AE714/83, 201001), a legkevesebb 6 db (*Ae. umbellulata* MvGB637 deléciós mutáns) volt. A vizsgált fajok összességére jellemző a LKGEPQAQAR prediktált allergén peptid jelenléte. Meglepő módon a phi típusok e módszer alapján nem tartalmaznak prediktált allergén peptideket.

6. táblázat: Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity alkalmazás eredményeként kapott, antigenitási hajlam határértéke feletti (Threshold = 1) epitópok

Peptid szekvencia
LKGEPQAQAR
KGLVLLDFWVSPFGQVRVIALAEGK
RANPVHKKIPVLLHDG
NESLIILQYLEDA
PDAPALLPSDPYARAQ
WADYVDKKVYDCGSRLW
LDILKTLDGA
FGFVDAAFAPFTAWFH
LPEVAPKIAAWAK
VAKSLYSPDKVYDFIGLLKKK
GLPYEYAE
DAFPDAPALLPSDPYARA

[illegible][illegible]

17. ábra/A: A vizsgált glutation-S-transzferáz enzimek Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity alkalmazás referenciagenom alapján készült epitóplistája.

B: A vizsgált glutation-S-transzferáz enzimek Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity alkalmazás *in silico* emésztést követő epitóplista (pepszin, tripszin, kimotripszin) Az ábrán jól látható, hogy a prolamin típusú allergén fehérjékhez képest a nem-prolamin típusú fehérjék emészthetősége sokkal jobb, azonban még így is tartalmaznak immunreaktív peptidszakaszokat.

A táplálékallergia az emésztőrendszerben lebontatlanul maradt komponensek következtében jelentkezik. Ennek vizsgálatára a prediktált epitópokat az emésztőrendszerben jelenlévő enzimeknek (pepszin, tripszin, kimotripszin) megfelelően az Expasy Peptide cutter algoritmust használva *in silico* emésztésnek vetettük alá, majd kiválogattuk a hat aminosavnál hosszabb epitópokat (17/B ábra). Az így kapott öt epitóp a 7. táblázatban látható szekvenciákkal rendelkezett.

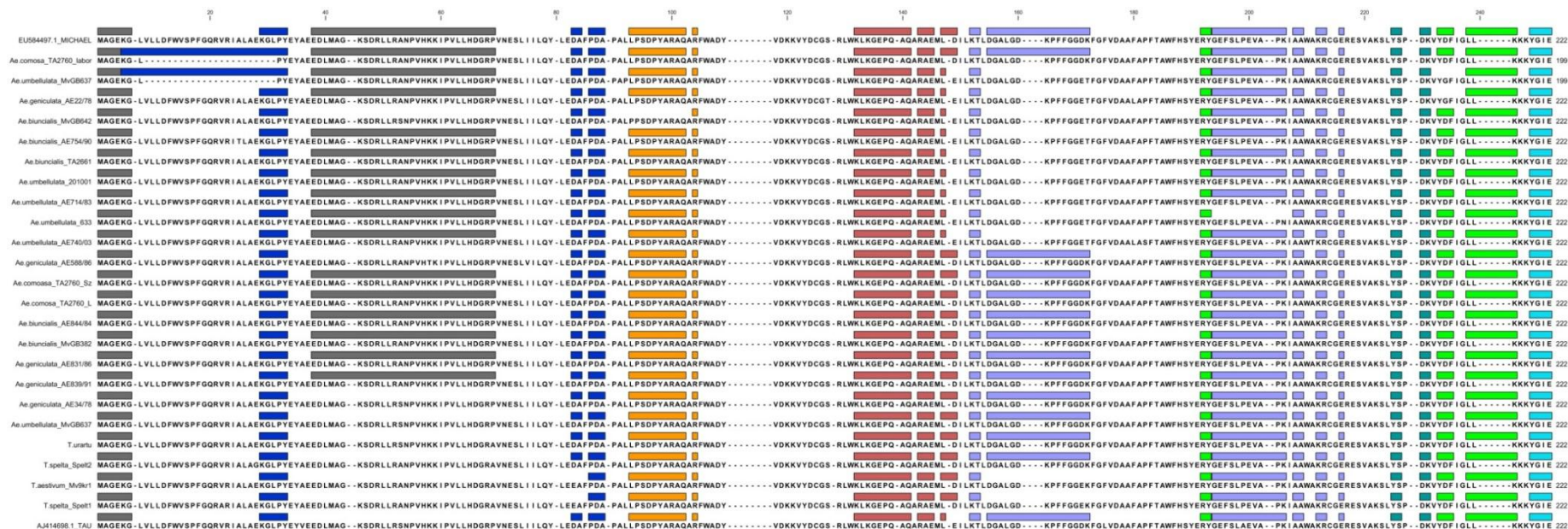
7. táblázat: A referenciaszekvencia glutation-S-transzferáz enzim *in silico* emésztését követő, legtöbb találatot mutató prediktált epitópok szekvenciája

Peptid szekvencia
GEPQAQAR
LKGEPQAQAR
PEVAPKI
LPEVAPK
LPEVAPKIAAWAK

A lineáris epitópok mellett meghatározhatóak egy fehérje szerkezeti epitópjai is, amennyiben ismert a harmadlagos szerkezete. Az *Aegilops tauschii* glutation-S-transzferáz fehérje kristályszerkezetét (1GWC) felhasználva lehetőségünk van ezeknek az epitópoknak a vizsgálatára is. A 8. táblázat, és a 18. ábra a PDB adatbázis ElliPro alkalmazás felhasználásával készült.

8. táblázat: Szerkezeti építópokat alkotó aminosavak ElliPro alkalmazás, EU584497.1 *T.aestivum* cv. Michael referenciaszekvencia alapján

Sorszám	Építópót alkotó aminosavak	Aminosavak száma
1	_:M1, _:A2, _:G3, _:E4, _:K5, _:G6, _:E37, _:D38, _:L39, _:M40, _:A41, _:G42, _:K43, _:S44, _:D45, _:R46, _:L47, _:L48, _:R49, _:A50, _:N51, _:P52, _:V53, _:H54, _:K55, _:K56, _:L61, _:H62, _:D63, _:G64, _:R65, _:P66	32
2	_:K28, _:G29, _:L30, _:P31, _:Y32, _:D79, _:A80, _:P82, _:D83, _:A84,	10
3	_:L88, _:P89, _:S90, _:D91, _:P92, _:Y93, _:A94, _:R95, _:A96, _:Q97, _:R99	11
4	_:K118, _:L119, _:K120, _:G121, _:E122, _:P123, _:Q124, _:A125, _:Q126, _:R128, _:A129, _:E130, _:L132, _:D133	14
5	_:K136, _:T137, _:D139, _:G140, _:A141, _:L142, _:G143, _:D144, _:K145, _:P146, _:F147, _:F148, _:G149, _:G150, _:D151, _:K152, _:G174, _:E175, _:F176, _:S177, _:L178, _:P179, _:E180, _:V181, _:A182, _:P183, _:K184, _:A186, _:A187, _:K190, _:R191, _:E194	32
6	_:R172, _:Y173, _:Y209, _:D210, _:F211, _:L214, _:L215, _:K216	8
7	_:Y203, _:S204, _:D206, _:K207	4
8	_:Y219, _:G220, _:I221, _:E222	4



18. ábra: Prediktált szerkezeti epitópok. A színekódok a 8. táblázatban feltüntetett epitópokat jelölik. A delécio következtében az MAGEKG kezdetű és KGLPY kezdetű epitópok egymással átfedő epitópot képeznek. Mint ahogy a fehérje alapú illesztésnél is látható volt, a pontmutációk okozta 1-1 aminosavcsere bizonyos genotípusokban a szerkezeti epitópokban is változást okozott.

A kapott eredmények azt mutatják, hogy a két mutáns genotípusban jelen lévő deléció, illetve az 50., 66., 133., 151., 152., 210. pozíciókban bekövetkező aminosavcserék nemcsak a lineáris epitópok, hanem a szerkezeti epitópokban is változásokat okoznak. Az IEDB adatbázis ElliPro alkalmazása segítségével prediktált nyolc szerkezeti epitóp közül kettő (7., 8. sorszámú) az összes vizsgált genotípusban jelen van. Az egyes genotípusok közül az *Ae.umbellulata* MvGB637 deléciós változata tartalmazza a legkevesebb szerkezeti epitópot, továbbá jelentősen kevesebb a *T.spelta* Spelt1 genotípus epitóptartalma.

5.5. Eredmények összesítése

A vizsgált *Aegilops* és *Triticum* genotípusok izolált és fordított glutation-S-transzferáz szekvenciáiban az alábbi lényeges különbségeket találtunk: az általunk vizsgált 7 fajban tau típusú, míg adatbázisból származó néhány fajban phi típusú glutation-S-transzferázt azonosítottunk. *Ae. comosa* és *Ae. umbellulata* genotípusok egy-egy glutation-S-transzferáz variánsában a 8-30. aminosavak között deléció található.

Az elvégzett lineáris és szerkezeti epitóp predikációs módszerek alapján arra a megállapításra jutottunk, hogy a kiemelt pozíciókban (50., 66., 133., 151., 152., 210.) bekövetkező aminosavcserék egyike sem okoz különbséget a másodlagos és harmadlagos fehérjeszerkezetben, azonban az 50., 133., 210. pozíciójú aminosavak kicserélődése az itt elhelyezkedő lineáris epitópok megszűnését okozzák.

Az *Ae. comosa* és *Ae. umbellulata* fajokban azonosított deléciós szekvenciák (ahol a 8. és a 30. aminosavak közötti régió hiányzik) - a többi fehérje esetén itt található β -redő másodlagos szerkezeti egységek hiányának következtében – harmadlagos fehérje szerkezete feltételezhetően változik, így a potenciális szerkezeti epitópok számában is változás figyelhető meg.

Ezen kívül az *Ae. comosa* és *Ae. umbellulata* genotípusaiban azonosított két deléciós mutánsból hiányzik a szerin (18) aminosav, mely a valin (17)-szerin (18)-prolin (19) konzervált katalitikus hely kulcsfontosságú tagja. Az enzim szubsztrátkötő katalitikus helye a deléció következtében elveszik, ezáltal az enzim működésképtelenné válik.

Kutatásaink további eredményét képezi, hogy a 7 fajból izolált egyik deléciós mutánsban, illetve a phi típusokban jóval kevesebb, vagy egyáltalán nem található emészthetetlen epitópot tartalmazó allergén peptid.

6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

- Kutatásaink során arra a következtetésre jutottunk, hogy a vizsgált hét faj között számottevő különbség nem tapasztalható.
- Mindössze két fajt kell kiemelnünk szerkezetükben rejlő eltéréseik miatt: *Aegilops comosa* TA2760, *Aegilops umbellulata* MvGB63. E genotípusok a 21-89. nukleotid pozícióban, mely aminosavszinten 6-28. pozíciónak felel meg, deléciót tartalmaznak. Ez a mutáció feltételezhetően hatással van az enzim működőképességére, továbbá a fehérje allergén aktivitására is.
- B-sejtes fehérjeszekvencia alapú lineáris epitóp jósláshoz használt Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity alkalmazással számos potenciális allergén peptidet találtunk. További szűrések, *in silico* enzim emésztés után a következő öt epitópot kaptuk: GEPQAQAR, LKGEPQAQAR, PEVAPKI, LPEVAPK, LPEVAPKIAAWAK.
- A szekvenciákban bekövetkező 50., 133., 210. pozíciójú aminosavcserék a talált lineáris epitópokban helyezkednek el, ennek következtében az epitópok változását, funkcióvesztését okozzák.
- Az azonosított glutation-S-transzferáz allergén epitópok további vizsgálatához fehérje alapú laboratóriumi kísérletek elvégzésére van szükség. Terveink között szerepel többek között 2D gélelektroforézis segítségével történő fehérjeelválasztás. Ezt követően az IgE-aktivitással rendelkező fehérjék detektálása búzaallergiás betegek vérérszérumát felhasználó immunblott segítségével, majd az allergén fehérjék azonosítása a fehérjék fragmentálását követő tömegspektrometriai meghatározással. Szándékunkban áll továbbá ELISA elvégzése is.
- A glutation-S-transzferáz jövőbeli vizsgálatain kívül további nem-prolamin allergének (cys-peroxiredoxin, dehydrin, expansin, stb.) illetve prolamin (raktározó magfehérjék, nem-specifikus lipidtranszfer protein, alfa-amiláz/tripszin inhibitor, stb.) típusú fehérjék és kódoló géneik részletes vizsgálatával is szeretnénk foglalkozni.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A búza rokon termesztett és vad fajok nemesítési alapanyagul szolgálhatnak alacsony allergén tartalmú genotípusok előállításához. E fajok allergén tulajdonságairól azonban jelenleg kevés ismerettel rendelkezünk.

Diplomamunkám az MTA ATK MGI Alkalmazott Genomikai Osztály búzaallergiát kiváltó gének azonosításával foglalkozó kutatási témájának részét képezi, melynek célja a búza rokon fajok nem-prolamin jellegű, IgE-mediált allergén fehérjeinek feltérképezése alternatív élelmiszer alapanyagok előállítása céljából.

Munkánk során a glutation-S-transzferáz allergén részletes vizsgálatával foglalkoztunk. Ez a fehérje a thio-redoxin-szerű fehérjék csoportjába tartozik, a fehérjecsalád struktúra alapján 13 osztályba rendszerezhető, melyek közül a tau és a phi kategória csak növényekben fordul elő. A glutation-S-transzferáz szerepet játszik a gabona által kiváltott élelmiszerallergia, és a különböző légúti allergiaformák (asztma, pékaszma) kiváltásában egyaránt.

Kísérleteink során a fehérjét kódoló gént izoláltuk a vizsgált fajokból, majd nukleotid-, valamint fehérjeszekvencia alapú bioinformatikai vizsgálatokat végeztünk. Filogenetikai elemzések során a genotípusok közötti változatosságot térképeztük fel. Másodlagos és harmadlagos fehérjeszerkezetet, lineáris és szerkezeti epitópokat vizsgáltunk az allergénitás mértékének becslésére. A kapott epitópok emészthetőségét *in silico* emésztéssel vizsgáltuk, pepszin, tripszin és kimotripszin enzimkombinációt alkalmazva.

A vizsgált genotípusok alapján arra a megállapításra jutottunk, hogy a 7 fajból izolált egyik deléciós mutánsban, illetve a phi típusokban kevesebb emészthetetlen epitópot tartalmazó allergén peptid található. Ezen genotípusok allergénitásának vizsgálatát különböző *in vitro* módszerekkel, így többek között búza allergiában szenvedő betegek vérérumával végzett immunblott elemzéssel szeretnénk tovább vizsgálni.

Kutatásaink további tervei között szerepel egyéb nem-prolamin allergének (cys-peroxiredoxin, dehydrin, expansin, stb.) illetve prolamin (raktározó magfehérjék, nem-specifikus lipidtranszfer protein, alfa-amiláz/tripszin inhibitor, stb.) fehérjék és kódoló génjeinek részletes bioinformatikai vizsgálata.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik munkám során, valamint diplomadolgozatom elkészítésében segítségemre voltak.

Köszönettel tartozom belső témavezetőmnek, **Dr. Kiss Erzsébetnek**, aki lehetőséget biztosított a dolgozat elkészítésére.

Köszönöm külső konzulensemnek, **Dr. Juhász Angélának** a lehetőséget a kutatómunkámban való elinduláshoz, továbbá köszönöm a kísérleteim és tanulmányaim során egyaránt nyújtott szakmai javaslatokat.

Köszönöm külső konzulensemnek, **Dr. Gell Gyöngyvérnek**, hogy szakmai útmutatásaival irányította munkámat, segített a kísérletekhez szükséges metodikák (PCR technikák, fragment izolálás, klónozás) elsajátításában, valamint a laboratóriumi munkák eredményeként kapott szekvenciák kiértékelésében.

Köszönettel tartozom **Sipos Szilviának** a laboratóriumban nyújtott segítségért.

Köszönetemet fejezem ki az **Alkalmazott Genomikai Osztály** minden munkatársának, akik tanácsaikkal és segítőkészségükkel mellettem álltak.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm **családom** türelmét és támogatását.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Aalberse, R.,C. (2007): Assessment of allergen cross-reactivity. *Clin Mol Allergy*, 5:2.
2. Akagawa, M., Handoyo, T., Ishii, T., Kumazawa, S., Morita, N., Suyama, K. (2007): Proteomic analysis of wheat flour allergens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 6863-6870.
3. Armentia, A., Martin, S., Diaz-Perales, A., Palacin, A., Tordesillas, L., Herrero, M., & Martin-Armentia, B. (2012): A possible hypoallergenic cereal in wheat food allergy and Baker's asthma. *American Journal of Plant Sciences*, 3: 1779-1781.
4. Bennich, H., Ishizaka, K., Ishizaka, T., & Johansson, S. G. (1969): A comparative antigenic study of gamma E-globulin and myeloma-IgND. *J Immunol*, 102: 826–831.
5. Besler, M. (2001): Determination of allergens in food. *Trends in Analytical Chemistry*, 20(11): 662-672.
6. Breen, J., Li, D., Dunn, D., S., Békés, F., Kong, X., Zhang, J., Jia, J., Wicker, T., Mago, R., Ma, W., Bellgard, M., Appels, R. (2010): Wheat beta-expansin (EXPB11) genes: Identification of the expressed gene on chromosome 3BS carrying a pollen allergen domain. *BMC Plant Biology*, 10: 1-11.
7. Breiteneder, H., Radauer, C. (2004): A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 113: 821– 30.
8. Breiteneder, H., E.,N., Mills, C. (2005): Plant food allergens - structural and functional aspects of allergenicity. *Biotechnology Advances*, 23(6): 395-399.
9. Brenchley, R., Spannagl, M., Pfeifer, M., Barker, G., L., A., D'Amore, R., Allen, A., M., McKenzie, N., Kramer, M., Kerhornou, A., Bolser, D., Kay, S., Waite, D., Trick, M., Bancroft, I., Gu, Y., Huo, N., Luo, M-C., Sehgal, S., Gill, B., Kianian, S., Anderson, O., Kersey, P., Dvorak, J., McCombie, W., R., Hall, A. (2012): Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature*, 491: 705–710.
10. Bruijnzeel-Koomen, C., Ortolani, C., Aas, K., Bindslev-Jensen, C., Bjorksten, B., Moneret-Vautrin, D. (1995): Adverse reactions to food. *Eur Acad Allergol Clin Immunol Allergy*, 50: 623–635.
11. Brusic, V., Petrovsky, N., Gendel, S., M., Millot, M., Gigonzac, O., Stelman, S., J. (2003): Computational tools for the study of allergens. *Allergy*, 58: 1083–1092.
12. Bushuk, W. & Tkachuk, R., (1991): In: *Gluten proteins 1990*. Am. Assoc. Cereal Chemistry, St. Paul, Mn, 389-396.
13. Chapman, J., A., Bernstein, I., L., Lee, R., E., Oppenheimer, J., Nicklas, R., A., Portnoy, J., M., Sicherer, S., H., Schuller, D., E., Spector, S., L., Khan, D., Lang, D., Simon, R., A., Tilles, S., A., Blessing-Moore, J., Wallace, D., Teuber, S. S. (2006): Food allergy: a practice parameter. *Annals of Allergy, Asthma&Immunology*, 96: S1-S68.

14. Cohen, S., G. & Saavedra-Delgado, A., M. (1989): Through the centuries with food and drink, for better or worse. *Allergy Proc*, 10: 281–290.
15. Commins, S., P., Satinover, S., M., Hosen, J., Mozena, J., Borish, L., Lewis, B., D., (2009): Delayed anaphylaxis, angioedema, or urticaria after consumption of red meat in patients with IgE antibodies specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *J Allergy Clin Immunol*, 123: 426-33.
16. Copley, S., D., Novak, W., R., Babbitt, P., C. (2004): Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. *Biochemistry*, 43:13981-95.
17. Cosgrove, D., J., Bedinger, P., Durachko, D., M. (1997): Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 94(12): 6559–64.
18. De Punder, K. & Pruimboom, L. (2013): The Dietary Intake of Wheat and other Cereal Grains and Their Role in Inflammation. *Nutrients*, 5(3): 771-787.
19. Dixon, D., P. & Edwards, R. (2010): Glutathione Transferases, *The Arabidopsis Book* / American Society of Plant Biologists, 8: e0131.
20. Gell, Gy., Kovács, K., Molnár, I., Bugyi, Zs., Tömösközi, S., Juhász, A. (2014): Celiac disease specific prolamin peptide content of wheat relatives and wild species determined by ELISA assays and bioinformatics analyses. *Cereal Research Comm* (accepted)
21. Gendel, S. M. (2009): Allergen databases and allergen semantics. *Regul. Toxicol. Pharmacol*, 54: 7– 10.
22. Goodwin P. R. (2004): Food allergen detection methods: a coordinated approach. *Journal of AOAC International*, 87 (6): 1383-1390.
23. Hischenhuber, C., Crevel, R., Jarry, B., Maki, M., Moneret-Vautrin, D. A., Romano, A., Troncone, R., and Ward, R. (2006). Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 23, 559-75.
24. Hofmann, B., Hecht, H., J., Flohe, L. (2002): Peroxiredoxins. *Biol Chem*, 383: 347-64.
25. Igrejas, G., Faucher, B., Bertrand, D., Guibert, D., Leroy, P., Branlard, G. (2001): Genetic analysis of the size of endosperm starch granules in a mapped segregating wheat population. *Journal of Cereal Science*, 35: 103-107.
26. Ishizaka, K., & Ishizaka, T. (1967): Identification of gamma-E-antibodies as a carrier of reaginic activity. *J Immunol*, 99: 1187–1198
27. Jackson, W., F. (2003): Food allergy. *ILSI Europe Concise Monograph Series* pp. 1-41. International Life Sciences Institute, Brüssel, Belgium

28. Johansson, S., G. & Bennich, H. (1967): Immunological studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin. *Immunology*, 13: 381–394.
29. Johansson, S., G., O., Hourihane, J., O'B., Bousquet, J., Brujinzeel-Koomen, C., Dreborg, S., Haahtela, T., Kowalski, M., L., Mygind, N., Ring, J., van Cauwenberge, P., van Hage-Hamsten, M., Wüthrich, B. (2001): A revised nomenclature for food allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force, *Allergy*: 56: 813–824
30. Johansson, S., G. (2004): ImmunoCAP specific immunoglobulin E test: tool for research and allergy diagnosis. *Expert Rev. Mol. Diagn*, 4(3): 89-95.
31. Juhász, A., Gell, Gy., Sebestyén, E., Haraszi, R., Tamás, L., Balázs, E. (2012): *Brachypodium distachyon* as a model for defining the allergen potential of non-prolamin proteins. *Functional & Integrative Genomics*, 12(3): 439-446.
32. Kringelum, J., V., Lundegaard, C., Lund, O., Nielsen, M. (2012): Reliable B Cell Epitope Predictions: Impacts of Method Development and Improved Benchmarking. *PLoS Comput Biol* 8(12): e1002829.
33. Krska, R., Welzig, E., Baumgartner, S. (2004): Immunoanalytical detection of allergenic proteins in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 378: 63-65.
34. Langley, K., E., Villarejo, M., R., Fowler, A., V., Zamenhof, P., J., Zabin, I. (1975): Molecular basis of beta-galactosidase alpha-complementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(4): 1254–1257.
35. Marrs, K., A. (1996): The Functions And Regulation Of Glutathione S-Transferases In Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47:127-58.
36. Mills, E., N., C., Madsen, C., Shewry, P., R., Wichers, H., J. (2003): Food allergens of plant origin- their molecular and evolutionary relationships. *Trends in Food Science&Technology*, 14: 145-156.
37. Mills, E., N., C., Jenkins, J., A., Alcocer, M., J., Shewry, P., R. (2004): Structural, biological, and evolutionary relationships of plant food allergens sensitizing via the gastrointestinal tract. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 44: 379– 407.
38. Mills, E., N., C., Wellner, N., Salt, L., J., Robertson, J., Jenkins, J., A. (2012): Wheat proteins and bread quality. In "Breadmaking" (S. P. Cauvain, ed.), pp.100-122. Woodhead Publishing Limited, Oxford.
39. Nakamura, A., Tanabe, S., Watanabe, J., Makino, T. (2005): Primary screening of relatively less allergenic wheat varieties. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 51: 204-6.
40. Ortolani, C., Ispano, M., Scibilia, J., Pastorello, E., A. (2001): Introducing chemists to food allergy. *Allergy*. 56(67): 5-8.

41. Ortolani, C. & Pastorello, E., A. (2006): Food allergies and food intolerances. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 20(3): 467–483.
42. Osborne, T., B. (1907): The protein of the wheat kernel. Publication No. 84. Carnegie Institute: Washington, DC.
43. Pahr, S., Constantin, C., Mari, A., Scheiblhofer, S., Thalhamer, J., Ebner, C., Vrtala, S., Mittermann, I., Valenta, R. (2012): Molecular characterization of wheat allergens specifically recognized by patients suffering from wheat-induced respiratory allergy. *Clinical & Experimental Allergy*, 42: 597–609.
44. Poms, R., E., Anklam, E. (2004): Effects of chemical, physical and technological processes on the nature of food allergens. *Journal of AOAC International*. 87(6): 1466-1474.
45. Prausnitz, C., & Küstner, H. (1921). Studien über die Ueberempfindlichkeit. *Cent. bl. Bakteriol*. 86: 160–169.
46. Radauer, C., Nandy, A., Ferreira, F., Goodman, R., E., Larsen, J., N., Lidholm, J., Pomés, A., Raulf-Heimsoth, M., Rozynek, P., Thomas, W., R., Breiteneder, H. (2014): Update of the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database based on analysis of allergen sequences. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 69: 413-419.
47. Rorat, T. (2006): Plant dehydrins--tissue location, structure and function. *Cell Mol Biol Lett*, 11: 536-56.
48. Sampson, H., A. (1999): Food allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. *Journal of Clinical Immunology*, 103(5): 717-728.
49. Sampson, H., A. (2004): Update on food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 113: 805-819
50. Sancho, A., I., Mills, E., N., C. (2010): Proteomic approaches for qualitative and quantitative characterisation of food allergens. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 58: 542-546.
51. Sapone, A., Bai, J., C., Ciacci, C., Dolinsek, J., Green, P., HR., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Rostami, K., Sanders, D., S., Schumann, M., Ullrich, R., Villalta1, D., Volta, U., Catassi, C., Fasano, A. (2012): Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Medicine*, 10(13): 1-12.
52. Schloss, O., M. (1912): A case of allergy to common foods. *Am J Dis Child*, 3: 341–362.
53. Schloss, O., M. (1920): Allergy in infants and children. *Am J Dis Child*, 19: 433–437.
54. Shewry, P.R., Tatham, A.S. and Halford, N.G. (1999): The prolamins of the Triticeae. Pages 35-78 in: *Seed Proteins*. P. R. Shewry and R. Casey, eds. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands.

55. Sicherer, S., H., Sampson, H., A. (2006): Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 117(2): 470-475.
56. Sicherer, S., H., Sampson, H., A. (2010): Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 125(2): 116-125.
57. Simonato, B., Pasini, G., Giannattasio, M., Curioni, A. (2002): Allergenic potential of Kamut wheat. *Allergy* 57: 653-4.
58. Sommergruber, K., H., & Mills, E., N., C. (2009): Food allergen protein families and their structural characteristics and application in component-resolved diagnosis: new data from the EuroPrevall project. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(1): 25-35.
59. Taylor, S., L., Hefle, S., L. (2001): Food allergies and other food sensitivities. *Food Technology*. 55(9): 68-83.
60. Taylor, S., L. (1992): Chemistry and detection of food allergens. *Food Technology*. 46: 146-152.
61. Utersmayr, E., & Jensen-Jarolim, E., (2006): Mechanisms of type I food allergy. *Pharmacology & Therapeutics*, 112: 787-798.
62. www.cerealsandhealth.com
63. www.foodallergygal.com
64. www.immunoterapia.hu

10. MELLÉKLETEK

1. melléklet: GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit

- 100 mg levelet folyékony nitrogénnel homogenizálunk.
- Hozzáadunk 350 µl Lysis Buffer A-t, majd 1.5 ml-es eppendorf csőbe töltjük és alaposan vortexeljük.
- Az elegyhez adunk 50 µl Lysis Buffer B-t, és 20 µl RNase A-t, majd egy percre vortexeljük.
- A mintákat 10 percre 65°C-on thermomixerben inkubáljuk.
- 130 µl Precipitation Solution-t pipetázunk a mintákhoz, és öt percre jégen inkubáljuk, 2-3-szor megforgatva az eppendorf-csőveket.
- 5 percre 14000 rpm fordulaton centrifugáljuk.
- A felülúszót tiszta eppendorf-csőbe tesszük, hozzáadunk 400 µl Plant gDNA Binding Solution-t, illetve 400 µl 96%-os etanolt, és alaposan összekeverjük.
- Az így keletkezett mix felét (600-700 µl) a kithez mellékelt oszlopokra töltjük, és egy percre 8000 rpm fordulaton centrifugáljuk.
- Az átfolyt oldatot kiöntjük, és a maradék mintával megismételjük az előző lépést.
- Az oszlopra mérünk 500 µl Wash Buffer I – t, majd egy percre 10000 rpm fordulaton centrifugáljuk, az oszlopon átfolyt oldatot ismét kiöntjük.
- 500 µl Wash Buffer II-t pipetázunk az oszlopra, és három percre 14000 rpm fordulaton centrifugáljuk, a gyűjtőcsőbe került oldatot kiöntjük.
- Az üres oszlopot egy percre 14000 rpm fordulaton centrifugáljuk, hogy a maradék mosó puffert is eltávolítsuk, majd egy tiszta 1.5 ml-es eppendorf-csőbe helyezzük át.
- A genomi DNS eluálásához 30 µl Elution Buffer-t pipetázunk az oszlop közepére, fokozottan ügyelve a membrán sérülésmentességére. A tökéletesebb visszaoldódás érdekében öt percre szobahőmérsékleten inkubáljuk a csöveket, melyet egy perces, 8000 rpm-es centrifugálás követ.
- Újabb 20 µl Elution Buffer-t mérünk az oszlopokra, és kétlépcsőben centrifugáljuk: először egy percre 8000 rpm-en, majd egy percre 14000 rpm-en.

- Az eppendorf-csőben összegyűlt minták koncentrációját NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer készülékkel megmérjük, és további felhasználásig -20 °C-on tároljuk.

2. melléklet: 50x TAE puffer

- 242 g Tris,
- 57.1 ml 99-100% ecetsav,
- 18.6 g EDTA
- 1 liter MQ-víz

3. melléklet: Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit

- Etídium-bromiddal festett agaróz gélből UV-asztalon kivágjuk az izolálni kívánt DNS-t tartalmazó szeletet, és 1.5 ml-es eppendorf csőbe helyezzük.
- A gélselethez 1:1 arányban adunk Binding Buffer-t (pl. 100 mg gélhez 100 ul Binding Buffer).
- A mintákat 10 percig 60°C-on thermomixerben inkubáljuk.
- A feloldódott gélseletet tartalmazó oldatból 800 ul-t a kithez mellékelt oszlopokra töltünk, és egy percig 12000 rpm fordulaton centrifugáljuk, majd a gyűjtőcsőbe átfolyt oldatot kiöntjük.
- Az oszlopra mérünk 700 ul Wash Buffer-t, majd egy percig 12000 rpm fordulaton centrifugáljuk, az oszlopon átfolyt oldatot ismét kiöntjük.
- Az üres oszlopot egy percig 12000 rpm fordulaton centrifugáljuk, hogy a maradék mosó puffert is eltávolítsuk, majd egy tiszta 1.5 ml-es eppendorf-csőbe helyezzük át.
- A DNS eluálásához, a kit útmutatójától eltérően, 30 ul MQ-t pipetázunk az oszlop közepére, fokozottan ügyelve a membrán sérülésmentességére. A tökéletesebb visszaoldódás érdekében két percig szobahőmérsékleten inkubáljuk a csöveket, majd két percig 8000 rpm fordulaton, és fél percig 14000 rpm fordulaton centrifugáljuk.
- Az eppendorf-csőben összegyűlt minták koncentrációját NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer készülékkel megmérjük, és további felhasználásig -20 °C-on tároljuk.

4. melléklet: LB táptalaj

- Bacto-tryptone: 10 g
- Bacto-yeast extract: 5 g
- NaCl: 10 g
- pH 7,2

5. melléklet: SOC táptalaj

- Bacto-tryptone: 20 g
- Bacto-yeast extract: 5 g
- 1M NaCl: 10 ml
- 1M KCl: 2,5 ml
- 1M MgCl₂: 10 ml
- 1M MgSO₄: 10 ml
- 2M glükóz: 10 ml
- pH 7

6. melléklet: Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit

- A folyékony táptalajban tenyésztett 4 ml baktériumkultúrát 2 percig 14000 rpm fordulatszámon, szobahőmérsékleten centrifugáljuk.
- Az így keletkezett pelletet 250 µl Resuspension Solution-ban oldjuk vissza.
- Hozzáadunk 250 µl Lysis Solution-t, és az eppendorf-csövek forgatásával alaposan összekeverjük, amíg viszkózus, kissé átlátszó szuszpenziót kapunk.
- 350 µl Neutralization Solution-t adunk az elegyhez, és azonnal összekeverjük, így fehér színű, zavaros oldatot kapunk, melyet
- 5 percig 12000 rpm fordulatszámon centrifugálunk.
- A felülúszót a kithez mellékelt oszlopokra töltjük, és egy percig 12000 rpm fordulaton centrifugáljuk, majd a gyűjtőcsőbe átfolyt oldatot kiöntjük.
- Az oszlopra mérünk 500 µl Wash Buffer-t, majd egy percig 12000 rpm fordulaton centrifugáljuk, az oszlopon átfolyt oldatot ismét kiöntjük.
- Megismételjük az előző lépést.
- Az üres oszlopot egy percig 12000 rpm fordulaton centrifugáljuk, hogy a maradék mosó puffert is eltávolítsuk, majd egy tiszta 1.5 ml-es eppendorf-csőbe helyezük át.

- A plazmid DNS eluálásához, a kit útmutatójától eltérően, 30 µl MQ-t pipettázunk az oszlop közepére, fokozottan ügyelve a membrán sérülésmentességére. A tökéletesebb visszaoldódás érdekében két percig szobahőmérsékleten inkubáljuk a csöveket, majd két percig 8000 rpm fordulaton, és fél percig 14000 rpm fordulaton centrifugáljuk.
- Az eppendorf-csőben összegyűlt minták koncentrációját NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer készülékkel megmérjük.