



---

**Élelmiszertudományi Kar**

**BAB EREDETŰ ALFA-AMILÁZ ENZIM INHIBITOROK, MINT BIOLÓGIAILAG  
AKTÍV FEHÉRJÉK VIZSGÁLATA**

**Maczó Anita**

**PhD értekezés**

Készült a Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet

Biológia Osztályán

Jogutódja: Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ

Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet

Biológia Osztály

**Budapest**

**2015**

## **A doktori iskola**

**megnevezése:** Élelmiszertudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Élelmiszertudományok

**vezetője:** **Dr. Felföldi József, PhD**  
egyetemi tanár  
Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar,  
Fizika-Automatika Tanszék

**Témavezető:** **Dr. habil Gelencsér Éva, CSc**  
egyetemi magántanár, tudományos tanácsadó  
Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ; Élelmiszer-tudományi  
Kutatóintézet, Biológia Osztály

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2015. június 9-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

**BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:**

**Elnöke**

Simonné Sarkadi Livia, DSc, BCE

**Tagjai**

Hoschke Ágoston, CSc, BCE

Halász Anna, DSc, NAIK-ÉKI

Barna Mária, CSc, SOTE

Bíró György, DSc, SOTE

**Opponensek**

Hajósné Novák Márta, CSc, SZIE

Lásztity Radomir, DSc, BME

**Titkár**

Zalán Zsolt, PhD

## TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS .....	9
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	11
1.1. Hüvelyes növények szerepe a táplálkozásban .....	11
1.2. Hüvelyes fehérjék jellemzése.....	12
1.2.1. Allergén fehérjék.....	16
1.2.2. Hüvelyes fehérjék emészthetősége .....	20
1.3. Babok ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) fehérjéi.....	21
1.3.1. Bab eredetű $\alpha$ AI-ok.....	22
1.4. Elektroforetikus módszerek fehérjék molekulatömeg és izoelektromos pont szerinti jellemzésére.....	23
1.5. A fehérjék elválasztására használt kromatográfiás módszerek.....	26
1.6. Proteomikai és tömegspektrometriás módszerek a fehérjék szerkezetének vizsgálatában.....	27
1.7. Elválasztástechnikai módszerek alkalmazása a bab $\alpha$ AI-ok izolálása és jellemzése során ....	29
1.8. Alfa-amiláz inhibitorok biotechnológiai jelentősége és élelmiszer-biztonsági kockázata ....	30
1.8.1. Bab alfa-amiláz inhibitorok biotechnológiai jelentősége.....	31
1.8.2. Újonnan expresszáldott fehérjék allergén kockázatának vizsgálata .....	32
2. CÉLKITŰZÉSEK .....	35
3. ANYAG ÉS MÓDSZER .....	37
3.1. Növényi magok, izolált fehérjék és szérumok .....	37
3.2. Elektroforézis és immunblott módszerek.....	38
3.2.1. Natív-PAGE és $\alpha$ AI festés .....	38
3.2.2. Nátrium-dodecil-szulfát (SDS) poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE).....	38
3.2.3. Kétdimenziós gélelektroforézis (2-DE) .....	39
3.2.4. Lab-on-a-chip (LOC) elektroforézis .....	39
3.2.5. Immunblott technika .....	40
3.3. Alfa-amiláz inhibitorok izolálása és aktivitásuk mérése .....	41
3.4. Hemagglutinációs teszt .....	41
3.5. Peptidek LC-TOF-MS elválasztása.....	42
3.6. Hüvelyes allergia klinikai tüneteit mutató humán szérumok szelekciója $\alpha$ AI specifikus antigén érzékenységre .....	43
3.7. Az $\alpha$ AI <i>in vitro</i> pepszines emésztése .....	43
3.8. Az $\alpha$ AI tápcsatornában történő túlélésének vizsgálata akut patkánymodellben .....	43
4. EREDMÉNYEK .....	46
4.1. Magyarországon termesztett babfajták ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) és tisztított $\alpha$ AI-ok összehasonlító, proteomikai vizsgálata valamint az inhibitor- és lektinaktivitás vizsgálata egy már jól jellemzett Tendergreen bab és a GM borsó felhasználásával .....	46

4.1.1. A magyarországi babfajták, a Tendergreen bab, a GM borsó és a nGM borsó elektroforetikus fehérjemintázatainak összehasonlító vizsgálata a referenciaként rendelkezésre álló Tendergreen bab és GM borsó eredetű $\alpha$ AI segítségével .....	46
4.1.2. A GM borsó és a nGM borsó fehérjéinek összehasonlítása 2-DE elválasztást követően, a genetikai módosításból eredő különbségfehérjék detektálása érdekében .....	49
4.1.3. A hőkezelés hatásának vizsgálata az $\alpha$ AI-ok aktivitására.....	52
4.1.4. A magyarországi babfajták, a Tendergreen bab, a GM borsó és a nGM borsó, valamint a negatív kontrollként használt Tendergreen bab és GM borsó eredetű $\alpha$ AI-ok lektin aktivitásának vizsgálata hemagglutinációs próbával .....	52
4.1.5. Kromatográfiás fehérjetisztítási módszer kidolgozása $\alpha$ AI izolálására Magyarországon termesztett <i>Phaseolus vulgaris</i> babfajtákból illetve a GM borsóból .....	54
4.1.6. Az izolált fehérjék azonosítása molekulatömeg (1-DE, immunblott, LOC, Schiff-festés) szerint valamint Tendergreen bab $\alpha$ AI-1 ellen nyúlban termelt ellananyaggal .....	57
4.1.7. Az izolált $\alpha$ AI-ok $\alpha$ - és $\beta$ - alegységeinek marker peptidok alapján történő 2-DE elválasztást követő tömegspektrometriás azonosítása.....	62
4.2. A Tendergreen bab és a GM borsó $\alpha$ AI immunogenitásának vizsgálata súlyos kombinált immunhiányos humanizált egérmodellben (HuSCID) orális érzékenyítést követően .....	70
4.2.1. A bab $\alpha$ AI aminosav szekvencia <i>in silico</i> homológia vizsgálata már ismert allergén szekvenciákkal .....	70
4.2.2. Hüvelyes allergia klinikai hátterével rendelkező és egészséges donoroktól származó anonim humán szérumok szelekciója bab eredetű $\alpha$ AI specifitásra 1-DE/ és 2-DE/immunblot segítségével.....	73
4.2.3. HuSCID modell a Tendergreen bab és a GM borsó eredetű $\alpha$ AI immunogenitásának igazolására, továbbá az egérszérumokkal azonosított IgE-reaktív polipeptidok humán pozitív szérumokkal való összehasonlító vizsgálata .....	76
4.3. A bab $\alpha$ AI-ok viselkedésének vizsgálata szimulált gyomorfolýadékban, illetve egy Tarkabab örlemény tápcsatornában való viselkedésének vizsgálata akut patkánymodellben, különös tekintettel az immunreaktív és az enzimaktív szerkezet megőrzésére .....	79
4.3.1. Az $\alpha$ AI-ok <i>in vitro</i> pepszines emésztése .....	79
4.3.2. Az $\alpha$ AI tápcsatornában történő túlélésének vizsgálata akut patkánymodellben .....	83
5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK .....	89
KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK .....	90
ÖSSZEFOGLALÁS.....	92
SUMMARY .....	95
IRODALOMJEGYZÉK.....	98
MELLÉKLETEK.....	114
A DISSZERTÁCIÓ TÉMÁJÁBAN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK.....	130
EGYÉB KÖZLEMÉNYEK .....	132
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	134

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

**2-DE** kétdimenziós gélelektroforézis

**$\alpha$ A** alfa-amiláz enzim

**$\alpha$ AI** alfa-amiláz inhibitor

**ADSF** Allergen Database for Food Safety (élelmiszerbiztonsági célú allergén adatbázis)

**APA-fehérjék** Alpha-amylase, Phytohaemagglutinin, Arcelin (alfa-amiláz inhibitor, fitohemagglutinin, arcelin)

**APS** ammónium-persulfate (ammónium-perszulfát)

**APC** Antigen Presenting Cell (antigén prezentáló sejt)

**BBI** Bowman-Birk inhibitor

**BSA** Bovine Serum Albumin (marha szérum albumin)

**$\beta$ LG** béta-laktoglobulin

**CCD** Cross-reactive Carbohydrate Determinant (Kereszt-reaktív szénhidrát determináns csoport)

**CM-cellulóz** karboximetil-cellulóz

**CHAPS** 3[3-Cholamidopropyl-dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate (3[3-kolamidopropil-dimetilammónium]-1-propánszulfonát)

**CSIRO** Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (Nemzeti Tudományos és Ipari Kutató Szervezet, Ausztrália)

**DEAE-cellulóz** Diethyl-Amino-Etil-cellulóz

**DTT** DL-threo-1,4-dimercapto-2,3-butanediol (DL- treo- 1,4- dimerkapto-2,3- butándiol)

**EDTA** Ethylene-diamine-tetraacetic acid (etilén-diamin tetraecetsav)

**EFSA** European Food Safety Authority (Európai Élelmiszerbiztonsági Hivatal)

**ELISA** Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Enzimhez Kötött Immunszorbens Vizsgálat)

**ESI-MS** Electrospray Ionization Mass Spectrometry (elektroszpré ionizációs tömegspektrometria)

**FAO** Food and Agriculture Organization (Élelmészeti és Mezőgazdasági Világszervezet)

**FARRP** Food Allergy Research and Resource Program (Élelmiszer Allergia Kutató és Forrás Program)

**GM** (genetically modified) genetikailag módosított

**HPLC** High Pressure Liquid Chromatography (nagynyomású folyadék kromatográfia)

**HRPO** horseradish peroxidase (tormaperoxidáz enzim)

**HuSCID egér** Human Severe Combined Immunodeficiency (Humanizált, súlyos kombinált immunhiányos egértörzs, humán mononukleáris sejteket hordozó immundeficiens egér)

**IEF** izoelektromos fókuszálás

**IgE** immunglobulin E

**IgG** immunglobulin G

**IPG** immobilizált pH gradiens

**KTI** Kunitz-type inhibitor (Kunitz-típusú inhibitor)

**LC-MS** Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (folyadék kromatográfiához csatolt tömegspektrometria)

**LC-MS/MS** Liquid Chromatography - Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (folyadék kromatográfiához csatolt tandem tömegspektrometria)

**LOC** Lab-On-A-Chip electrophoresis (mikrochip elektroforézis)

**MALDI-TOF-MS** Matrix Associated Laser Desorption/ Ionization (mátrixhoz kötött lézer ionizációs – „repülési idő” tömegspektrométer)

**MM** molecularweight marker (molekulatömeg marker)

**MS** Mass Spectrometry (tömegspektrometria)

**PAGE** Polyacrilamid Gel Electrophoresis (poliakrilamid gélelektroforézis)

**PHA** Phytohaemagglutinin (fitohemagglutinin)

**pI** isoelectric point (izoelektromos pont)

**PFAM** Protein families database (Fehérjecsládok adatbázisa)

**PBMC** Peripheral Blood Mononuclear Cell (perifériális vér mononukleáris sejt)

**PMSF** phenyl-methyl-sulfonyl fluoride (fenil-metil-szulfonil-fluorid)

**ProAP** Protein Allergenicity Prediction (fehérje allergenitás predikció)

**RIA** Radioactive Immunoassay (Radioaktív immunvizsgálat)

**R250** Coomassie Brilliant Blue R 250 festék

**SDAP** Structural Database of Allergenic Proteins (allergén fehérjék szerkezeti adatbázisa)

**SGF** Simulated Gastric Fluid (szimulált gyomor folyadék)

**SDS** sodium-dodecyl-sulfate (nátrium-dodecil-szulfát)

**SDS-PAGE** sodium-dodecyl-sulphate polyacrilamid gelelectrophoresis (nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis)

**TCA** trichloroacetic acid (triklór-ecetsav)

**TEMED** N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylene-diamine (N, N, N', N'-tetrametil-etilén-diamin)

**TRISZ** trisz-(hidroximetil)-amino-metán

**Tween 20** polioxietilén-szorbitán-monolaurát

**UNIPROT** Universal Protein Database (Univerzális Fehérje Adatbázis)

**WHO** World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)



## BEVEZETÉS

A hüvelyesek (*Leguminosae* vagy *Fabaceae*) rendjébe tartozó növények fontos szerepet töltenek be a humán táplálkozásban azáltal, hogy kitűnő forrásai a szénhidrátoknak, rostoknak, ásványi anyagoknak és fehérjéknek, melyek bioaktív szerepe az utóbbi évek táplálkozástudományi kutatásainak jelentős részét képezi. Esszenciális aminosavakban, például lizinben gazdagok, viszont tápértéküket limitálja, hogy kéntartalmú aminosavakban szegények. Gabonafélékkel kombinálva azok alacsony lizin tartalmát jól kiegészítik, így egy kiegyensúlyozott étrend részei lehetnek. A tartalékfehérjéket képező albumin és globulin frakció mellett, a kutatások előterébe kerültek olyan minor fehérjekomponensek, amelyek főleg biológiailag aktív fehérjékből állnak.

A biológiailag aktív komponensekkel végzett korai kutatások elsősorban az antinutritív anyagok negatív hatását vizsgálták a laboratóriumi és a haszonállatok tápanyag hasznosításában. E vizsgálatok hasznos mennyiségi és minőségi információkat szolgáltatottak a káros hatás jellemzésére. Így indulhatott meg a nemkívánatos hatást csökkentő eljárások kifejlesztése is.

Az utóbbi évtizedben azonban szemléletváltás következett be, mely jelentős fejlődést eredményezett a táplálkozásban betöltött szerepük megítélésében. A tudományos érdeklődés egyre inkább e komponensek egészséggel és életminőséggel kapcsolatos előnyös alkalmazásának irányába fordult. Kiemelt szerepet kapott a tápcsatornával való kölcsönhatásuk vizsgálata, többek között a metabolizmus, a hormon- és az immunreguláció, melyekkel kapcsolatban még ma is sok a feltárni való ismeret. Ezért, a témában élenjáró kutatók az „antinutritív” kifejezés helyett „a nem tápanyaghordozó, bioaktív komponensek” kifejezést részesítették előnyben.

A genetikailag módosított növények kifejlesztésével e komponensek egy egészen új, növényvédelmi alkalmazási területe is reflektorfénybe került.

Ilyen, biológiailag aktív fehérjék csoportjába tartoznak a főként babokban (*Phaseolus vulgaris*) előforduló alfa-amiláz inhibitorok ( $\alpha$ AI), amelyeket egy közös lektin-géncsalád kódol. Ez a géncsalád három fehérjét expresszál, a lektin aktivitással rendelkező fitohemagglutinin (PHA) és ennek csonkított változatait, mint az amiláz inhibitor aktivitással rendelkező  $\alpha$ AI-t és az arcelint (Arc). Ez utóbbi szerepe a növényben még nem egészen tisztázott, elsősorban a növény rezisztencia tulajdonságaival hozták összefüggésbe. Az  $\alpha$ AI az alfa-amiláz emésztőenzim katalízisét gátolja enzim-inhibitor komplex kialakítása révén. Az  $\alpha$ AI-1 a humán és a rovar nyál és pankréász eredetű enzimeivel szemben hatásos. A növényi fehérjeszintézist követően az  $\alpha$ AI-1 egy funkcionálisan inaktív előfehérjéből poszt-transzlációs módosulások alkalmával aktív alegységekké bomlik. Ezen inhibitor aktivitásuk miatt az  $\alpha$ AI-1-ek az utóbbi években több kutatás középpontjába kerültek.

Gátló hatásuk miatt a növényi kártevők szénhidrát- és energiahasznosulását károsan befolyásolják, így a növényi védőfehérjék családjába sorolandók. A bab eredetű  $\alpha$ AI-1fehérjét kódoló gén borsóba (*Pisum sativum*) való transzformálása jelentősen megnövelte  $\alpha$ AI-1fehérje expresszióját, ezáltal eredményesnek bizonyult a borsó kártevőjével (*Bruchus pisorum*) szembeni védekezés során. Azonban a kutatók körében vitát váltott ki és megkérdőjelezésre került a fehérje borsóban való poszt-transzlációs módosulása során megfigyelt szerkezeti és ebből kifolyólag immunológiai tulajdonságainak megváltozása. Ezért újabb kutatások irányultak a bab  $\alpha$ AI-ok szerkezetének és funkciójának vizsgálatára.

Továbbá, a bab  $\alpha$ AI-ok a humán szénhidrát metabolizmusban betöltött szerepük miatt is fontos tárgyat képezik a kutatásoknak az egészségmegőrzés és életminőség javítása szempontjából. Mivel az  $\alpha$ AI-1 a keményítő lebontását befolyásolja, ezáltal ígéretes összetevő lehet az elhízottak és cukorbetegség diétájában is.

Bár számos kutatás indult e fehérje szerkezeti és funkcionális tulajdonságainak jellemzésére, még több nyitott kérdés maradt a kutatás számára. Ezért az értekezés célja a fehérje szerkezetének pontosabb megismerése olyan új információkat eredményező módszerekkel, mint pl. a proteomika, indokolt. A szerkezet és funkció kapcsolatának megismerése és összekötése olyan biológiai aktivitás vizsgálatokkal, mint pl. az antigenitás vagy allergenitás még további kutatást igényel. A tápcsatornában való viselkedésük és rezisztencia esetén kifejtett enzimgátló vagy immunmoduláló hatásuk megismerésében ma még sok feltáratlan terület maradt. Ez utóbbiak fontosak mind a táplálkozástudományi ismeretek bővítése, mind pedig az élelmiszerbiztonság számára.

## 1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 1.1. Hüvelyes növények szerepe a táplálkozásban

A globális gazdaság- és népességnövekedés következményei az agrárgazdaságban is megfigyelhetők. A világ népességének ellátásához 2050-re 70 %-kal több élelmiszerre lesz szükség (BRUINSMA, 2009). A hús- és tejtermékek iránti növekvő kereslet miatt az állattenyésztés is kihívások elé néz, melynek kritikus pontja lehet a takarmányozás. Az utóbbi években emiatt fontos agrárgazdasági feladat lett a fehérjenövények termesztési területének és hozamának növelése.

A hüvelyesek (*Leguminosae* és a *Fabaceae*), a gabonafélék után, a második legfontosabb gazdasági növények. Magas fehérjetartalmuk miatt jelentős szerepük van az állatok takarmányozásában. Fontos szerepük van a fenntartható mezőgazdasági rendszerek kialakításában, mind a fejlett és fejlődő országok fehérjeellátásában (POPELKA, 2004). A világ termőföld területének 15 %-án termesztnek hüvelyeseket, amelyek a fehérjeellátás 33 %-át és a növényi olaj ellátás 35 %-át adják (GRAHAM és VANCE, 2003). Legfőbb képviselőik a szójabab, lencse, bab, borsó, csillagfűrt és a földimogyoró. A szójabab főleg az ázsiai országokban elterjedt, a lencse és a csicseriborsó a mediterrán országok fő hüvelyes tápláléka, a babfélék leginkább a Közép-és Észak Amerika országai mellett, ma már Európában is egyre gyakrabban fogyasztott fehérjeforrások (SCHNEIDER, 2002). Ugyanakkor a hüvelyes fehérjék a humán táplálkozásban gyakori kiegészítői más fehérjeforrásoknak (DURANTI, 2006). A funkcionális növényi fehérjék egyre növekvő piaca igényli az alternatív, eddig kevésbé hasznosított fehérjeforrások felderítését, kutatását.

Ugyanakkor a gazdaságilag fejlett országokban, ahol szemben a növényi fehérjékkel a nagy energiatartalmú és elsősorban állati eredetű fehérjék fogyasztásának túlsúlya dominál, az elhízásos megbetegedések száma megsokszorozódott, világméretű, népegészségügyi problémává vált. Az elhízás következményében kialakuló megbetegedések közé tartozik a diabétesz, kardiovaszkuláris megbetegedések, ízületi gyulladások és a stroke. A WHO becslései szerint 2020-ra a globális megbetegedések kétharmada az elhízás és azzal kapcsolatos betegségeknek lesz tulajdonítható (BABOOTA és mts., 2013). Az elhízás elleni készítményeknek, amelyek csökkentik vagy kontrollálják a testsúlyt, számos nem kívánatos mellékhatását bizonyították, melyek vetekednek a tényleges hatással. Ezért lett fontos az utóbbi években a nem gyógyszeralapú alternatívák kutatása az elhízás megelőzésére és kezelésére. Több hüvelyesben előforduló biológiailag aktív fehérje bizonyítottan hatással van a humán metabolizmusra, ezért szükség van ezek szerepének pontosabb megismerésére irányuló kutatásokra.

## 1.2. Hüvelyesek fehérjék jellemzése

A hüvelyesek fehérjetartalma szárazanyagra vonatkoztatva átlagosan 20-40 %. A fehérjetartalom a babokban 20-28 %, a borsóban 21-28 %, míg a szójában és a csillagfürtben 38-40 % (DURANTI, 2006) (1. táblázat).

**1. táblázat:** Hüvelyes élelmisznövények 100 g szárazanyag tartalomra vonatkoztatott fehérjetartalma (COMAI és mts., 2007)

Hüvelyesek	fehérjetartalom (g/100g szárazanyag)
Bab ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	28,1
Borsó ( <i>Pisum sativum</i> )	22,8
Csicseriborsó ( <i>Cicer arietinum</i> )	23,9
Lencse ( <i>Lens culinaris</i> )	27,6
Csillagfürt ( <i>Lupinus albus.</i> )	39,4
Szója ( <i>Glycine max</i> )	38,3
Földimogyoró ( <i>Arachis hypogaea</i> )	28,4

A hüvelyesekben található fehérjék három csoportba sorolhatók: tartalékfehérjék, biológiailag aktív fehérjék és allergén fehérjék.

A *tartalékfehérjék* a növény fejlődése során a magvakban képződnek és a membrán organellumokban (protein testek) raktározódnak. Legtöbbjük nem rendelkezik katalitikus aktivitással, a növény csírázása során hidrolízisen mennek át és annak további fejlődése során szén, nitrogén és kénforrásként szolgálnak (DURANTI és GIUS, 1997). A hüvelyesek két fő tartalékfehérje frakciói: az albuminok és a globulinok (MONTTOYA, 2010). Az albuminok kiegyensúlyozott aminosav összetételűek, főleg kéntartalmú aminosavakban gazdagok. A globulinok szedimentációs koefficiensük (S) alapján két további frakcióra oszthatók: a 11S (legumin) és 7S (vicilin) típusú globulinok (CASEY, 1986). Ez a két csoport szerkezeti eltérést mutat, ami poszt-transzlációs módosulások következménye (SHEWRY, 1995). Mindkét csoport ciszteinben és mentioninban szegény. A két globulin aránya fajoként változó, például a szójában és a csillagfürtben a 7S vicilin nagyobb arányban van jelen, mint a 11S legumin, a borsóban és egyes babfajtákban pedig a 11S leguminok dominálnak (JEZIERNY, 2010). A 11S leguminok hat alegységpárt tartalmaznak, amelyek nem kovalensen kapcsolódnak egymáshoz. Mindegyik alegységpár felváltva tartalmaz egy diszulfid hídral összekapcsolt savas (40000 Da) és egy bázikus

(20000 Da) alegységet (SHEWRY, 1995). A legumin típusú fehérjék általában nem glikoziláltak, kivétel ezalól a csillagfürt leguminja (DURANTI, 1998). A 7S vicilinek trimer szerkezetű fehérjék, molekulatömegük 150000-190000 Da közötti, az alegységek 40000 és 80000 Da közöttiek. Nem tartalmaznak cisztein aminosavat, ezért diszulfid hidak kialakítására nem képesek. Az alegységek szerkezete széles körű változatosságot mutat a poszt-transzlációs módosulások eltérő mértéke miatt. A borsó vicilin alegysége kezdetben egy 47000 Da molekulatömegű polipeptidként szintetizálódik, de később a poszt-transzláció során glikozilálódik, ami megnöveli az alegység molekulatömegét (CASEY, 1986). A bab és a szója 7S vicilinjei eltérő szerkezetet mutatnak a borsóban található vicilintől az erősebb glikozilációs mértékük miatt. Például a *Phaseolus vulgaris* 7S vicilinje glikozilált alegységekből áll, melyek molekulatömege 43000- 53000 Da közötti (CHRISPEELS és RAIKHEL, 1991).

A hüvelyesekben jelentős arányban találhatóak olyan *biológiailag aktív komponensek*, amelyek ugyan nem tápanyagként szolgálnak, de pozitív vagy negatív hatással lehetnek a humán és az állati tápanyaghasznosításra. Ettől a pozitív vagy negatív hatástól függően a szakirodalomban többféle megnevezést használnak ezekre az összetevőkre, mint például toxikus komponensek (LIENER, 1976; LIENER és mts., 1986), antinutritív faktorok (THOMPSON, 1993; SHAHIDI, 1997; ROY és mts., 2010), nutritív faktorok vagy bioaktív összetevők (SAVAGE és DEO, 1989) és fitokemikáliák (FERGUSON, 1999). Azokat a biológiailag aktív vegyületeket antinutritív faktoroknak nevezzük, melyek tartós, folyamatos fogyasztása negatív hatással van a tápanyagok hasznosulására, emiatt a hüvelyes magvak fogyasztása korlátozott. Ezek lehetnek fehérje természetű, illetve nem-fehérje természetű antinutritív komponensek (DURANTI és mts., 1997). A nem fehérje természetű antinutritív komponensek lehetnek fitátok, alkaloidok és fenolos komponensek, mint például a tanninok. A legtöbbet tanulmányozott antinutritív komponensek a fehérje természetű enzim inhibitorok és a lektinek (MUZQUIZ és mts., 2012). Az antinutritív fehérjék hosszú ideig tartó, folyamatos etetése a kísérleti állatokban a tápanyag hasznosulás elmaradását, gyenge növekedési erélyt, csökkent emészthetőséget és felszívódást eredményeznek. Megfigyelték továbbá, a tápanyagok lassabb továbbítását a tápcsatornában, a vékonybél fal szerkezeti változását és károsodását, illetve kóros hasmenés kialakulását is. Mivel e komponensek technológiai kezelések során történő viselkedésével (hőstabilitás, kémiai vagy enzimes kezelés, csíráztatás, fermentáció, stb.) kapcsolatban főleg laboratóriumi kísérletes adatok állnak rendelkezésre, ezért a közelmúlt célzott kutatásaiban a tápcsatornával való kölcsönhatásuk megismerése került inkább előtérbe. Ezen belül is az anyagszere, illetve a lumenális antigénekre kialakult immunválasz minősége kapott hangsúlyt.

A *szérin proteáz inhibitorok* antinutritív tulajdonságuknál fogva stabil kötés kialakításával az olyan emésztő enzimek aktivitását gátolják, mint a tripszin és a kimotripszin. A tripszin

inhibitoroknak különböző izoformáit azonosították hüvelyesekben (GUILLAMÓN és mts., 2008a; MUZQUIZ és mts., 2012). Ezek az inhibitorok a Kunitz (KTI) és a Bowman-Birk (BBI) fehérjecsaldokhoz tartoznak. A tápcsatornában túlélő és funkcionálisan aktív proteáz inhibitorok csökkentik a tápfehérje emészthetőségét, többek között a gasztrin peptid hormon lebomlását. Ennek következményeként fokozódik a sósav és pepszin szekréció a gyomorban, továbbá a hasnyálmirigy gyors növekedése (hipertrófia) és túlzott enzimszekréciója (hiperplázia) figyelhető meg. Ez fokozott endogén fehérje kiválasztást eredményez a vékonybélben (PUSZTAI és mts., 1997). Ugyanakkor az elmúlt két évtizedben ezeknek az inhibitoroknak pozitív, egészségmegőrző hatásaira is. felfigyeltek (GELENCSÉR, 2009; CHAMP, 2002; LAJOLO és GENOVESE, 2002; ROY és mts., 2010; MUZQUIZ és mts., 2012), melyek szerint antikarcinogén ágensek is lehetnek. A BBI fehérjéről mind *in vitro* és mind *in vivo* kísérletek során bebizonyították, hogy a karcinogenezist visszaszoríthatja (MUZQUIZ és mts., 2012). Patkányokban a vastagbél daganatos megbetegedésének előfordulását és gyakoriságát csökkentette. Ezt a hatást azonban a fehérje hőkezelt formájával nem érték el, tehát a natív inhibitor aktivitás szükséges az antikarcinogén hatás eléréséhez (KENNEDY és mts., 2002). Humán klinikai vizsgálatok során nem volt bizonyítható a BBI toxicitása (AMSTRONG és mts., 2000).

Az *alfa-amiláz inhibitorok* ( $\alpha$ AI) a szénhidrát metabolizmusban fontos enzimek, az alfa-amilázok (EC 3.2.1.1)  $\alpha$ ,1-4 glikozidos kötések bontó aktivitását gátolják. A szénhidrát anyagcserében betöltött szerepük miatt fontos biológiailag aktív fehérjék, a vér glükóz szintjét csökkentő hatásukat írták le, ami a keményítőbontás gátlásának következménye. Ezen antinutritív tulajdonságuk miatt az  $\alpha$ AI-t „starch blocker”-ként, azaz a keményítő lebontását blokkoló összetevőként próbálták kihasználni elhízottak és diabéteszben szenvedő betegek diétájának kiegészítésében (BARRETT és UDANI, 2011). Ez a tulajdonságuk azonban vitatott, mivel a készítmények többsége nagyon alacsony inhibitor aktivitással rendelkezett, amely mellett jelen volt a PHA toxikus hatása is. Az amiláz enzim gátláson alapuló hatást a növényi kártevők elleni védekezésben a modern biotechnológia is alkalmazza (SCHROEDER és mts., 1995; PRESCOTT és mts., 2005).

Az enzim inhibitorok mellett a másik antinutritív fehérjecsoport a *lektinek*, melyek gyakran glikoprotein típusú fehérjék. A lektinek reverzibilis kapcsolódásra képesek szénhidrátokkal, a kovalens kötősszerkezet megváltoztatása nélkül. Cukorkötő képességük révén felismerik a vörösvértestek sejtfelszíni receptorait, ezáltal a sejtek agglutinációját (hemagglutininek) okozzák *in vitro*. A hemagglutinációs aktivitás függ a hőkezelés módjától és idejétől valamint a hüvelyes növényfajtól (ETZLER, 1985). A nyálkahártya sejtfelszíni receptoraihoz kötődő, ún. mitogén lektinek proliferációs aktivitásuk miatt a vékonybél túlzott növekedését (hiperplázia) képesek kiváltani patkányban. Sejtfelszíni receptorokhoz kapcsolódva a tápcsatornával kölcsönhatásba

lépnek és az anyagcserét megváltoztatják (GELENCSÉR, 2009). Tartós etetésük toxikus lehet (ZUCOLOTO és mts., 1991). Elsődleges struktúrájukat tekintve a hüvelyes lektinek nagyfokú homológiát mutatnak egymással, azonban a szénhidrát specificitásukat változatosság jellemzi (NASI és mts., 2009). A bab (*Phaseolus vulgaris*) agglutinin (PHA) felismeri és specifikusan kötődni képes az emlős glikoproteinek komplex glükán részében lévő terminális galaktóz, az N-acetilglükózamin és mannóz végcsoportjaihoz (CHRISPEELS és RAIKHEL, 1991). A leukoagglutininek (PHA-L) a mononukleáris sejtekre gyakorolt proliferációs hatásuk miatt, a lumenális antigénekre adott immunválasz minőségét is képesek megváltoztatni. Ezt a hatást tripszin inhibitorokban és lektinben dús albumin koncentráttal patkánymodellben bizonyították (GELENCSÉR, 2009). Az eritroagglutininek (PHA-E) erős eritro-agglutinációs képességgel rendelkeznek. Amíg néhány lektin hőre labilis, mások hőrezisztensek lehetnek és nagyobb mennyiségű, nem megfelelően hőkezelt hüvelyes mag fogyasztása után az aktív lektin vörösvérsejtek agglutinációját váltja ki, amely hemolízishez és extrém esetben halálhoz vezethet (LIENER és mts., 1986). A lektinek toxicitásáról, specificitásuktól függően, egymásnak ellentmondó nézetek ismertek. PEUMANS és VAN DAMME (1995) szerint a lencse és borsó lektinek nyersen fogyasztva toxikusak az emberi szervezetre, míg mások (GONZALEZ és mts., 2005) a lencse, borsó és csicseriborsó lektint nem találták toxikusnak. Más tanulmányokban, csicseriborsóban lektin aktivitást mutattak ki, azonban ez a toxicitást kiváltó határérték alatt volt (SINGH és mts., 1982). Az inhibitorokhoz hasonlóan a lektineknek is lehetnek az egészségre nézve előnyös tulajdonságai; bélfunkciót stimuláló és tumor növekedést limitáló hatással rendelkeznek (MUZQUIZ és mts., 2012; GELENCSÉR, 2009). Patkányokon végzett kísérletek során a bab fitohemagglutinin preparátum csökkentette a tumor növekedés mértékét (PRYME és mts., 1998). PUSZTAI és mts. (1998) kísérletei során elhízott patkányokban csökkent a lipid akkumuláció, amikor nyers vesebabot tartalmazó diétán tarották őket. Ez feltehetően kapcsolatban volt a lektin által indukált inzulin szint csökkenésével. A 2. számú táblázat a hüvelyesekben előforduló biológiailag aktív komponenseket és azok fiziológiai hatásait foglalja össze.

**2. táblázat:** Egyes hüvelyes növényekben megtalálható biológiailag aktív komponensek és azok fiziológiai hatása (MUZQUIZ és mts., 2012)

KOMPONENS	FIZIOLÓGIAI HATÁS	FAJ
<i>Fehérje eredetűek:</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>- proteáz inhibitorok</li> <li>- lektinek</li> </ul>	növekedés gátlás, hormonális egyensúlyzavar, vékonybél károsodás	lencse  bab
<i>Glikozidázok:</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\alpha</math>-galaktozidáz</li> <li>- vicin/convicin</li> <li>- szaponinok</li> </ul>	flatulancia, glükóz-6-foszfát dehidrogenáz enzimhiány, csökkent vékonybél áteresztő képesség	farkas bab  csillagfűrt  zöldborsó
<i>Egyéb:</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>- fitátok</li> <li>- alkaloidok</li> <li>- polifenolok</li> </ul>	ásványianyagok felszívódásának csökkentése, növekedés gátlás, fehérjék emészthetőségének csökkentése	szója  zöldborsó

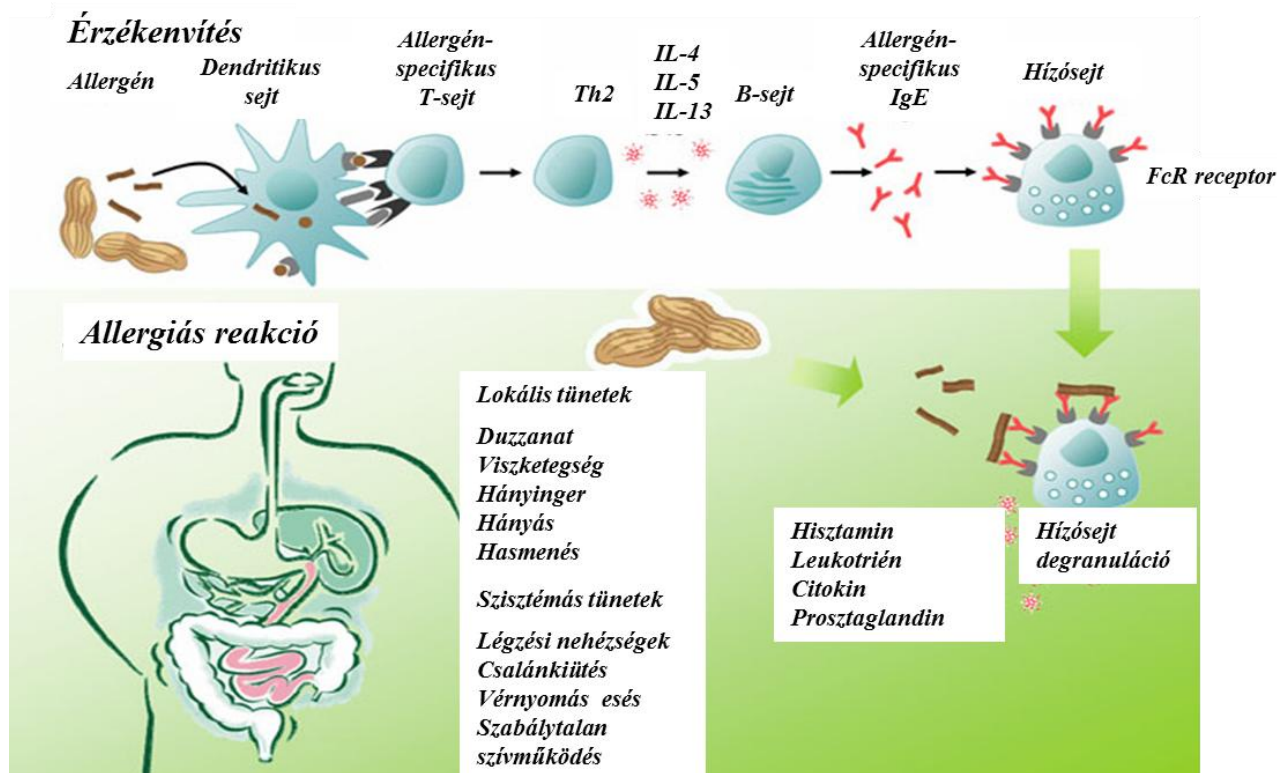
### 1.2.1. Allergén fehérjék

Az élelmiszer allergia fontos egészségügyi problémát jelent a világ számos országában, a népesség 1-2 %-a szenved valamilyen allergiás megbetegedésben (HELM és BURKS, 2000; JACKSON, 2003), amely a gyerekek 5-8 %-át, a felnőttek 2-4 %-át érinti (MILLS és mts., 2003; JACKSON, 2003; SICHERER és SAMPSON., 2010).

Az élelmiszerallergia az immunrendszer túlzott reakciója valamely ártalmatlan anyagra, amely legtöbbször fehérje. Az élelmiszerallergiák nagy része IgE mediált immunreakció, amit I. típusú túlérzékenységi reakciónak is neveznek. Az IgE-mediált allergia mechanizmusának első fázisa egy érzékenyítési szakasz, amelynek során az antigént prezentáló sejtek (APC) az antigént a T-sejteknek prezentálják, amelyek ezzel aktiválódnak és Th2 limfocitákká differenciálódnak (1. ábra). Ezek a limfociták IL-4 és IL-13 interleukinokat termelnek, amelyek hatására a B-sejtek IgE ellenanyag termelő plazmasejteké alakulnak. Az IgE molekulák a szövetekben jelen lévő hízósejtek és bazofil granulociták IgE-kötő receptoraihoz kapcsolódnak. A mechanizmus második fázisa az, amikor a szervezet ismételtén találkozik az antigénnel. Ekkor az antigén keresztkötést



alakít ki a hízósejtekhez és a bazofil sejtekhez kötött IgE ellenanyaggal. Ez a kötés a hízósejtek degranulálását eredményezi és tüneteket kiváltó mediátoranyagokat (hisztaminok) szabadít fel, amelyek a vérbe és a szövetekbe kerülve gyulladást váltanak ki. A tünetek különbözőek lehetnek; így bőrtünetek (ekcéma), légzőszervi tünetek (aszma, rhinitis) és/vagy emésztőrendszeri tünetek (hasmenés). Az IgE mediált allergiák esetében a tünetek az élelmiszer elfogyasztása után azonnal, vagy néhány percen belül fellépnek.

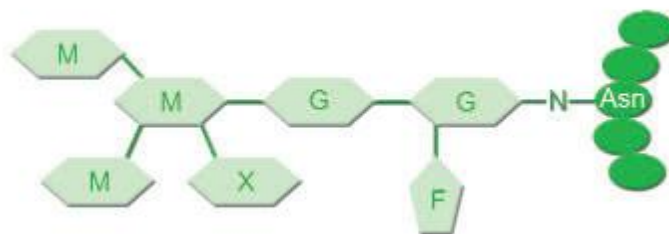


**1. ábra:** Allergiás reakció mechanizmusa és tünetei  
Joost Smit, University Utrecht; <http://ucfa.nl/food-allergy/mechanisms/>

Az allergén fehérjék közös jellemzője, hogy antigén determinánsokkal, ún. epitópokkal rendelkeznek. Az epitóp kifejezést először Niels Jerne használta 1960-ban az antigéneknek arra a szakaszára, amelyeket az ellenük termelődött ellenanyag molekulák felismernek (JERNE, 1960). Az epitóp az antigén molekulának tehát az a kötőhelye aminosav szinten, amely kapcsolatot létesít az immunglobulinokkal. A kapcsolódás antigénspecifikus és nem érinti a teljes molekulát. Megkülönböztetünk folytonos (lineáris) vagy szekvenciális epitópokat, és nem folytonos vagy konformális epitópokat. A legtöbb T-sejt epitóp lineáris és a legtöbb B-sejt epitóp pedig konformális epitóp (LAVER és mts., 1990). A lineáris epitópok a fehérje harmadlagos

szerkezetének megváltozása, felbomlása után is megmaradnak, az ellenanyagok ezután is felismerik őket. A konformális epitópok - mivel a fehérjeláncon egymástól távol eső aminosavak között jönnek létre - a harmadlagos szerkezet felbomlása után már nem tartják meg az eredeti konformációjukat, így, már az ellenanyaghoz sem képesek kapcsolódni. Ha két antigénmolekula hasonló epitóp szerkezettel rendelkezik, megtörténhet, hogy mindkettő képes ugyanazon ellenanyaghoz kapcsolódni, ami ezzel kereszt-reaktivitást eredményez (JACKSON, 2003).

Az allergiát kiváltó fehérjék legtöbb esetben glikoproteinek. Az élő sejtekben lejátszódó fehérjeszintézist követően a fehérjemolekulák további, különböző szerkezeti változásokon mennek keresztül, melyeket poszt-transzlációs módosulásnak nevezünk. Ezek a változások szoros összefüggésben vannak a fehérjék biológiai működésével és meghatározóak azok funkcióját tekintve. Többek között egyik ilyen szerkezeti változás a glikoziláció, amely során monoszacharid vagy oligoszacharid láncok kapcsolódnak a fehérjét alkotó bizonyos aminosavakhoz. Ez a kapcsolódás történhet N- vagy O-glikoziláció révén. Az O-glikoziláció során a szénhidrát a Ser (szerin) vagy Thr (treonin) aminosav oldalláncainak hidroxil csoportjához kapcsolódik O-glikozidos kötéssel. Az N-glikoziláció során az oligoszacharid egységek az Asn (aszparagin) aminosav aminocsoportjához kapcsolódnak N-glikozidos kötéssel (2. ábra). A szénhidrát csoportok kapcsolódása a fehérjelánchoz meghatározza a fehérje funkciót, biológiai aktivitását, stabilitását, immunológiai viselkedését. Immunológiai viselkedést tekintve a poszt-transzlációs módosulás során glikozilációval kialakulhatnak olyan szénhidrát-keresztalkotó determináns (CCD) csoportok a fehérjéken, amelyek a szénhidrát receptoron keresztül képesek az ellenanyag molekulához kapcsolódni. Ezek az ún. szénhidrát epitópok, melyeket az IgE ellenanyagok felismernek. A CCD csoportok általában növényi eredetű glikoproteineken találhatóak, amelyeket felismerő IgE ellenanyagok biológiai aktivitása alacsony és ez pozitív RAST (RadioAllergen Sorbent Test) tesztet eredményez klinikai tünetek megjelenése nélkül is (VAN DER VEEN és mts., 1997).



**2. ábra:** N-glikoziláció ábrája

A fehérje aszparagin aminosavján keresztül N-glikozidos kötéssel két N-acetil glükózaminból (G) három mannóz (M) egy xilóz (X) és egy fukóz (F) kapcsolódik.

Az allergenitás tehát egy genetikailag is meghatározott, fajspecifikus tulajdonság, amely függ az atópiás egyének variabilitásától és ezért nem becsülhető kizárólagosan egy adott fehérje

tulajdonságai alapján. Az allergiás reakciók gyakorisága és specificitása földrajzi és környezeti faktoroktól is függ.

Az allergén fehérjék tehát olyan antigének, melyek IgE-mediált immunválasz kiváltását eredményezik. A fő allergénekhez soroljuk azokat, amelyek az arra érzékeny egyének legalább 50%-ánál (legalább 10 érzékeny egyént tekintve) kiváltják az allergiás tüneteket (MILLS és mts., 2003). A Pfam adatbázis a 3D szerkezet alapján megállapított szerkezeti homológia, illetve a lehetséges funkciók szerinti fehérje családokba sorolja az élelmiszer allergéneket (BREITENEDER és CLARE MILLS, 2005). A növényi allergén fehérjék családokba sorolhatók szerkezeti és funkcionális tulajdonságaik alapján. A tápcsatornán keresztül érzékenyítő fő fehérjecsaládok a prolamin és a kupin család, valamint a növényi védekező-rendszerben szerepet játszó fehérjecsalád (BREITENEDER és RADAUER, 2004). A hüvelyes növényeknek nagy fehérjetartalmuk következtében fontos szerepük van az allergénitásban kialakulásában. A prolamin fehérjecsalád elnevezés a magas prolin és glutamin tartalmú gabona-prolaminokból ered, melyek a gabonafélék fő tartalékfehérjéi. Ebbe a fehérjecsaládba tartoznak a 2S albuminok, a nem-specifikus lipid transzfer fehérjék (nsLTP) és a gabona eredetű tripszin/alfa-amiláz inhibitorok. Ezek a fehérjék szerkezeti hasonlóságot mutatnak egymással, és ellenállóak a hőkezeléssel és proteolízissel szemben (BREITENEDER és CLARE MILLS, 2005). Funkciójukat tekintve tripszin/ $\alpha$ -amiláz inhibitorok, illetve lipid transzfer fehérjék, melyek diszulfid hidakkal keresztkötöttek és így hő- és kémiai kezelésnek, proteolízisnek ellenálló komponensek. A kupin család funkcionálisan változatos fehérjéket tartalmaz (BREITENDER és CLARE MILLS, 2005). Legfontosabb allergének a hüvelyesekben a vicilin-típusú (7S) és a legumin-típusú (11S) tartalékfehérjék. A növényi védekező-rendszerhez tartozó fehérjéket a Bet v 1 szupercsaládba sorolták, melynek jelentős tagja a PR (pathogenesis-related) fehérjecsalád. Ennek tagjai főként olyan proteáz inhibitorok, amelyek a patogénnel és a környezeti stresszel szemben védik a növényeket (RAUDER és BREITENEDER, 2007). A profilinokhoz kis molekulatömegű fehérjék tartoznak, általában hőre érzékenyek, ezért a profilinok által kiváltott allergia leginkább nyersen fogyasztott zöldségek, gyümölcsök esetében és légúti allergia formájában nyilvánul meg (BREITENEDER és RADAUER, 2004).

A hüvelyesek által kiváltott allergének közül eddig legtöbbet tanulmányozták a szója és a földimogyoró allergén fehérjéit. Legfőbb szója allergénként azonosították a *Gly m Bd 30K* (P34) thiol-proteáz fehérjét (OGAWA és mts., 1991; HELM és BURKS, 2000). Emellett fő allergének továbbá a 7S albumin frakcióban lévő béta-conglycinin tartalékfehérje (*Gly m 5*) (OGAWA, 1995; HOLZHAUSER és mts., 2009) és a 11S albumin frakcióban lévő glycinin tartalékfehérje (*Gly m 6*) (HOLZHAUSER és mts., 2009). Kisebb jelentőségű allergének a szója lektin és a Kunitz-típusú inhibitor (BURKS és mts., 1994). Földimogyoróban szintén több allergén fehérjét azonosítottak. Fő allergének a 7S globulin tartalékfehérjékhez tartozó *Ara h 1* (BURKS és mts., 1991; RABJOHN és

mts., 1999), a 2S-albumin családhoz tartozó *Ara h 2* (BURKS és mts., 1992; RABJOHN és mts., 1999), a 11S globulinokhoz tartozó *Ara h 3* fehérje (KOPPELMAN és mts., 2003) továbbá az *Ara h 4*, *Ara h 5*, *Ara h 6*, *Ara h 7* fehérjék (RABJOHN és mts., 1999). A borsó fő allergénjei a vicilin és konvicilin frakcióban találhatóak (SANCHEZ-MONGE és mts., 2004). Kevesebb adat áll rendelkezésre bab fehérjék allergén hatására vonatkozóan.

### 1.2.2. Hüvelyes fehérjék emészthetősége

A biológiailag aktív fehérjék felszívódása és hasznosulása akkor történik meg, ha azok a bél nyálkahártyáját megfelelő szerkezeti épségben vagy nagyobb fragment formájában érik el, melynek feltétele, hogy az emésztőenzimekkel szemben rezisztenciát mutassanak és így a gasztrointesztinális emésztés során aktivitásukat meg tudják őrizni.

Számos olyan növényi fehérjét találtak, amelyek az emésztőrendszer enzimeivel szemben rezisztensek voltak. Ezt azok szerkezeti tulajdonságaival magyarázták (CARBONARO és mts., 2006; DESHPANDE és mts., 1989).

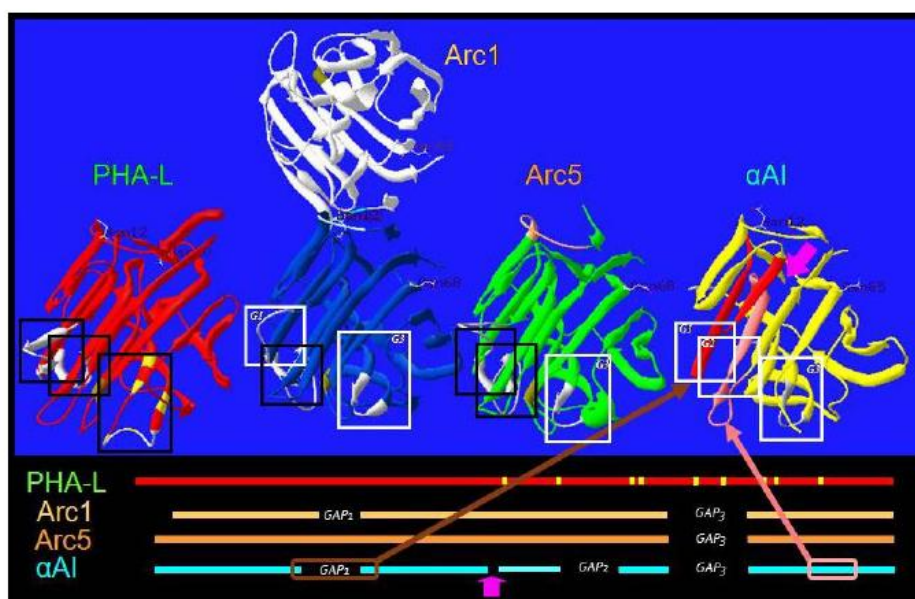
A harmadlagos szerkezetet tekintve az állati eredetű fehérjékkel szemben a hüvelyes eredetű fehérjéket magasabb számú  $\beta$ -lemez és alacsonyabb számú  $\alpha$ -hélix jellemezi (CARBONARO és mts., 2006). Ilyen szempontból az állati eredetű fehérjék közül kivétel a tehéntejben található  $\beta$ -laktoglobulin, amelynek nehezebb emészthetőségét valószínűleg annak magas számú  $\beta$ -lemezes szerkezete okozza (SAWYER és mts., 1993). A növényi fehérjék magas cisztein tartalommal rendelkező frakcióit találták rezisztensnek enzimes (tripszin, kimotripszin és pepszin) proteolízissel szemben. Ezt a stabilitást a nagyszámú diszulfid-híd eredményezi az alacsonyabb molekulatömegű fehérjékben, mit például a Bowman-Birk inhibitor (BBI) (FARIS és mts., 2008). A BBI fehérjék hüvelyesekben 14 konzervált cisztein szerkezettel rendelkeznek és a láncok között diszulfid hidak vannak. Az ilyen stabil szerkezetű növényi fehérjék képesek az emésztőenzimeknek ellenállva a gasztrointesztinális rendszeren, a bél nyálkahártyán is továbbhaladni és akár az immunrendszert érzékenyíteni. Továbbá ezeknek a fehérjéknek a hipervariabilis régióit több esetben IgE-reaktívnek találták (MORENO és CLEMENTE, 2008). KUMAR és mts. (2011) vörös vesebabok fehérjeinek emészthetőségét és IgE-reaktivitását vizsgálva öt olyan fehérjesávon talált a 170, 100, 43, 34 és 20 kDa molekulatömeg tartományban, amelyek ellenálltak az *in vitro* pepszines emésztésnek és IgE-reaktivitást mutattak. LE GALL és mts. (2007) a borsó fehérjefrakcióinak emészthetőségét vizsgálta sertés etetési kísérletek során. A gyomorban a vicilin, lektin és az albumin frakció egyáltalán nem, míg a legumin részlegesen emésztődött. A legumin és a vicilin frakció a vékonybélben már kevesebb, mint 3 óra alatt teljesen elbomlott. Az emésztést követően a vékonybélben az albumin

frakció egy 15 kDa molekulatömegű peptidjét és egy 20 kDa molekulatömegű lektint azonosítottak, melyek az emésztéssel szemben rezisztenciát mutattak.

### 1.3. Babok (*Phaseolus vulgaris*) fehérjéi

A babok fehérjetartalma szárazanyag tartalomra vonatkoztatva átlagosan 20-28 %. A legnagyobb frakcióhoz a tartalékfehérjék tartoznak, amelyek a teljes fehérjetartalom 80 %-át jelentik.

A tartalékfehérjék frakciói a phaseolin (7S globulinok) és a legumin (11S globulinok). Az ún. APA-fehérjék (alfa-amiláz inhibitorok,  $\alpha$ AI; fitohemagglutininek, PHA; arcelinek, Arc) valamint a lektin-típusú polipeptidek (SPARVOLI és BOLLINI, 2014) a bioaktív fehérjék csoportjába sorolhatók (DURANTI, 1996). Más hüvelyesekkel ellentétben a phaseolin a teljes magfehérje 50 %-át jelenti, amíg a legumin csak 10 %-át. Az APA-fehérjék a teljes magfehérje további 15 %-át jelentik, melyek növényi kártevők elleni védő funkcióval rendelkeznek. Ezt a három fehérjét egy multi-gén család kódolja, amely egy közös lektin-génből alakult ki (3. ábra).



**3. ábra:** Az APA-fehérjék lineáris és 3D szerkezetének összehasonlítása (SPARVOLI és BOLLINI, 2014)

A PHA-L lineáris szerkezetében a sárga pontok a szénhidrátkötő helyeket jelölik. A fehér keretek az Arc és az  $\alpha$ AI 3D szerkezetében található deléciós részeket mutatják, ellentétben a PHA-L 3D szerkezetével, ahol a megfelelő deléciós helyek fekete kerettel jelzettek. A barna és a rózsaszín nyilak az  $\alpha$ AI enzim felismerő helyeit jelölik. A ciklámen nyíl azt az aminosav pozíciót jelöli, ahol az  $\alpha$ AI prekursora aktív inhibitorrá processzálódik.

Az  $\alpha$ AI és az Arc a PHA csonkított formái, amelyben az egy vagy két szénhidrátkötő helyet tartalmazó rész hiányzik. Az  $\alpha$ AI esetében a fehérje aktiválódásához a prekursor polipeptid két

kisebbségére való bomlása szükséges. Az így aktiválódott fehérje az emlős és a rovar alfa-amilázok inhibitora. Az Arc biológiai aktivitásáról még hiányosak az ismeretek, azonban jelenléte szintén összefügg két fő kártevő, a bab zsiszik (*Acanthoscelides obtectus*) és a mexikói bab zsiszik (*Zabrotes subfasciatus*) elleni rezisztenciával. A phaseolin és az APA-fehérjék általában rezisztenciát mutatnak a humán és monogasztrikus állatok emésztőenzimeinek proteolízisével szemben, melyben főként a másodlagos szerkezeti elemek konformációjából adódó sajátosságok játszanak szerepet. Ezek a magas  $\beta$ -lemez és glükán szerkezet arány, amelyek limitálják az emésztőenzimek hozzáférhetőségét a fehérjéhez, ezáltal rezisztenssé teszik azt a proteolízissel szemben. A babfajták (*P. vulgaris* és *P. occineus*) természetes variabilitásától függően a különböző genotípusokban különböző kombinációkban lehetnek jelen a tartalékfehérjék. Például, míg a legtöbb genotípusban a PHA és  $\alpha$ AI nagy arányban van jelen, addig az Arc csak a közép-mexikói vad fajtákban található meg. Vannak APA-mentes genotípusok és néhány csak  $\alpha$ AI-t tartalmazó genotípust is leírtak, de phaseolint nem tartalmazó genotípus csak a *Phaseolus coccineus* fajták között található. Ennek a variabilitásnak köszönhetően a babok termesztése során fontos szempont lett azok fehérje összetételének figyelembevétele a magasabb tápértékű fajták termesztése érdekében. Például a kén-tartalmú aminosav összetétel növelése érdekében phaseolin-mentes fajták nemesítése jelenthet megoldást, illetve PHA- és Arc-mentes fajták nemesítésével magasabb  $\alpha$ AI tartalmat érhetünk el (SPARVOLI és BOLLINI, 2014).

### 1.3.1. Bab eredetű $\alpha$ AI-ok

Hat különböző  $\alpha$ AI családot azonosítottak növényekben. Ezek a lektin típusú, a gabona típusú, a Knottin típusú, a  $\Gamma$ -phurothionin típusú, a Kunitz típusú és a Thaumatin típusú  $\alpha$ AI családok (BELLINCAMPI és mts., 2004). A legjobban tanulmányozott  $\alpha$ AI-ok a gabonafélékben és hüvelyesekben találhatóak (LE-BERRE-ANTON és mts., 1997). Eddigi tanulmányok szerint búzában (SAUNDERS és mts., 1973; SILANO és mts., 1973; BUONOCUORE és mts., 1977), rizsben (IULEK és mts. 2000), kölesben (RAJENDRAN és THAYUMANAYAN 2000), árpában (GOESAERT és mts. 2001), amarantban (WANG és mts. 2004), mogyoróban (IRSHAD és mts., 1981), csicszeriborsóban (SINGH és mts., 1982) és babokban (BOWMAN, 1945; MARSHALL és LAUDA, 1975) azonosítottak  $\alpha$ AI-okat. JAFFÉ és mts. (1973) amiláz inhibitor aktivitást detektált 79 hüvelyes fajtában, melyek közül a legnagyobb aktivitással a vesebab fajták rendelkeztek (JAFFÉ és mts., 1973).

Babokban elsőként 1945-ben azonosítottak  $\alpha$ AI-t (BOWMAN, 1945), majd először Marshall és Lauda izolálták 1975-ben fehér vesebabból (MARSHALL és LAUDA, 1975). Azóta több babfajtából is sikeresen izoláltak inhibitor, többek között vörös vesebabból (POWERS és

WHITAKER., 1977), fekete babból (FILHO és LAJOLO., 1985), tarkababból (YAMADA és mts., 2001) és fehér vesebabból (YANG és mts., 2008).

Az  $\alpha$ AI-ok gátolják bizonyos alfa-amiláz enzimek aktivitását, viszont nem gátolják a növényi alfa-amiláz aktivitást. A növényi  $\alpha$ AI fehérjéknek három izoformája létezik; az  $\alpha$ AI -1, az  $\alpha$ AI -2 és az  $\alpha$ AI-3 (vagy  $\alpha$ AI-L; alfa-amiláz inhibitorhoz hasonló). A babokban lévő  $\alpha$ AI-1 gátolja a humán és a rovar nyál- és pankreatikus alfa-amiláz aktivitását (BELLINCAMPI és mts., 2004). Az  $\alpha$ AI-2 kizárólag némely rovar enzimét gátolja (SVENSSON és mts., 2004) és nem gátolja az emlősök enzimének aktivitását az  $\alpha$ AI-1-el szemben (MORTON és mts., 2000). A harmadik forma, az  $\alpha$ AI-3 teljesen inaktív az alfa-amiláz enzimmel szemben, ez a forma feltételezhetően egy evolúciós köztes termék a fitohemagglutinin (PHA) és a másik két aktív forma között (BELLINCAMPI és mts., 2004). Az inhibitor egy előfehérjéből származik, amelynek a natív molekulatömege 28 kDa körüli (MORENO és mts., 1990). Ez az előfehérje az endo-plazmás retikulumban szintetizálódik. A Golgi-apparátusban glükán részek kapcsolódnak a fehérjeláncra, így megnövelve annak tömegét 32-36 kDa-ra. Végül a fehérje tároló vakuolumokba kerül, ahol a C-terminális végeken az aszparagin részek leválása két alegységet ( $\alpha$ - és  $\beta$ -lánc) eredményez.

A bab  $\alpha$ AI-ok szerkezete több forrás alapján is ismert. Tanulmányozásukra bioanalitikai és proteomikai módszereket alkalmaztak.

#### **1.4. Elektroforetikus módszerek fehérjék molekulatömeg és izoelektromos pont szerinti jellemzésére**

*Egydimenziós gélelektrofozézis (1-DE).* Az elektroforézis napjaink egyik legelterjedtebb fehérjevizsgálati módszere. Lényege, hogy az oldatban lévő makromolekulák elektromos erőterben elektromos töltésüknek, méretüknek, és alakjuknak megfelelően vándorolnak. A fehérjék semleges pH-n pozitív vagy negatív töltéssel rendelkeznek, elektromos erőterben töltésükkel ellenkező töltésű pólushoz vándorolnak. A PAGE közegeként használt poliakrilamid gél akrilamid és N,N'-metilén-bisakrilamid keresztkötéseivel és gyökös polimerizációjával alakul ki, amely során így, egy térhálós szerkezetű gél jön létre. A polimerizációt az ammónium-perszulfát és a TEMED katalizátorok segítik. A gél pórusszerkezete változtatható, ennek köszönhetően molekulaszűrő tulajdonsággal rendelkezik, így a fehérjék nemcsak töltésük, hanem méretük szerint is elválaszthatóak. Az akrilamid koncentrációjának növekedésével a gél pórusmérete csökken, ezzel pedig a fehérjék gélen keresztüli vándorlási sebessége is csökken. A gélek mechanikai tulajdonságai általában 5 és 15% akrilamid koncentráció között kedvezőek. A különböző molekulatömegű fehérjék elválasztásához szükséges akrilamid koncentrációkat a 3. táblázat mutatja.

A keresztkötést kialakító N,N'-metilén biszakrilamid mennyisége általában az akrilamid 1-3 %-a. A poliakrilamid további előnyös tulajdonsága, hogy hidrofíl, nem hordoz töltéseket és kémiaiilag stabil és az elválasztandó fehérje mintával nem lép kölcsönhatásba.

**3. táblázat:** Poliakrilamid géleknél használt akrilamid koncentrációk az elválasztandó fehérjék molekulatömegének függvényében

<b>Akrilamid koncentráció (%)</b>	<b>Az elválasztás lineáris tartománya (kDa)</b>
15	12-43
10	16-68
7,5	36-94
5,0	57-212

Az elválasztás hatékonyságát az akrilamid koncentráció mellett a pH helyes megválasztása befolyásolja, ami pedig a gélben lévő puffer és az elválasztáshoz használt (puffertartályban) puffer pH-ját jelenti. Az elválasztást az izoelektromos pontnál magasabb pH értéken végezzük, amikor a fehérjék töltése negatív. A puffer szerepe a pH állandó értéken tartása mellett az áram vezetése is. Ha az elektroforézist nem denaturáló (natív) közegben és alacsony hőmérsékleten végezzük, akkor az enzimek megőrzik aktivitásukat és natív szerkezetüket, így az aktivitásuk alapján is kimutathatóak a gélen.

Lehetőség van a fehérjék denaturált állapotában történő elválasztásra is, erre alkalmas a SDS-PAGE, ahol a gél nátrium-dodecilszulfátot (SDS) tartalmaz. Ez a detergens hő hatására a fehérjék hidrofób részeihez kapcsolódva azokat úgy denaturálja, hogy kitekeri a fehérjeláncot, és negatív töltést kölcsönöz nekik. A fehérjeoldatokhoz  $\beta$ -merkaptóetanol redukálószerrel adva, a peptid láncok közötti diszulfid hidak felbomlanak és a fehérje alegységeire bomlik. Az SDS-al kezelt fehérje nettó töltése egyenesen arányos lesz a méretével, s így a mobilitását már csak a mérete és a molekulatömege határozza meg. A kisebb molekulatömegű fehérje gyorsabban halad a gélben. A fehérjék detektálására az elválasztás után többféle festési eljárás használatos. A leggyakrabban alkalmazott a Coomassie Blue R-250 és a nagyobb érzékenységű ezüsfestés.

*Izoelektromos fókuszálás.* Az izoelektromos fókuszálás egy pH grádiensen zajló elektroforézis, amelynek során a fehérjéket izoelektromos pontjuk szerint választjuk el. Ekkor a fehérjék nettó töltése függ a közeg pH értékétől. Ha a fehérje izoelektromos pontjánál alacsonyabb a közeg pH értéke, akkor a fehérje töltése pozitív lesz és a katód felé vándorol. Ha a közeg pH értéke a fehérje izoelektromos pontjánál magasabb, akkor az anód felé történik a vándorlás. Ha a közeg pH értéke megegyezik a fehérje izoelektromos pontjával, akkor a fehérje nettó töltése nulla



lesz, az elektromos erőterben nem tud elmozdulni és megáll az izoelektromos pontjának megfelelő pH értéknél. Az elválasztó gél alacsony koncentrációban akrilamidot és amfoter elektrolytokat (amfolitok, 300-900 Da) tartalmaz. Az amfolitok a gélben a fehérjékhez hasonlóan vándorolnak miközben pH grádiens alakítanak ki. Ezeknek különböző töltésű változatai vannak, így különböző grádiens kialakító amfolit keverékek szerezhetőek be kereskedelmi forgalomban. A legelterjedtebbek a pH 3-10 vagy pH 4-7 közötti grádiens gélek. Gyártótól függően tartalmazhatnak karboxil-, amino- és szulfo csoportokat (HAJÓS és IDEI, 2001).

*Kétdimenziós gélelektroforézis (2-DE).* A kétdimenziós elektroforézis módszer kidolgozása O'Farrell (1975) és Klose (1975) nevéhez fűződik, akik komplex fehérjeminták (testfolyadék, sejtek, szövetek, organizmusok) elválasztására alkalmazták először a módszert. Amíg az SDS-PAGE elválasztással a fehérjék molekulatömegéről kapunk információt, az izoelektromos fókuszálással pedig csak azok savas vagy bázikus jellegéről. Ezt a két metodikát kombináló, a proteom összetételét leginkább láthatóvá tevő módszer a kétdimenziós gélelektroforézis (RABILLOUD, 2002). Ennek során a fehérjéket az első dimenzióban izoelektromos pontjuk alapján választjuk el izoelektromos fókuszálással, majd a második dimenzióban pedig a SDS-PAGE módszert alkalmazzuk. Így az ugyanazon izoelektromos ponttal rendelkező, de eltérő molekulatömegű fehérjék is elválaszthatóak egymástól, további információt adva a keresett fehérjéről. Az élelmiszer analitikában, növényi és állati fehérjék vizsgálatában és összetételük meghatározásában, valamint a fehérje kutatásban fontos szerepe van a 2-DE alkalmazásának. A módszer jobb reprodukálhatóságának érdekében kifejlesztették az immobilizált pH grádiens (IPG) tartalmazó gélcsíkokat. Az első dimenzióban történő izoelektromos fókuszálás előtt a gélcsíkokat rehidratálni kell, ami általában nagy karbamid tartalmú, nem-ionos detergenst tartalmazó oldat jelenlétében történik. A fókuszálást követő egyensúlyozás célja pedig a fehérjék SDS-el történő burkolása, és az egységes pH kialakítása. Ezt követi az SDS-PAGE elválasztás a fentiekben ismertetett módon.

*Kapilláris elektroforézis.* Az 1980-as években gyors fejlődés indult a kapilláris elektroforézis alkalmazás technikájában. JORGENSEN és LUKACS (1981) elkészítették az első kapilláris elektroforézis berendezést, amelynek működési elve az elektro-ozmotikus áramláson alapul. Az elválasztás egy vékony molekulaszűrő géllel töltött kapillárisban történik. A kis belső átmérőjű (75 µm) kapillárisban kialakuló elektro-ozmotikus áramlás a részecskéket minimális diszperzióval szállítja. Előnye, hogy minimális minta mennyiséget igényel (1-10 nl), és automatizálható a rendszer. A kapilláris falán elektromos töltésű csoportok (általában negatív) vannak. Negatív töltésű csoportokat tartalmazó kapilláris esetében az elválasztandó mintában lévő kationok a falhoz vándorolnak, ahol egy kettős réteget alakítanak ki. A kapilláris két végére feszültséget kapcsolva a felületen lévő kationok elmozdulnak a negatív töltésű elektród irányába,

így mozgásba hozva a minta ionjait. Mivel ez az elektro-ozmotikus áramlás nagyobb, mint az anionok effektív mozgékonyasága, azért azok is vándorolni fognak. Így analizálhatóak egyaránt a kationok és anionok is. A kapilláris nagy elektromos ellenállása miatt rendkívül nagy térerő alakul ki, a folyamat közben kevés hő fejlődik, amely a kapilláris nagy felület/térfogat aránya miatt jól eloszlik. A nagy elektromos térerőnek köszönhetően rövidül a mérési idő és nagy az elválasztás hatékonysága. A kapilláris elektroforézis számos előnyének köszönhetően ma már miniatürizált, folyadékokban végrehajtott vizsgálatok területén rohamosan fejlődik, ami egyre nagyobb mintaszámú, viszont kisebb térfogatú minták elemzését teszi lehetővé.

„*Lab-on-a chip*” technika (LOC). Az elválasztás technika miniatürizálásának egyik ma már használatos példája a chip-technika. Napjainkban, ezért egyre nagyobb igény van a nagy hatékonyságú, automatizált és miniatürizált rendszerek fejlesztésére. Ezek a fejlesztések megjelentek az elektroforézis körében is, amikor az 1990-es években kifejlesztették az elektroforetikus chip-technikát, amit „lab-on-a chip” technikának is neveznek. Az elválasztás kisméretű üveglapokban kialakított csatornában történik. A többcsatornás rendszernek köszönhetően egyidejűleg több minta is elemezhető. A csatornák a chip felszínén nyílásokkal rendelkeznek, amelyek az oldatok (minta, gél, pufferek) bejuttatására szolgálnak. A nyílásokba merülő elektródok segítségével elektromos mező alakul ki, amely a mikro-chipen lévő minták mozgását és elektroforetikus elválasztását teszi lehetővé. A detektálás lézer által indukált fluoreszcens módon történik. A technika legfőbb előnye a hagyományos elektroforézissel szemben a kevesebb mintamennyiség, a gyors elválasztás, a nagy érzékenység, a jó reprodukálhatóság és az egyszerű kezelhetőség. A festés és a detektálás automatikusan zárt rendszerben történik (BOUSSE és mts., 2001).

### **1.5. A fehérjék elválasztására használt kromatográfiás módszerek**

A kromatográfia körébe tartoznak azok az elválasztástechnikai módszerek, amelyeknél a vizsgálandó minta komponensei egy állófázis és egy azzal érintkező mozgófázis közötti anyagátmeneten vagy a két fázissal való, eltérő kölcsönhatás alapján válnak szét. A fehérjék elválasztásában négy fő kromatográfiás eljárás használatos: az ioncserés, a méretkizárásos, hidrofób kölcsönhatású és az affinitás kromatográfia (KENNEY és FOWELL, 1992). Ezek közül azokat részletezem, amelyeket kutatásaim során alkalmaztam.

*Ioncserés kromatográfia.* Mivel a fehérjék töltéssel rendelkező molekulák, hatékonyan elválaszthatók ioncserés kromatográfiás oszlopon, ahol az oszlop töltete egy olyan oldhatatlan hordozó (mátrix), amelynek felszínén elektrolitos disszociációra képes csoportok vannak. A mátrix töltött csoportjai körül ellentétes töltésű ionok ionfelhőt képeznek, amelyben az ionok reverzibilisen

kicserélhetők a mozgó fázis hasonló jellegű ionjaival. Ha a mátrix töltése pozitív, akkor az oldatból negatív ionokat köt meg, ezért anioncserélőnek nevezzük. Ha a mátrix töltése negatív, akkor kationcserélőről beszélünk. Az ioncserés elválasztás során a fehérjék nettó töltése határozza meg azt, hogy kation vagy anioncserélőt kell-e használnunk. Az elválasztást a kromatografálás hőmérséklete, az eluáló puffer ionkoncentrációja és pH-ja határozza meg. Fehérjék és peptidek elválasztásához szintetikus műgyantákat, cellulóz alapú ioncserélőket vagy ioncserélő géleket alkalmaznak. A legelterjedtebb kationcserélő cellulóz származékok a karboxi-metil- (CM) cellulóz, és foszforilált (P) cellulóz. Az anioncserélők közül pedig a dietil-amino-etil- (DEAE) cellulózt alkalmazzák leggyakrabban (BOMAN és WESTLUND, 1956).

*Méretkizárásos kromatográfia.* A méretkizárásos kromatográfiát más néven gélszűrésnek is nevezik. Ennek az a lényege, hogy a szétválasztandó komponensekből álló elegyet duzzasztott gélszemcsékből álló rendszerre visszük, amelyen az eltérő méretű komponensek különböző sebességgel haladnak keresztül és ennek megfelelően elkülönülve hagyják el a rendszert. Az oszlop töltete egy 10-300 µm átmérőjű gömbökből álló, hidrofil gél, amelynek szelektivitását a pórusméret határozza meg (ANDREWS, 1965).

*Fordított fázisú kromatográfia.* A fordított fázisú kromatográfiás elválasztások a hidrofób kölcsönhatások elvén működő elválasztások közé tartoznak. Az álló fázis felülete apoláris, a mozgó fázis felülete poláris. Álló fázisként leggyakrabban módosított szilikagélt alkalmaznak (a szilikagél felülete C6-, C8-, C18- fenil csoporttal módosított). Ekkor az apoláros molekulák retenciós ideje hosszabb, ellentétben a normál fázisú oszlopokkal, ahol az apoláros molekula hagyja el legelőször az oszlopot. A fő eluáló komponens (a mozgó fázis) a víz, amely módosítható acetonitrillel, metanollal. A detektálás történhet UV-detektorral vagy fluoreszcens detektorral, melynek kiválasztása mindig a szétválasztandó komponensek tulajdonságaitól függ (KENNEY és FOWELL 1992).

## **1.6. Proteomikai és tömegspektrometriás módszerek a fehérjék szerkezetének vizsgálatában**

*Proteomika.* A proteomika kifejezés az élő szervezetekben (sejtekben, szövetekben) megtalálható fehérjeállomány (proteom) vizsgálatait foglalja össze (ANDERSON és ANDERSON., 1998). A fehérjék vizsgálatán belül ma már egyre tágabb értelmezésben is használatos. A proteomikán belül, az utóbbi években, előtérbe kerültek a kvantitatív fehérje meghatározási módszerek. Ezek célja a fehérjék illetve azok módosulásainak (pl. poszt-transzlációs módosulások) azonosítása, feltérképezése, a fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata, továbbá szerkezet és funkció vizsgálatok. Már az 1970-es években leírták a kétdimenziós elektroforézis alapjait, amelyek

fontos részét képezik a mai proteomikai kutatásoknak (O'FARREL, 1975). Az 1990-es évektől a proteomika másik legfontosabb eszköze a tömegspektrometria lett. A tömegspektrometrián alapuló fehérjevizsgálati módszerek alapkövetelménye volt a megfelelő ionizációs technikák kifejlesztése. A legnagyobb áttörést két új ún. kíméletes (soft) ionizációs eljárás kifejlesztése jelentette az 1980-as években, amelyet ma is alkalmaznak fehérjék és peptidek azonosítására. Ezek a mátrix által segített lézerdeszorpciós ionizáció (MALDI) (KARAS és HILLENKAMP., 1988) és az elektroporlasztásos ionizáció (ESI) (FENN és mts., 1989). A fehérjék elválasztása és azonosítása után a harmadik fő proteomikai módszer a protein informatika, ami különböző algoritmusok és adatbázisok segítségével nagymértékben hozzájárul a kutatásokhoz. Ezek napjainkban is rohamosan fejlődnek és egyre bővülő adatbázisok állnak rendelkezésünkre.

*Tömegspektrometria.* Az elektroforézis technikák esetében a fehérjék azonosításánál problémát jelenthet a detektálás gyengesége. Amikor egy mátrixban kis mennyiségben előforduló fehérjét szeretnénk azonosítani akkor érzékenyebb módszerre van szükségünk. A tömegspektrometria kis mennyiségben (femtomólnyi) és bonyolult mátrixokban jelen lévő komponensek kvalitatív és kvantitatív meghatározására is alkalmas módszer. A tömegspektrometriás vizsgálatoknál a minta ionos részecskéit választjuk el fajlagos tömegük ( $m/z$ ) szerint csökkentett nyomáson elektromos vagy mágneses mezők segítségével. Az elválasztott ionok intenzitását mérjük, így kapjuk meg a tömegspektrumot. Az ionintenzitás a molekulatömegre és a szerkezetre jellemző. A vizsgálni kívánt vegyületből pozitívan vagy negatívan töltött ionokat hozunk létre, amelyeket fajlagos tömegük ( $m/z$ ) szerint választunk el, majd detektálunk. A tömegspektrométer részei a mintabeviteli rendszer, az ionforrás, az analizátor, a detektor, a vákuumrendszer, az adatkezelő és szabályozó számítógép. A mintabevitel történhet gáz, folyadék vagy szilárd formában. A szilárd mintát elpárologtatjuk, majd a gáz vagy folyadék halmazállapotú mintát egy erre megfelelő eszközzel bejuttatjuk a rendszerbe. Az ionforrás feladata, hogy a mintából gerjesztő energia segítségével ionokat hozzon létre, és az analizátorba juttassa azokat. Ez az ionizáció létrejöhet elektronütköztetéssel, kémiai ionizációval, gyors atombombázásos ionizációval, mátrix közvetített lézer deszorpciós ionizációval (MALDI), vagy elektropray ionizációval (ESI). Az ionforrásból érkező ionokat az analizátor fajlagos tömegük szerint választja szét. A detektor feladata, hogy az ionok számával azonos intenzitású jelet adjon. Az ionok repüléséhez szükséges szabad utat a vákuumrendszer biztosítja. A tömegspektrometria rohamos fejlődésével egyre több ionizációs módszer és analizátor létezik, ezek közül azokat ismertetem részletesen, amelyekkel a kutatásaim során dolgoztam.

Az elektropray ionizáció egy porlasztáson alapuló ionizáció, ahol a minta folyadéka áramon keresztül egy feszültség alatt lévő kapillárisba kerül. A kapilláris és egy ellenelektrod között kialakuló elektrosztatikus tér hatására, a kapillárisból kilépő folyadék, töltéssel rendelkező

cseppekre esik szét. A nagy feszültség mellett porlasztó gáz (nitrogén) segíti az ionizációt, majd a szabaddá vált ionok az analizátorba kerülnek. Az ESI technika a nagy ionizációs hatásfoka miatt rendkívül érzékeny módszer ( $10^{-12}$  -  $10^{-15}$  mol), amely alkalmas ionos, poláris és polarizálható vegyületek vizsgálatára mind pozitív, mind negatív töltésű ionok létrehozásával. Többszörösen töltött ionok (3-100 szoros) képződése lehetővé teszi a nagy molekulatömegű vegyületek (proteinek, glikoproteinek, oligonukleotidok) vizsgálatát. Egyszerűen kapcsolható kromatográfiás módszerekkel és mennyiségi meghatározásra is alkalmas. Hátránya, hogy csak illékony oldószerekkel (pl. ammónium-acetát) alkalmazható, mivel a kevésbé illékony oldószerek és a sók elszennyezik az ionforrást, és ez csökkenti a módszer érzékenységét.

Az ionforrásban keletkező pozitív töltésű ionokat az ionforrás egy negatív U gyorsító feszültség bekapcsolásával indítja az analizátorba. A repülési idő (TOF, time of flight) analizátorokban az ionoknak ismert hosszúságú utat kell megtenniük, és az ehhez szükséges időt mérik. A különböző tömegű ionok különböző sebességgel repülnek, és időben külön-külön érik el a detektort. A repülési idő függ az ionforrás-detektor távolságtól, a gyorsító feszültségtől és a fajlagos tömegtől. Így a detektorban adott pillanatban mért intenzitás adott ionhoz rendelhető.

Biológiai mintákból származó fehérjék azonosítására két fő tömegspektrometriás módszer terjedt el. Ezek az ún. „bottom up” és a „top down” módszerek. A „bottom up” eljárással enzimesen hasított fehérjéket vizsgálunk. Az emésztés történhet oldatban vagy 1-DE illetve 2-DE elválasztást követően. Az emésztésből nyert minta akár több száz peptidet is tartalmazhat. A komplexitás csökkentése érdekében az emésztett mintát kromatográfiásan is elválaszthatjuk. A „top down” eljárás során a tömegspektrométerbe juttatott intakt fehérjék ionizált molekuláit tudjuk vizsgálni. Ezeknél a vizsgálatoknál ESI vagy MALDI ionizációt alkalmaznak. A „top down” technika előnye, hogy nincs szükség a fehérjék időigényes enzimes emésztésére, így a teljes protein szekvencia vizsgálható, és lehetőség van poszt-transzlációs módosulások analízisére is. Többszörösen töltött ionok keletkezése a MALDI ionizációval szemben előnyös, viszont az így kapott tömegspektrumok értelmezése bonyolultabb, nehezebb. Hátránya ezen kívül, hogy a vizsgálandó fehérjék molekulatömegének felső korlátja 50 kDa. A „top down” módszerekhez rendelkezésre álló bioinformatikai eszközök, adatbázisok még kevésbé fejlettek, mint a „bottom up” módszer eszközei.

## **1.7. Elválasztástechnikai módszerek alkalmazása a bab $\alpha$ AI-ok izolálása és jellemzése során**

A bab  $\alpha$ AI-ok izolálására eddig többféle eljárást dolgoztak ki. Marshal és Lauda fehér vesebabból nátrium-kloriddal való extrakció után desztillált vízzel szembeni dialízist követően három további kromatográfiás (DEAE-cellulóz, Sephadex G-100, CM-cellulóz) lépéssel végezte az

izolálást. Az izolált fehérje molekulatömegét 45000-50000 Da-nál állapították meg Sephadex G-200 oszlopon. A hőstabilitás vizsgálata során 10, 20 és 30 percig 100°C-os kezelés után megfigyelték, hogy a fehérje 10 perc után teljesen inaktiválódik (MARSHALL és LAUDA, 1975). Később, POWERS és WHITAKER (1997) etanolos frakcionálás után DEAE- és CM- cellulóz kromatográfiás oszlopon tisztította a fehérjét vörös vesebabból, amelynek molekulatömegét szintén 49000 Da-nál detektálták. Merkaptó-etanol redukálószer jelenlétében három fő fehérjesávot detektáltak az alacsonyabb molekulatömeg tartományban, ezek 15000-17000; 12000-15000; 11000-12000 Da molekulatömegek, valamint két kisebb sávot a 28000-32000 Da tartományban. A főbb sávok izoelektromos pontját 4,65, a kisebb sávok izoelektromos pontját 4,5 pH értéknél állapították meg. Továbbá meghatározták az izolált  $\alpha$ AI aminosav összetételét is, amely szerint az  $\alpha$ AI magas aszparaginsav, glutaminsav, szerin, treonin és valin tartalommal rendelkezik, viszont alacsony a cisztein tartalma és egyáltalán nem tartalmaz prolint (POWERS és WHITAKER, 1977).

YAMAGUCHI 1993-ban fehér vesebabból izolált  $\alpha$ AI-t, és az aminosav összetételről további részleteket publikált. A fehérjeizolálást ammónium-szulfátos kicsapással és phenyl-Sepharose oszlopon való elválasztás után acetát pufferrel szembeni dialízist követően CM-Sepharose oszlopon végezte. A tisztított fehérjét denaturáló körülmények között zajló méretkizárásos kromatográfiával alegységekre szeparálta és meghatározta az alegységekre vonatkozó aminosav összetételt, mely szerint az  $\alpha$ -alegység nem tartalmazott triptofánt, és ciszteint csak nyomokban. A  $\beta$ -alegységben nem detektált ciszteint, viszont csak nyomokban talált metionint. Mindkét alegységben volt viszont  $\alpha$ AI aktivitás. (YAMAGUCHI, 1993). MORENO és mts. affinitás kromatográfiával izoláltak bab  $\alpha$ AI-t, melynek SDS-PAGE mintázatán öt fehérjesávot azonosítottak 15000 és 19000 Da között és egy további sávot a 32000 Da tartományban (MORENO és CHRISPEELS, 1989; MORENO, 1990). További kutatások az  $\alpha$ -lánc szerkezetében két glikozilációs helyet határoztak meg, melyek főként mannózból állnak. Ezek a  $\text{Man}_6\text{-GlcNAc}_2$  (Man6) és  $\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2$  (Man9). Így, az  $\alpha$ -alegység molekulatömege 11647 Da. A  $\beta$ -láncon egy glikozilációs helyet azonosítottak, a  $\text{Man}_3\text{XylGlcNAc}_2$ , ennek molekulatömege pedig 16526 Da (PRESCOTT és mts., 2005).

### **1.8. Alfa-amiláz inhibitorok biotechnológiai jelentősége és élelmiszer-biztonsági kockázata**

A növényi rovar kártevők jelentős mezőgazdasági problémát jelentenek, világszerte csökkentik a terméshozamot. A hüvelyes növényeknél is fennáll a rovar kártevők által okozott veszteségek veszélye. Egyes kártevők, mint a tehénborsó és az azuki bab kártevője a tárolás alatt támadják meg a növényt. Ezzel ellentétben a zöldborsó kártevője a borsó zsizsik (*Bruchus pisorum*) a termőföldön fejlődésben lévő növényt károsítja (SCHROEDER és mts., 1995). A termés veszteség pedig akár 40 % is lehet (SMITH, 1990). A borsó zsizsik alfa-amiláz enzimének

aktivitását, ezáltal a szénhidrát hasznosulását a babokban található  $\alpha$ AI-1 fehérje gátolni képes, így a kártevő még lárvá állapotban elpusztul.

### 1.8.1. Bab alfa-amiláz inhibitorok biotechnológiai jelentősége

A modern biotechnológia segítségével az ausztrál CSIRO kutatói a Tendergreen bab (*Phaseolus vulgaris* vs Tendergreen)  $\alpha$ AI-1 fehérjét kódoló gént borsóba (*Pisum sativum*) transzformálták, ezzel védelmet biztosítva a növény számára a kártevő ellen (SCHROEDER és mts., 1995). A genetikailag módosított (GM) borsó tehát egy *Agrobacterium*-mediált transzformáció terméke (SCHROEDER és mts., 1995). A kiméra  $\alpha$ AI-1 gént tartalmazó plazmid gén (pMCP3) konstrukcióját SHADE és mts. (1994) írták le. Míg a babokban a teljes fehérjetartalom 1-2 %-a az  $\alpha$ AI-1, addig a GM borsóban a transzformációt követően ez az arány 3 %. Ez a transzformáció jó stratégiának bizonyult a borsó kártevő elleni védekezésben (MORTON és mts., 2000).

Egy 2005-ben megjelent tanulmány szerint a Tendergreen bab eredetű  $\alpha$ AI-1 borsóban való expresszáldása során a fehérje szerkezete módosul, különösen annak glikozilációs foka, amely megváltoztatja a fehérje immunogén jellegét, és ebből következően annak allergén potenciálját is (PRESCOTT, 2005). MARSH és mts (2011) tömegspektrometriás eredményei alapján a Tendergreen bab és a GM borsó eredetű  $\alpha$ AI-1 glikozilációs mintázata különböző, viszont ez a különbség kisebb mértékű, mint más babok  $\alpha$ AI-ai közötti glikozilációs különbség. Egy későbbi tanulmányban CAMPBELL és mts. (2011) nagyobb felbontású tandem tömegspektrometriás módszerrel tovább vizsgálva az  $\alpha$ AI-1-t, szintén szerkezeti különbségeket talált a Tendergreen babból és a GM borsóból izolált  $\alpha$ AI-1-ben, de nem találtak magyarázatot a borsóban való eltérő immunogenitásra. Eredményeik alapján, mind a GM borsóból, mind a Tendergreen babból illetve más babfajtákból (Cannellini bab, Vörös vesebab, Tarkabab) izolált  $\alpha$ AI-1, Th1 és Th2 típusú ellenanyag választ indukálva hasonló immunológiai reakciót váltottak ki. Ennek alapján feltételezhető, hogy az  $\alpha$ AI-1 mindkét növényfajban immunogén tulajdonsággal bír. LEE és mts. (2013) további vizsgálataik során nem találtak erősebb ellenanyagválaszt a GM borsónál a babhoz képest. Bab  $\alpha$ AI-1-t tartalmazó transzgenikus hüvelyes növények (csicseriborsó, tehénborsó) minimális különbséget mutatnak az  $\alpha$ AI-1 szerkezetében (CAMPBELL és mts., 2011). LEE és mts. (2013) szerint az  $\alpha$ AI-1 immunogenitás szempontjából nem mutat különbséget a transzgenikus hüvelyesekben és a babban. LEE és mts. (2013) tanulmánya így, ellentmondásba került PRESCOTT (2006) publikációjával, mely szerint a GM borsó allergiás immunválaszt váltott ki egerekben, míg a bab nem. Az eltérő eredmény lehetséges magyarázata az érzékenyítési kísérletben alkalmazott egerek tartási- és etetési körülményei lehetnek. Míg PRESCOTT és mts. kizárólag a

GM borsó hatására írt le allergiás immunválaszt, addig LEE és mts. a Tendergreen babbal és a nem-GM borsóval etetett egereknél a GM borsóhoz hasonló immunválaszt detektált. Magyarázatuk szerint, a borsóban lévő lektin keresztreakcióba lép az  $\alpha$ AI-1-el. Azonban arra nem találtak választ, hogy ez a típusú immunválasz biológiailag releváns-e a humán immunválasszal.

### 1.8.2. Újonnan expresszáldott fehérjék allergén kockázatának vizsgálata

*A genetikai módosítás során expresszáldott új fehérjék allergén kockázatbecslése.* A genetikai módosítás hatására expresszáldott új fehérjék allergén kockázatbecslésénél az EFSA (2011) egy integrált, esetről esetre történő megközelítést javasol, ahol az evidenciák súlyozása alapján van lehetőség annak becslésére, hogy fennáll-e a tényleges kockázat. Ennek során elsősorban vizsgálni kell az új fehérje allergén kockázatát, potenciális adjuváns hatását, illetve a teljes GM-növény allergén kockázatát. Egy újonnan expresszáldott fehérje vizsgálatánál fontos tényező az eredeti és az újonnan expresszáldott fehérje közötti szerkezeti, biológiai és fizikokémiai ekvivalencia.

Az új fehérjék allergén kockázatának vizsgálatában az alábbi szempontokat kell tehát figyelembe venni:

- fennáll-e az aminosav szekvencia homológia és/vagy a strukturális hasonlóság az újonnan kifejeződött fehérje és az ismert allergének között;
- szekvencia homológia esetén, fennáll-e a kockázata annak, hogy az újonnan expresszált fehérje képes-e allergén választ kiváltani egy már érzékenyített betegben;
- elbomlik-e vagy képes biológiai aktivitását megtartani az új fehérje a pepszines emésztés során;
- képes- az új fehérje *de novo* allergén reakciót kiváltani.

Ennek megfelelően IgE keresztreaktivitás kockázata áll fenn, ha a teljes lánchosszban minimum 35 %-os szekvencia homológia és/vagy strukturális hasonlóság figyelhető meg az adatbázisokból (UNIPROT, SDAP, FARRP, ADSF, ProAP) már ismert allergén szekvenciákkal vagy 6 egymást követő aminosav teljes homológiát mutat a szekvenciákban. Az adatbázisok minőségét és teljességét a súlyozásnál azonban figyelembe kell venni. Ha fennáll a szekvencia homológia vagy a szerkezeti hasonlóság lehetősége ismert allergénekkel, akkor *in vitro* IgE reaktivitás vizsgálata szükséges allergiás egyének vérérumaival attól függően, hogy a transzformált gén ismert allergénforrásból származik-e vagy nem. A szelekció során olyan egyének sérumait használják, akik érzékenysége klinikailag bizonyított. A specifikus IgE reaktivitást ellenanyag alapuló immunanalitikai módszerekkel kell vizsgálni. Itt az antigén-ellenanyag



elsődleges kapcsolódása pillanatszerű, nem-kovalens kötésen alapuló reverzibilis folyamat, amelynek a fiziológias körülmények kedveznek. Az elektroforetikusan (1-DE vagy 2-DE) elválasztott fehérjék immunanalitikai vizsgálata membránra való blottolás után történik. A membránon rögzített antigént a specifikus ellenanyaggal inkubálják, majd egy enzimmel (leggyakrabban torma-peroxidázzal, HRPO) jelölt másodlagos ellenanyaggal (konjugátum) való inkubálás után az enzimhez adott szubsztráttal történő színreakció alapján detektálják az immunkomplex kialakulását. Ezt az eljárást immunblottnak vagy Western-blottnak nevezzük. Napjainkban, a proteomikát eredményesen alkalmazzák az új fehérjék azonosításában és kvantifikálásában (CHEN és mts., 2009). Az új fehérjék allergén kockázatának vizsgálatában gyakran alkalmaznak az antigén-ellenanyag elsődleges kapcsolódásán alapuló jelzéses módszereket (ELISA, RIA) kvantitatív célra.

*Tápcsatorna rezisztencia vizsgálatok.* Az allergén fehérjék közös jellemzője, hogy a gyomorban termelődő emésztőenzimmel, a pepszinnel szemben rezisztenciát mutatnak (ASTWOOD és mts., 1996) és az IgE epitópok a gyomorban lévő alacsony pH értéken is stabilak maradnak (BREITENEDER és CLARE MILLS., 2005). Annak ellenére, hogy megállapítást nyert, hogy nincs közvetlen korrelációs kapcsolat az allergén aktivitás és a pepszines emésztés között, mégis a kockázatbecslés általános szempontjai között ezt a kritériumot is fontosnak találták a súlyozásban (FU és mts., 2002; EFSA, 2010c).

Az élelmiszer-összetevők gasztrointesztinális emésztése során bekövetkező változások vizsgálatára az *in vitro* emésztési modellek széles körben eltértek. A modellek segítségével vizsgálható a komponensek emészthetősége, a szerkezeti változások, valamint a komponensek felszívódása. Az *in vitro* emésztési modellek a főbb élelmiszer-komponensek emésztőenzimeit alkalmazzák, mint például a fehérjék emésztéséhez proteázokat, lipidek emésztésre lipázokat és a keményítő emésztésére amilázokat. Az alacsony pH és nagy pepszin/fehérje arány mellett végzett pepszines emésztés nem tükrözi a fiziológias körülményeket, de meglehetősen standardizált körülmények mellett kivitelezhető. Bizonyos körülmények változtatásával, e módszer lehetőséget ad a még kifejtetlen immunrendszerű újszülöttek emésztését is modellezni, illetve a mátrixhatást elemezni. A végeredmény függvényében lehetőség van az intakt és a pepszinesen emésztett fehérje IgE reaktivitásának összehasonlítására is, mivel az újonnan expresszált fehérje immunológiai tulajdonságai az emésztés során megváltozhatnak. Az *in vivo* módszerek, mint az állati- vagy humán modellek alkalmazása biztosítja általában a legpontosabb eredményeket, azonban ezek sokkal időigényesebbek és nagyobb költséggel járnak, mint az *in vitro* módszerek. Ezért inkább az *in vitro* módszereket fejlesztették, finomították (HUR és mts., 2011), mert ezek jó alternatívái az állati- és humán modelleknek és rövidebb idő alatt érhető el eredmény. Az *in vivo* emésztést befolyásolják a jelenlévő gasztrointesztinális környezet fiziológiai körülményei, mint a pH, a

hőmérséklet, ionok összetétele és koncentrációja és az emésztés ideje, amelyeket az *in vitro* emésztés során nehéz reprezentálni.

*In vivo állatmodellek.* Az *in vivo* állatmodellek nélkülözhetetlenek az élettudományi kutatásokban és mindenképp szükségesek a tudomány fejlődése szempontjából. Azonban az állatmodelleknek számos korlátja létezik, legfontosabb a fajok különböző genetikai háttere, amely problémát okozhat, így nem biztos, hogy az eredmények vonatkoztathatóak a humán esetekre. Új lehetőségek ígérkeznek humanizált állatok létrehozásával, amelyek a fajok közötti genetikai különbségek kiküszöbölésére irányulnak. Bizonyos T-sejt és B-sejt hiányos egerekben történő IL2 receptor célzott mutációját követően humán eredetű vérképző őssejteket ültettek az egerekbe, így azok a humán immunrendszert tudták reprezentálni (SHULTZ és mts., 2012). Ezek a humanizált egerek rendkívül meghatározóak lehetnek pre-klinikai vizsgálatok során humán-specifikus fertőző ágensek vizsgálatában, ugyanígy az allergia vizsgálatokban is (BREHM és mts., 2014). Az új fehérjék vizsgálatára még nem léteznek validált *in vitro* sejtvonalra alapozott, illetve *in vivo* állatmodell alapú tesztek sem, pedig ezek fontosak lennének az újonnan expresszált fehérjék *de novo* szenzitivizációja szempontjából is. Napjainkra az *in silico* bioinformatikai módszerek kiegészítőivé váltak az *in vitro* és *in vivo* vizsgálatoknak, melyek segítségével lehetőség van a fehérjék szekvenciája alapján, az enzimes emésztéssel kapott fragmentek azonosítására. A különböző algoritmusok és adatbázisok segítségével történő azonosítások nagymértékben hozzájárulnak a kutatásokhoz. Ezek napjainkban is rohamosan fejlődnek és egyre bővülő adatbázisok állnak rendelkezésünkre. Fontos azonban megjegyezni, hogy ezek a programok nem adnak biztos válaszokat, inkább kiegészítők a biológiai kutatásoknak, segítenek leszűkíteni a lehetőségeket és közelebb kerülni a pontos eredményekhez, segítséget nyújtanak a kísérletek tervezésében.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

A biológiailag aktív és antinutritív fehérjék táplálkozásban betöltött szerepének megítélésében a közelmúltban jelentős szemléletváltozás következett be. Az alfa-amiláz inhibitoroknak az alfa-amiláz emésztőenzim gátlása következtében egyrészt a növényi kártevők elleni védelemben van jelentőségük, másrészt pedig az elhízottak és cukorbetegségekre diétájába illesztve fejthetik ki hatásukat. A növényi kártevők elleni védekezésben a modern biotechnológia tudta ezeket hasznosítani, viszont az új fehérje expresszációja élelmiszerbiztonsági aggályokat vetett fel. Indokolt tehát ezen fehérje szerkezeti, biológiai és immunológiai vizsgálata. A cukorbetegségekre és elhízottak szénhidrát anyagcseréjének szabályozásában való szerepe miatt indokolt a tápcsatornában való túlélésének vizsgálata. Ezért célkitűzéseim a következők voltak.

1. Számos kutatási eredmény áll rendelkezésre a bab eredetű  $\alpha$ AI-1-ek szerkezet és funkció közötti kapcsolatának feltárására. Ismert tény, hogy bab inhibitorok aktív  $\alpha$ - és  $\beta$ -láncainak biológiai aktivitása az aminosav összetétel és a glükán szerkezet függvényében eltérő, mégis további adatok szükségesek az allergén kockázat és az egészséggel kapcsolatos pozitív állítások igazolására. Ezért célul tűztem ki a Magyarországon termesztett babfajtákból (*Phaseolus vulgaris* L.) tisztított  $\alpha$ AI-1-k összehasonlító, proteomikai vizsgálatát egy már jól jellemzett babfajtából (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Tendergreen) izolált  $\alpha$ AI-1-el, illetve ennek borsóban (*Pisum sativum* L.) expresszált, tisztított formájával.
2. A Tendergreen bab eredetű  $\alpha$ AI-1 expressziója GM borsóban eltérő glükán szerkezetű és immunogenitású fehérjét eredményezett, azt sugallva, hogy ez akár allergén kockázatot is jelenthet. Ismert tény, hogy az  $\alpha$ AI szupercsalád tagjai atópiás betegekben allergiát válthatnak ki. Ugyanakkor az allergén reakciók fajspecifikus volta miatt nincs validált *in vivo* modell az allergén aktivitás/keresz-reaktivitás vizsgálatára. Ezért célom volt a donor Tendergreen bab, és a transzformált GM borsó eredetű  $\alpha$ AI-1 immunogenitásának vizsgálata súlyos kombinált immunhiányos humanizált egérmodellben (HuSCID) orális érzékenyítést követően. További célom volt a Tendergreen bab, a GM borsó eredetű  $\alpha$ AI-1 és a nGM borsó IgE-reaktív epitóp mintázatának összehasonlító vizsgálata a kísérletekből nyert egérszérumokkal szemben, a klinikailag igazolt hüvelyes allergiában szenvedő betegek,  $\alpha$ AI-1 specificitással rendelkező szérumával összehasonlításban.

3. Ismert, hogy  $\alpha$ AI-1 az emlősök nyál és pankreász eredetű amiláz enzimek működését gátolja, ezáltal blokkolja a keményítő lebomlását az emésztés során. Ezt felismerve számos  $\alpha$ AI-1 preparátumot, beleértve a bab eredetű inhibitort is, alkalmaztak elhízottak és 2. típusú cukorbetegség diétájában, illetve testtömeg kontrolljában. Ugyanakkor klinikai vizsgálatokban a tisztított készítmények kevésbé voltak hatékonyak a részlegesen tisztított készítményekkel szemben, melynek okát nem sikerült érdemben feltárni. Ezért célom volt az általam izolált bab eredetű  $\alpha$ AI-1-k viselkedését megismerni szimulált gyomorfoliadékban, illetve egy  $\alpha$ AI-1 tartalmú tarkabab bab őrlemény tápcsatornában való viselkedését megismerni akut patkánymodellben, különös tekintettel az immunreaktív és az enzimaktív szerkezet megőrzésére.

### 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

#### 3.1. Növényi magok, izolált fehérjék és szérumok

*Referencia anyagok (EU FP7 GMSAFOOD projekt keretében, az ausztrál CSIRO (Higgins T.J.V.) intézet (AU) által biztosított őrlemények és izolátumok):*

- Donor Tendergreen bab őrlemény (*Phaseolus vulgaris* L. vs Tendergreen, TG) és tisztított  $\alpha$ AI-1 (MARSHALL és LAUDA, 1975) liofilizált formában
- Genetikailag módosított (GM) borsó (*Pisum sativum* L.), mely egy *Agrobacterium*-mediált transzformáció eseményeként (SCHROEDER és mts.,1995) a kiméra  $\alpha$ AI-1 gént tartalmazó plazmid gén (pMCP3) expressziós terméke (SHADE és mts.(1994) és a tisztított  $\alpha$ AI-1 (MARSHALL és LAUDA, 1975) liofilizált formában
- Genetikailag közel álló nem GM (nGM) borsó (*Pisum sativum* L.) őrlemény
- Kereskedelmi forgalomból szerzett (KF) borsó (*Pisum sativum* L.) őrlemény

*Magyarországi kereskedelmi forgalomból szerzett babfajták:*

- Huanita szárazbab (*Phaseolus vulgaris*) (HSZ)
- Bokorbab (*Phaseolus vulgaris*) (BO)
- Vörös vesebab (*Phaseolus vulgaris*) (VV)
- Tarkabab (*Phaseolus vulgaris*) (TA)
- Babokból és GM borsóból tisztított (NAIK-ÉKI) alfa-amiláz inhibitorok.

Mivel dolgozatomban az  $\alpha$ AI-1 típusú inhibitorokkal foglalkoztam, ezért az egyszerűség kedvéért a továbbiakban az  $\alpha$ AI jelölést alkalmaztam.

*Szérumok:*

- Klinikailag igazolt hüvelyes allergiás anonim humán szérumok (Allergo-Derm Bakos Kft. Etikai bizottság jóváhagyásának száma: GH277-1/2011). Ismeretlen eredetű csalánkiütéses, vagy hüvelyes terhelést követően, krónikus és néhány esetben légúti klinikai tüneteket produkáló anonim felnőtt betegek, illetve hüvelyes allergia tüneteit nem produkáló egészséges anonim donorok szérumai. A vizsgálatba vont betegek, hüvelyes terhelést követően a natív hüvelyes növényvel szemben pozitív allergén specifikus “Prick in Prick” teszteredményt produkáltak. A klinikai tünetek erősségének függvényében a skálán növekvő értékek szerepeltek (1:+, 2: ++, 3: +++). Négy hetes eliminációs diéta után egy ismételt hüvelyes terhelést követően a klinikai tünetek ismételt megjelenését tapasztalták.

- *HuSCID egerek szérumai* (EU FP7 GMSAFOOD projekt keretében a Bécsi Orvostudományi Egyetem kísérleteiből származó HuSCID egér szérumok, LEE és mts., 2013). A súlyos kombinált immunhiányos humanizált egerekbe  $\alpha$ AI specificitással rendelkező hüvelyes allergiás betegek és egészséges donorok perifériális vér mononukleális sejtjeit (PBMC) vitték be. Az egereket 1 hónapon keresztül, heti egy alkalommal GM borsó, nGM borsó és Tg bab örleménnyel PBS szuszpenziójával érzékenyítették. A negatív kontroll egereket PBS-sel érzékenyítették. Az érzékenyítési protokoll végén az egereket 1 dózisú  $\alpha$ AI fehérjével vagy PBS-sel immunizálták intranazálisan. Három nap múlva elvégezték a klinikai vizsgálatokat és a szérumgyűjtést.
- *TG bab  $\alpha$ AI ellen nyúlban termelt poliklonális ellenanyag* (anti- $\alpha$ AI nyúl IgG), az EU FP7 GMSAFOOD projekt keretében a NAIK-ÉKI Biológia Osztályán (Dr. Nagy András, Dr. Takács Krisztina) fejlesztettek ki (HARBOE és INGILD, 1973).

A kísérletek során alkalmazott reagenseket az M1 melléklet, a használt oldatok és pufferek pontos összetételét az M2 melléklet tartalmazza.

### 3.2. Elektroforézis és immunblott módszerek

#### 3.2.1. Natív-PAGE és $\alpha$ AI festés (NAGY-GASZTONYI és mts., 2010)

*Mintaelőkészítés.* Az örleményekből 60 mg-ot oldottam 150  $\mu$ l szacharóz tartalmú mintaoldó pufferben, a fehérje extraktumokból 50  $\mu$ l mintát oldottam 50  $\mu$ l szacharóz tartalmú mintaoldó pufferben.

Az elválasztás 10 %-os natív poliakrilamid gélen TRISZ-glicin tartalmú futtató pufferben történt (200 V, 47 mA). A mintákból 10  $\mu$ l-t vittem fel a gél zsebeibe. Az elválasztás után a géleket 1  $\mu$ l  $\alpha$ -amiláz enzimet tartalmazó 40 ml extrakciós oldatban 30 percig szobahőmérsékleten, majd 1 %-os keményítőt tartalmazó 40 ml extrakciós oldatban 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltam. Desztillált vízzel való alapos öblítés után kálium-jodid oldattal tettem láthatóvá az aktív sávokat.

#### 3.2.2. Nátrium-dodecil-szulfát (SDS) poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE) (LAEMMLI, 1970)

*Mintaelőkészítés.* A magyarországi kereskedelmi forgalomból szerzett babokat Retsch Grindomix GM-200 laboratóriumi malomban 5 percig, 10000 rpm fordulatszámon 400  $\mu$ m

szemcseméretűre őröltem. Az így kapott babliszteket Laemmli mintaoldó pufferben oldva, 5 percig forraltam.

A gél zsebeibe 5-10 µl mintát vittem fel, amelybe előzőleg futtató-pufferben oldott brómfenolkék jelzőfestéket pipettáztam. Az elektroforézis MINI-PROTEAN 3-CELL (Bio-Rad) készülékben zajlott 15 %-os elválasztógélt és 6 %-os gyűjtőgélt alkalmazva, TRISZ-SDS-glicin tartalmú futtató-pufferrel, 200 V, 400 mA paraméterekkel 50-70 percig. Az elválasztás után a fehérjéket 20 percig fixáltam, majd a maradék fixáló oldatot PAGE-mosó oldattal eltávolítottam és Coomassie Blue R-250 festékkel tettem láthatóvá a fehérjesávokat. A maradék festéket a háttérből festékmosó oldattal távolítottam el 10 perc után. A géleket Gel Doc 2000 (Bio-Rad) rendszerben dokumentáltam.

### **3.2.3. Kétdimenziós gélelektroforézis (2-DE) (HAJÓS és mts., 2004)**

*Mintaelőkészítés.* Az őrleményekből 800 µg mennyiséget, a tisztított fehérjékből 50 µg mennyiséget oldottam 250 µl rehidratáló pufferben.

Az első dimenzióban immobilizált pH grádiens (pH 3-10) tartalmazó 7 cm-es gélcsíkon, izoelektromos pont szerint szeparáltam a fehérjéket lineárisan 250V- 24.000 Vh növekedő feszültség mellett. A gélcsíkokat 15 percig 3 ml DTT tartalmú equilibráló oldatban, majd további 15 percig 3 ml jóacetamidot tartalmazó equilibráló oldatban inkubáltam. Második dimenzióban a fehérjéket molekulatömegük szerint SDS-PAGE-n MINI-PROTEAN 3-CELL (Bio-Rad) készüléken szeparáltam a 3.2.2. pontban leírtak alapján.

### **3.2.4. Lab-on-a-chip (LOC) elektroforézis**

*Mintaelőkészítés.* A mintaelőkészítés során 4 µl mintát 2 µl β-merkaptotanol redukálószer tartalmazó mintaoldóban oldottam és 95 °C-on történő 5 perces hőkezelést követően 84 µl desztillált vízzel hígítottam.

A tiszta fehérjék és az állatkísérletből származó minták analízise Experion Pro260 Analysis Kit (Bio-Rad) automatizált rendszerben történt. A kit tartalmazza a géloldatot, a festékoldatot, a mintaoldó puffert és a molekulatömeg markereket. Az oldatokat a gyártó utasítása szerint mértem össze, így 520 µl géloldathoz 20 µl festékoldatot mértem, majd szűrés és centrifugálás után a chip megfelelő celláiba injektáltam. Az előkészített mintákból 6 µl mennyiséget injektáltam a chip megfelelő celláiba. Az elektroforézis után a kiértékelés a retenciós idők alapján Experion Pro260 szoftverrel történt.

### 3.2.5. Immunblott technika (HAJÓS és mts., 2003)

A blottolás célja, hogy a méret szerint elválasztott fehérjéket elektromos áram segítségével egy stabil, szilárd felületre vigyük át. Az öntött géleken molekulatömeg szerint (1-DE) illetve izoelektromos pont és molekulatömeg szerint (2-DE) elválasztott fehérjéket 0,45  $\mu\text{m}$  pórusméretű PVDF membránra (Millipore) blottoltam Trans Blott Semy Dry Transfer Cell (Bio-Rad) készülékkel a következő paraméterekkel:  $U=0,25\text{ V}$ ;  $I=0,08\text{ mA/cm}^2$ . A géleket az elektroforézis után 15 percig katód-pufferben, a membránt 15 másodpercig metanolban, majd 2 percig desztillált vízben és 5 percig anód II. pufferben áztattam. Azonos méretű szűrőpapírokat anód I. illetve anód II. pufferekben való áztatás után a következőképpen rendeztem el a blott készülékben (alulról felfelé): 2 db szűrőpapír (anód I. pufferben átnedvesítve); 1 db szűrőpapír (anód II. pufferben átnedvesítve); membrán; gél; 3 db szűrőpapír (katód pufferben átnedvesítve). A blottolás ideje 1-DE-t követően 1 óra, 2-DE-t követően 1,5 óra volt. A blottolás után a membránt 40 percig 1 % BSA tartalmú blokkoló oldatban inkubáltam a szabadon maradt kötőhelyek lefedése céljából. A nem kötődött BSA-t 10 ml mosó oldattal 3x10 perces mosással távolítottam el. Ezután nyúlban termelt Tendergreen bab  $\alpha\text{AI}$  elleni specifikus ellenanyaggal (1:40) illetve hüvelyes allergiás humán szérummal (1:20) egy éjszakán át szobahőmérsékleten inkubáltam a membránt. Másnap a nem kötődött ellenanyag eltávolítása után kecskében termelt, tormaperoxidáz enzimmel (HRPO) jelölt anti-nyúl IgG (1:500) illetve kecskében termelt HRPO jelölt anti-humán IgE (1:100) másodlagos ellenanyaggal 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltam a membránt. A nem kötődött elsődleges és másodlagos ellenanyagot is 10 ml mosó oldattal távolítottam el a rendszerből 3x10 perces mosással. Az immunreaktív fehérjék előhívása  $\text{H}_2\text{O}_2$ /4-kloro-1-naftol szubsztrátoldat hozzáadásával történt.

*Fehérjék deglikozilálása membránon (WOODWARD, 1984).* A blottolás után a membránt 40 percig blokkoló oldatban inkubáltam, majd 50 mM nátrium-acetát pufferrel (pH 4,5) 3x5 percig mostam, amit ezután 50 mM Na-acetát pufferben oldott 20 mM nátrium-metaperjodáttal, majd PBS-ben oldott 50 mM nátrium-borohidriddel 30-30 percig sötétben inkubáltam. A deglikozilálás után, annak igazolására Schiff-reagenssel festettem meg a membránt.

*Schiff festés (ZACHARIUS, 1969).* A fehérjéket PVDF membránra történő blottolás után desztillált vízzel mostam, utána 1 % perjódsvavat tartalmazó 3 % ecetsavban 30 percig rázattam, majd 1 % metabiszulfittal (10 mM sósavban oldva) mostam és ezután sötétben inkubáltam 1 órán át Schiff-reagensben és 30 percig 0,1 % metabiszulfitban (10 mM sósavban oldva). Végül 0,5 % metabiszulfittal (10 mM sósavban oldva) mostam a membránt.



### 3.3. Alfa-amiláz inhibitorok izolálása és aktivitásuk mérése (MURAO, 1981)

A babliszteket és GM borsó lisztet desztillált vízzel 1:10 arányban (tf %) extraháltam szobahőmérsékleten, mágneses keverővel, 1 órán keresztül, 1400 rpm fordulatszámon. Ezt a fehérje extraktumot 10 percig 10000 g értéken centrifugáltam (IEC Multi RF centrifuga) és a felülúszót gyűjtöttem. Ezután cink-hidroxidos kezeléssel dúsítottam az  $\alpha$ AI frakciót a felülúszóból, amelyhez meghatároztam az optimális cink-hidroxid mennyiséget. A fehérje koncentráció meghatározása Qubit-fluoriméterrel (INVITROGEN) történt a készülék gyártójának útmutatója szerint. A cink-hidroxidos kezelés után kapott felülúszóból további kromatográfiás lépésekkel tisztítottam az  $\alpha$ AI-t. A felülúszót 20 mM kálium-foszfát (pH 7,5) start-pufferrel hígítottam majd 15 cm<sup>3</sup>-es Express Ion D (DEAE) anioncserélő oszlopra vittem 1 ml/perc áramlási sebességgel. Ezután 0,25 mM NaCl-ot tartalmazó 10 mM start-pufferrel eluáltam az oszlopon megkötött fehérjéket. Az így nyert frakciót Centricon+70 koncentrátorral koncentráltam (vágóérték: 3000 Da), és 200  $\mu$ l-enként Superose 12 (FPLC) géliszűrő oszlopon kromatografáltam.

Az  $\alpha$ AI aktivitás mérése során 50  $\mu$ l inhibitor tartalmú fehérjeoldathoz (0,4 mg fehérje/ml) 0,15 ml sertés pankreász eredetű alfa-amiláz enzimet (0,18 U) adtam. Kontrollként az inhibitor oldat helyett desztillált vizet adtam az enzimhez, vak oldatként pedig 0,2 ml desztillált vizet használtam. Az így elkészített oldatokat 37 °C-on inkubáltam 5 percig, majd 0,2 ml 1,5 %-os keményítő oldatot (0,1 M TRISZ-HCl-ben oldva, pH 7) mértem hozzá, amivel szintén 37 °C-on 10 percig inkubáltam. Ezután 0,5 ml savoldattal (1:5 arányú 0,5M HCl és 0,5M CH<sub>3</sub>COOH) állítottam le a reakciót és 0,02 ml végoldathoz 1 ml 0,005 % jódoldatot adtam. Szobahőmérsékleten 20 percig való inkubálás után az abszorbanciát 660 nm-en mértem. Az abszorbanciák alapján az egyes mintákban a következő egyenlet segítségével határoztam meg az  $\alpha$ AI aktivitásokat:

$$\text{Inhibitor aktivitás (\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{minta}} - \text{OD}_{\text{kontroll}}}{\text{OD}_{\text{vak}} - \text{OD}_{\text{kontroll}}} \times 100$$

### 3.4. Hemagglutinációs teszt (CUADRADO és mts., 1998)

A heamagglutinációs tesztet 5 g bab illetve borsó őrleményt és 2,5 ml 0,9 % NaCl oldatot mértem be 5 ml-es centrifugacsőbe, majd 1 órán keresztül szobahőmérsékleten rázattam. Ezután 10 percig 5000 g értéken centrifugáltam. A felülúszó 100  $\mu$ l-ét kétszeres tova futó hígítással mértem mikrotitráló lemezre. Ezután tízszeres hígítású EDTA alvadás gátlót tartalmazó csőbe levett patkányvér 100  $\mu$ l-ét adtam mindegyik mintához. Szobahőmérsékleten 20 percig állni hagytam a mikrotiter lemezeket, majd az agglutináció mértékét negatív és pozitív kontrollhoz viszonyítva értékeltem ki. Negatív kontrollként 0,9 % NaCl oldatot használtam, pozitív kontrollként pedig jó

agglutináló képességgel rendelkező bab lektint alkalmaztam. A hemagglutinációs tesztet az örlemények mellett elvégeztem a Tendergreen babból és GM borsóból izolált  $\alpha$ AI-ral is, ahol 1 mg/ml-es oldatból kiindulva kétszeres tovaftató hígítással dolgoztam, ugyanígy a pozitív kontrol PHA esetében is.

### 3.5. Peptidek LC-TOF-MS elválasztása

*Tripszines emésztés (KERKAERT és mts., 2013).* Az izolált  $\alpha$ AI-ok 2-DE szeparálást követően molekulatömeg és izoelektromos pont szerint azonosított fehérjefoltjait kivágtam a gélről. A gél darabokból 100 mM  $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ :metanol (1:1), és 25 Mm  $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ :acetonitril (1:1) oldattal eltávolítottam a Coomassie Blue festéket. A gél darabokat nitrogén áram alatt szárítottam, majd 2  $\mu\text{L}$  RAPIGEST oldatot és 2  $\mu\text{L}$  tripszin (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) oldatot adtam hozzá, amellyel 37°C-on egy éjszakán át inkubáltam.

*Tripszinnel emésztett peptidek LC-TOF-MS elválasztása (KERKAERT és mts., 2013).* A tripszinnel emésztett minták 2  $\mu\text{L}$ -ét Zorbax 300 SB-C8 (3.5 micron, 2.1x150mm, Agilent Technologies) oszloppal rendelkező Ultimate 3000 RSLC (Dionex, Germany) készülékbe injektáltam. Az áramlási sebesség 0.2 mL/perc, az oszlop állandó hőmérséklete 40 °C volt. A mozgó fázis összetétele a következő volt: 90 % desztillált víz/10 % acetonitrilben 0,1 % ecetsav (A eluens) és 10 % desztillált víz/ 90 % acetonitrilben 0,1 % ecetsav (B eluens). A grádiens elúció alkalmazása: 0-1 perc: 10 % B; 1-11 perc: 10-100 % B; 11-16 perc: 100 % B; 16-16.5 perc: 100-10 % B és 16.5-21 perc: 10 % B. Az oszlopról leoldott peptideket 214 nm-en és 280 nm-en UV detektor és microTOF II (time-of-flight) repülési idő analizátor (Bruker Daltonics, Germany) analizálta. Az electrospray ionizációs forrás pozitív módban működött; 2 bar  $\text{N}_2$  nyomáson, 4 L/perc áramlási sebességgel 200 °C hőmérsékleten. A kapilláris feszültség 5800 V, a kilépő feszültsége 150 V volt. A spektrumok felvétele 100-3000  $m/z$  tömegtartományban történt. Az  $\alpha$ AI peptideket *in silico* emésztett peptid markerek (*Phaseolus vulgaris*  $\alpha$ AI P02873, UniProt) alapján azonosítottam.

*Szekvencia homológia meghatározása ismert allergén szekvenciákkal.* UniProt (<http://www.uniprot.org/>) fehérje adatbázisból kapott bab (*Phaseolus vulgaris*) eredetű  $\alpha$ AI szekvenciáját az EFSA-val megegyező, FAO/WHO kritériumait tartalmazó adatbázisok segítségével elemeztem az allergenitás szempontjából. Ezek az adatbázisok az SDAP (Structural Database of Allergenic Proteins, <https://fermi.utmb.edu/SDAP/>) adatbázis; az ADSF (Allergen Database for Food Safety, <http://allergen.nihs.go.jp/ADFS/>); a ProAP adatbázis (Protein Allergenicity Prediction, <http://gmobl.sjtu.edu.cn/proAP/main.html>).

*Lineáris B-sejt epitópok predikciója.* Immun-epitóp predikciós szoftver (<http://immuneepitope.org>) segítségével a potenciális lineáris B-sejt epitópokat térképeztem fel az  $\alpha$ AI alfa- és béta láncán azok aminosav szekvenciája alapján.

### **3.6. Hüvelyes allergia klinikai tüneteit mutató humán szérumok szelekciója $\alpha$ AI specifikus antigén érzékenységre**

*Pozitív szérumok (18 db).* A hüvelyes allergia bőr (krónikus csalánkiütés, szájkörüli kiütés) és légúti (asztmás tünetekkel kísért léguti allergénekkal szembei túlérzékenység) tüneteket mutató felnőtt betegek (80 db), akik a „Prick in Prick” tesztben natív babbal és/vagy borsóval szemben erős klinikai tüneteket mutattak (Skála érték: 3).

*Negatív szérumok (2 db).* Nem mutattak klinikai tüneteket natív babbal és/vagy borsóval szemben.

*Pozitív szérumok  $\alpha$ AI érzékenyítéssel (3 db).* A rendelkezésünkre bocsátott hüvelyes pozitív, anonim szérumok (80 db) IgE reaktivitását immunblottal vizsgáltam. Az 1-DE szeparált és deglikozilált  $\alpha$ AI antigént blottolás után a pozitív humán szérumokkal (1:20) inkubáltam. Pozitív reakció esetén a kialakult immunkomplexet ( $\alpha$ AI/humán IgE) anti-humán IgE kecske IgG HRPO enzimmel jelölt konjugátummal (1:100) azonosítottam.

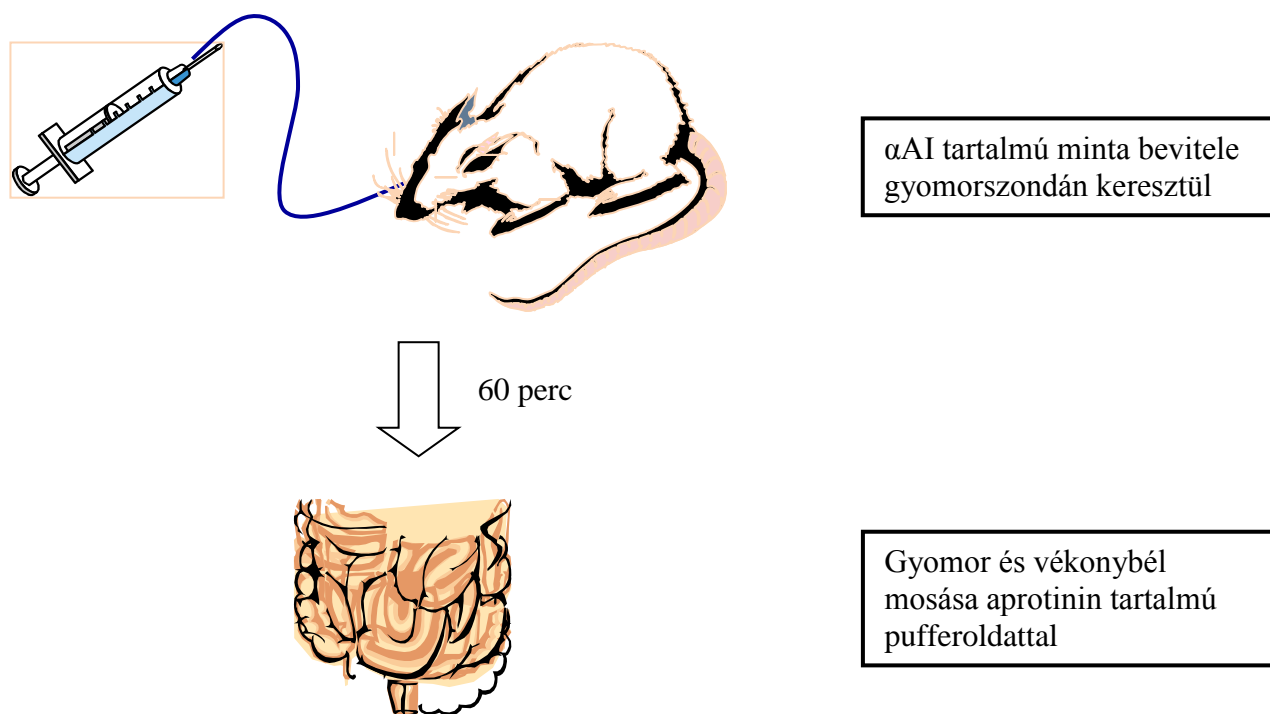
### **3.7. Az $\alpha$ AI *in vitro* pepszines emésztése (THOMSAS és mts., 2004; KUMAR és mts., 2011)**

A kísérlet során 1,5 ml SGF oldatot 37 °C-on, 10 percig előinkubáltam Eppendorf csőben, melyhez 90  $\mu$ l 5mg/ml-es  $\alpha$ AI oldatot adtam. Kontrollként alkalmaztam egy jól emészthető fehérjét (BSA) és egy nehezen emészthető fehérjét ( $\beta$ -laktoglobulin). Ezeknek szintén 90  $\mu$ l 5 mg/ml-es oldatát adtam külön-külön SGF fázisokhoz. Rövid keverés után 37 °C-os vízfürdőbe helyeztem az eppendorf csöveket. Különböző időpontokban (2, 10, 30, 60 perc) 200  $\mu$ l mintát vettem mindegyik csőből, és az enzimreakciót 70  $\mu$ l 0,2 M NaHCO<sub>3</sub>-tal állítottam le, majd 70  $\mu$ l 4x Laemmli mintaoldó puffert adtam hozzá. Az így kapott mintákat 100 °C-on, 5 percig kezeltem, majd mindegyikből 15  $\mu$ l-t 15 %-os SDS-PAGE-n megfuttattam a Laemmli módszer (1970) szerint.

### **3.8. Az $\alpha$ AI tápcsatornában történő túlélésének vizsgálata akut patkánymodellben**

Az állatkísérletek a Fővárosi Állategészségügyi és Élelmiszer Ellenőrző Állomáshoz benyújtott „Állatkísérlet végzésére szóló állategészségügyi hatósági engedély iránti kérelem”-nek

(ny.sz. 65/2001) megfelelően történtek. A kifejlett immunrendszerű hím Wistar patkányokat (TOXI-COOP Kft.) négy napon keresztül 16 %-os fehérjetartalmú (16 % tojásfehérje, 10 % kukoricaolaj, 5 % ásványi anyag és vitaminpremix, kukoricakeményítő) táp és víz *ad libitum* fogyasztása mellett csoportos anyagcsere ketrecben tartottuk. A kísérleti napon 8 órás tápmegvonást követően 1 ml 0,9 % NaCl oldatban feloldott 5 mg  $\alpha$ AI-t tartalmazó natív és hőkezelt (100 °C, 30 perc) tarkabab (*Phaseolus vulgaris*) lisztet juttattunk be az állatokba hajlékony gyomorszondán keresztül (3 állat/tesztcsoport). Ezt követően 60 perc elteltével az állatok öntudatvesztését okozó kábítása (cervicalis diszlokáció) mellett azonnali halált okozó módszerrel, életük kioltása történt (dekapitálás). Teljes kivérzést követően a hasüreg feltárása után a gyomrot és a beleket eltávolítottuk (4. ábra).



**4. ábra:** Az  $\alpha$ AI tápcsatornában való túlélésének vizsgálati lépései akut patkánymodellben

*Gyomor és vékonybél tartalom kinyerése* (LE GALL és mts., 2007). A gyomor tartalmakat 1 ml, a vékonybél tartalmakat 2 ml mosóoldattal mostam ki, majd liofilizáltam. A liofilizált mintákat az analízisig -20 °C-on tároltam. Analízis előtt a liofilizált bablisztekből és gyomor mintákból a fehérjét extrakciós puffer I-gyel extraháltam 90 percig szobahőmérsékleten rázatva (10 g babliszt/L puffer; 50 g gyomortartalom/L extrakciós puffer I). A liofilizált vékonybél mintákból

extrakciós puffer II-vel extraháltam a fehérjéket szintén 90 percig szobahőmérsékleten rázatva (200 g vékonybél tartalom/ L extrakciós puffer II). A kioldott fehérjetartalmakat QUBIT fluoriméterrel mértem.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. Magyarországon termesztett babfajták (*Phaseolus vulgaris* L.) és tisztított $\alpha$ AI-ok összehasonlító, proteomikai vizsgálata valamint az inhibitor- és lektinaktivitás vizsgálata egy már jól jellemzett Tendergreen bab és a GM borsó felhasználásával

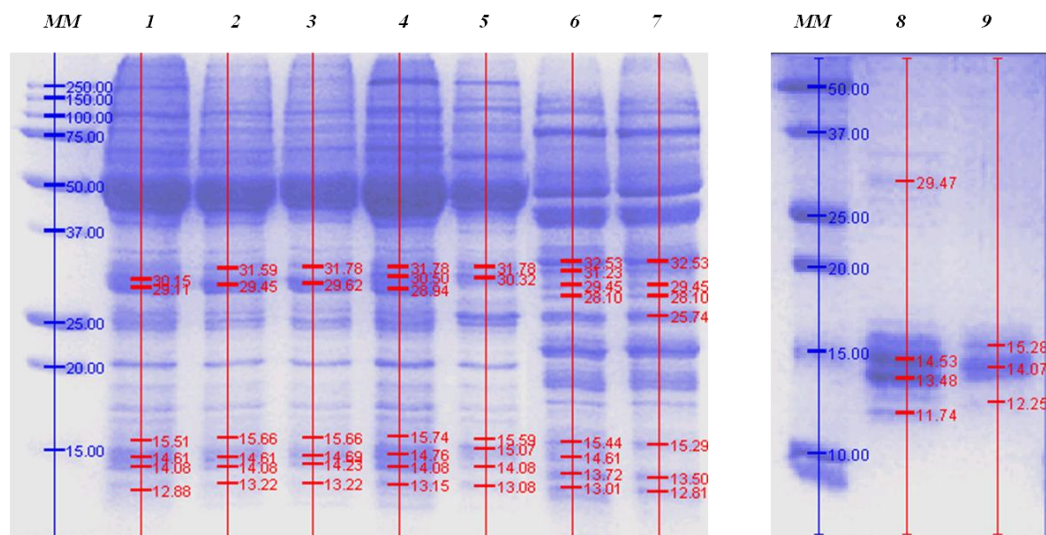
A szerkezet és funkció jellemzése céljából az alábbi vizsgálatokat tartottam célszerűnek elvégezni.

#### 4.1.1. A magyarországi babfajták, a Tendergreen bab, a GM borsó és a nGM borsó elektroforetikus fehérjemintázatainak összehasonlító vizsgálata a referenciaként rendelkezésre álló Tendergreen bab és GM borsó eredetű $\alpha$ AI segítségével

Célkitűzésem volt az  $\alpha$ AI-ok fehérjeszerkezetének és variabilitásának vizsgálata hazai babfajtákban egy már jól jellemzett Tendergreen babban valamint GM borsóban (PRESCOTT és mts., 2005; CAMPBELL és mts., 2011; MARSH és mts., 2011) expresszált, referencia  $\alpha$ AI segítségével. Ennek érdekében először a bab és borsó őrlemények fehérjéit vizsgáltam SDS-PAGE segítségével. Az elválasztás után kapott fehérjemintázatokat az 5. ábra szemlélteti. A 15 kDa molekulatömegű markerfehérje tartományban, ami egyben az aktív  $\alpha$ AI-ok molekulatömeg tartománya is (POWERS és WHITAKER, 1977; MORENO és CHRISPEELS, 1989; CAMPBELL és mts., 2011), a babok és a GM borsó mintázatában intenzív sávok voltak detektálhatóak ellentétben a nGM borsó fehérjemintázatával. A 25 és 37 kDa markerfehérjék között a babokban egyformán jelen volt egy intenzívebb sáv, amely az  $\alpha$ AI pre-proteinjének jelenlétére utal (POWERS és WHITAKER, 1977; MORENO és CHRISPEELS, 1989; CAMPBELL és mts., 2011), a borsók esetében viszont más mintázat látható ebben a régióban. A Tendergreen bab  $\alpha$ AI szintén a 15 kDa és 30 kDa molekulatömeg tartományban tartalmazott sávokat szemben a GM borsó izolátummal, amelynél csak a 15 kDa aktív inhibitor tartományban detektáltam fehérjesávokat.

Az SDS-PAGE mintázat alapján nem dönthető el pontosan, hogy melyik sáv milyen fehérjét jelent. Ezért nem denaturáló közegben Natív-PAGE-n is elvégeztem az elektroforézist, majd keményítővel való inkubálás után kálium-jodiddal festettem meg az  $\alpha$ AI-aktív sávokat. Az 6. ábrán látható, hogy a GM borsó - szemben a nGM borsóval és egy kereskedelmi forgalomból beszerzett kontroll borsóval - a bab őrleményekhez hasonlóan  $\alpha$ AI aktivitást mutatott. A natív-PAGE elválasztásnál nincs lehetőség molekulatömeg markereket alkalmazni, ezért egyértelműen nem lehet meghatározni, hogy pontosan melyik fehérjesáv rendelkezik aktivitással. Másik hátránya ennek az

elválasztásnak, hogy nem kvantitatív módszer, ezért az aktivitásméréseket spektrofotometriásan is elvégeztem. Ennek eredményeit az 4. táblázatban foglaltam össze. Az eredmények alapján elmondható, hogy legnagyobb inhibitor aktivitással a GM borsó rendelkezett (58%), míg a legalacsonyabb aktivitást a Bokorbab őrlményben mértem (38%). A nGM és a KF borsó őrlmények nem mutattak  $\alpha$ AI aktivitást.

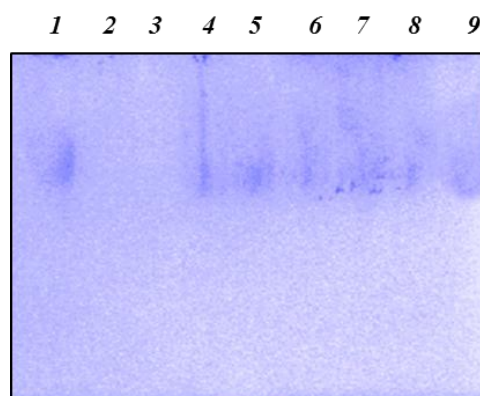


**5. ábra:** Bab és borsó őrlmények SDS-PAGE mintázata

MM: *All Blue* molekulatömeg marker

1.TG bab; 2. HSZ bab; 3. BO bab; 4. VV bab; 5. TA bab; 6. GM borsó; 7. nGM borsó

8. TG bab  $\alpha$ AI; 9. GM borsó  $\alpha$ AI



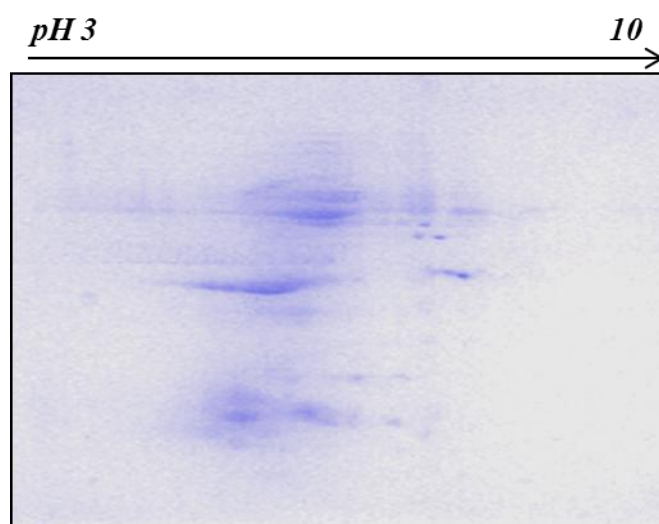
**6. ábra:** Bab és borsó őrlmények Natív-PAGE mintázata  $\alpha$ AI aktivitásra festve

1. TG bab; 2. KF borsó; 3. nGM borsó; 4. GM borsó; 5. HSZ bab; 6. BO bab; 7. VV bab; 8. TA bab; 9. Búza  $\alpha$ AI.

**4. táblázat:** A bab és borsó extraktumok spektrofotometriás módszerrel meghatározott  $\alpha$ AI aktivitás értékei (%)

TG bab	KF borsó	nGM borsó	GM borsó	HSZ bab	BO bab	VV bab	TA bab
52 $\pm$ 1,5 %	0%	0%	58 $\pm$ 1,5 %	42 $\pm$ 1,5 %	38 $\pm$ 1,2 %	49 $\pm$ 2,0%	53 $\pm$ 2,6 %

Egy fehérje izolálásához mindig szükséges az izoelektromos pont ismerete, amelyről az izoelektromos fókuszálás során kaphatunk információt, egy pH grádiensen történő elválasztással. A bab és borsó őrlemények fehérjeit ezért 2-DE módszerrel is elválasztottam, ahol az első dimenzió maga az izoelektromos fókuszálás. Az elválasztás eredményét a Tendergreen bab (7. ábra) és a GM/nGM borsó (9. ábra) mintákon mutatom be. A magyarországi babfajták 2-DE mintázata az M3 mellékletben található. A 2-DE mintázat kiértékelése rendszerint szoftveresen történik, marker fehérjék segítségével, amelyek a minta fehérjeivel egyidejűleg egy mátrixban szeparálódnak. Az őrlemények fehérjeinek elválasztása után a 2-DE marker fehérjék jelenléte megnehezítené a kiértékelést, ezért nem alkalmaztam ezeket az őrlemények esetében. A mintázatról látható, hogy a pH 4 és pH 8 közötti izoelektromos pontnál jelentek meg fehérjefoltok.

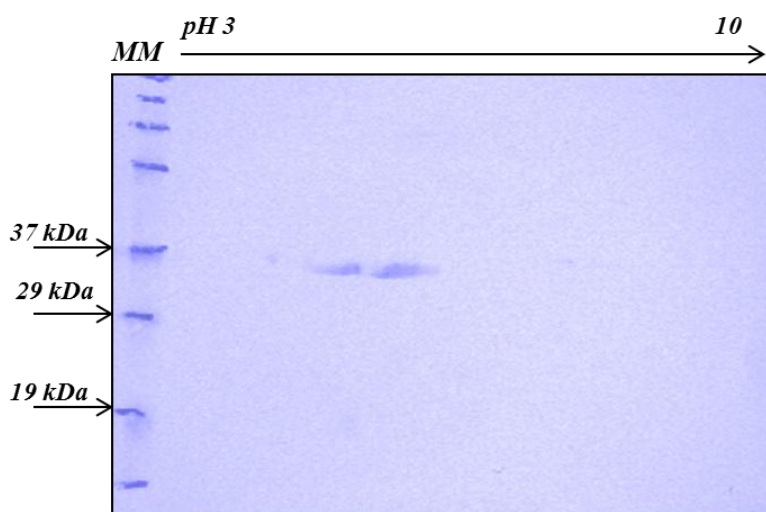


**7. ábra:** TG bab őrlemény fehérjeinek szeparálása 2-DE módszerrel  
Felvitt mennyiség: 800 $\mu$ g sz.a./250 $\mu$ l rehidratáló puffer

Az  $\alpha$ AI kimutatására az őrleményekből Tendergreen bab  $\alpha$ AI ellen nyúlban termelt specifikus ellenanyagot használtam. A 2-DE elválasztás után membránra blottoltam a fehérjét, a specifikus ellenanyaggal és másodlagos ellenanyagkonjugátummal inkubátam, majd előhívtam az



immunreaktív fehérjefoltokat, melyet a 8. ábra szemléltet. Az  $\alpha$ AI előfehérje tartományával megegyező 29 – 37 kDa molekulatömeg tartományban és a pH 4 - 5 körüli pI tartományban jelennek meg az anti- $\alpha$ AI-ral specifikusan reagáló immunreaktív fehérjefoltok. LAJOLO és FILHO (1985) *Phaseolus vulgaris* eredetű  $\alpha$ AI izoelektromos pontját hasonlóan pH 4,35-nél határozták meg izoelektromos fókuszálással. Ezt az izoelektromos pontot vettem figyelembe a fehérjetisztítás során. Az aktív inhibitor molekulatömeg tartományában (15 kDa) az őrlemények esetében nem detektáltam fehérjefoltokat, ez magyarázható azzal, hogy az  $\alpha$ AI az őrleményekben alacsony (1-2%) százalékbán található, ezért is szükséges a fehérje izolálása.



**8. ábra:** TG bab őrlemény immunblott mintázata

Felvitt mennyiség: 800 $\mu$ g sz.a./250 $\mu$ l rehidratáló puffer

Elsődleges ellenanyag (anti- $\alpha$ AI nyúl IgG) 1:40 hígításban, másodlagos ellenanyag (anti-nyúl IgG HRPO konjugátum) 1:500 hígításban

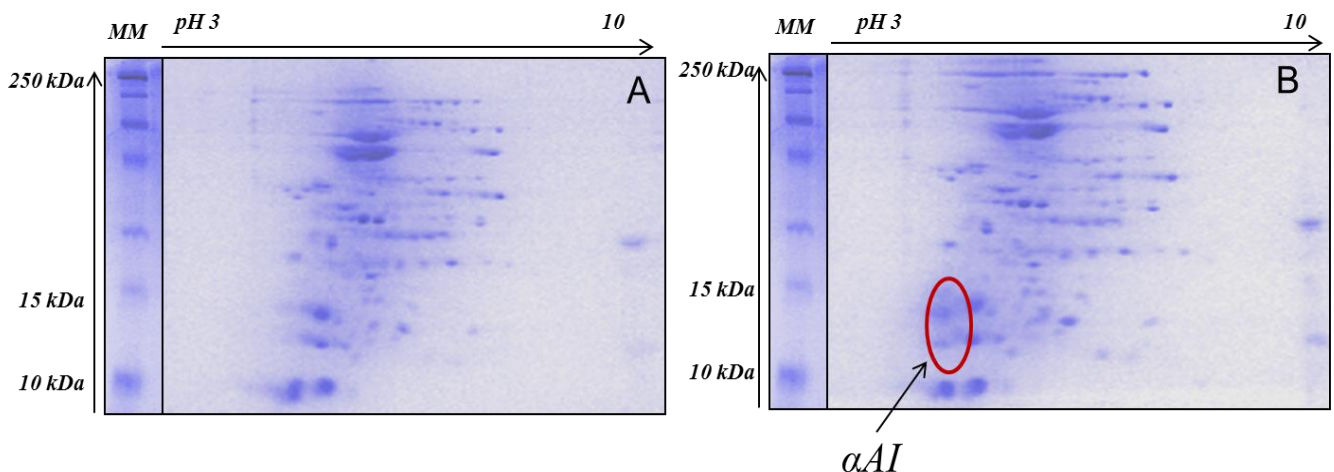
MM: *Broad Range* molekulatömeg marker

#### 4.1.2. A GM borsó és a nGM borsó fehérjeinek összehasonlítása 2-DE elválasztást követően, a genetikai módosításból eredő különbségfehérjék detektálása érdekében

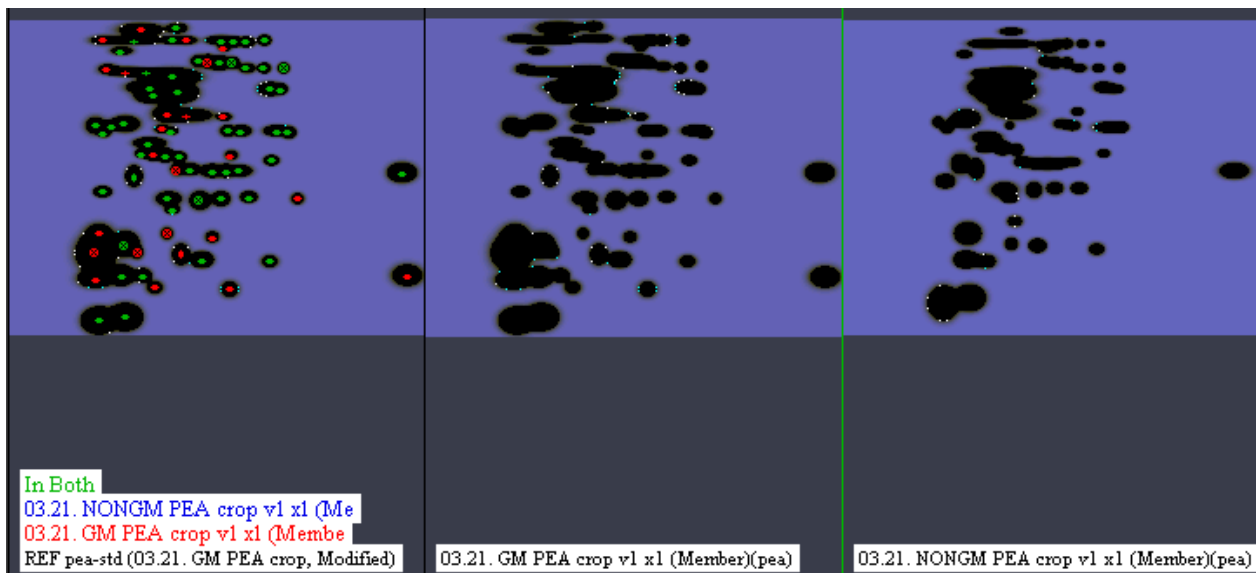
A nagyobb felbontás érdekében 2-DE módszerrel is elválasztottam a fehérjéket. A borsó őrlemények 2-DE szeparált mintázatait a 9. ábra szemlélteti. A teljes fehérjetérkép összehasonlítását és a különbségek pontos feltárását PDQUEST szoftver segítségével végeztem el. A GM növényben 79, a nGM növényben 54 fehérjefoltot detektáltam (M4 meléklet). CHEN és mts. 2009-ben proteomikai vizsgálatok során az  $\alpha$ AI fehérjén kívül további 33 új fehérjét talált a GM borsóban, melyek közül csupán 3 fehérjéről volt bizonyítható, hogy azok  $\alpha$ AI-ként expresszáldtak. A

maradék 30 fehérje az *Agrobaktérim*-mediált transzformáció után keletkezett. Ezek közül 16 fehérjét MALDT-TOF-TOF-MS módszerrel azonosítottak, melyek tartalékfehérjék, legumin, vicilin, convicilin, phaseolin és kupin típusú fehérjék voltak (CHEN és mts., 2009).

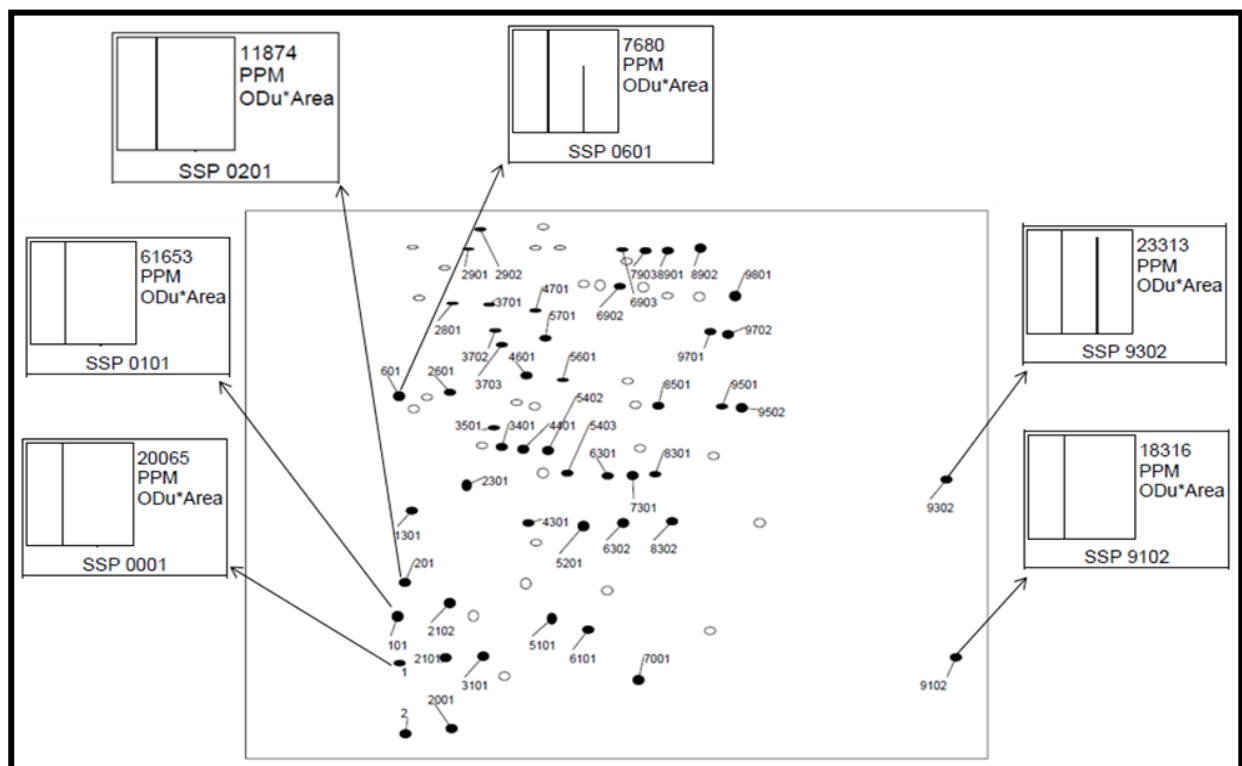
A 10-15 kDa közötti molekulatömeg tartományban a GM borsó mintázatában szemmel láthatóan is több fehérjefolt volt jelen. A 10. ábrán a különbségfehérjék mintázata látható, ahol a referencia képen pirossal jelzett fehérjefoltok kizárólag a GM borsóban jelenlévő fehérjéket jelölik, míg a zölddel jelölt foltok mindkét fehérjemintázatot jellemzik. (Kékkel jelölt foltok nem láthatóak, ami azt jelenti, hogy nem detektálható olyan fehérjefolt, ami kizárólag a nGM borsóban található). Az SSP (Single Spot Position) számmal jelzett foltok intenzitás értékeit hasonlítják össze a 10. ábrán található oszlopdiagramok. Az első oszlop a GM borsó mintában található foltok intenzitását mutatja (maximum), ez tekintendő a referencia mintának, mert ebben van benne az összes keresendő fehérje, ennek relatív értéke a jobb felső sarokban található. A második oszlop a nGM borsó ugyanabban a pozícióban lévő foltjának intenzitását jelöli a maximumhoz képest, ennek pontos értéke nem látható. Az  $\alpha$ AI molekulatömeg tartományában találhatóak olyan fehérjefoltok (4 db), amelyek kizárólag a GM borsó liszt 2-DE mintázatában detektálhatóak. Ezek többek között a SSP0001, SSP0101, SSP0201 és SSP9102 számú foltok (11. ábra). Detektáltam olyan fehérjéket is, amelyek mindkét borsóban megtalálhatóak, azonban intenzitásuk a GM borsóban növekedett. Ilyenek a SSP 0601 és az SSP9302 foltok. Az M4 mellékletben megtalálható az összes SSP szám és a hozzájuk tartozó hisztogramok.



**9. ábra:** A nGM (A) és a GM (B) borsólisztek 2-DE szeparált mintázatai  
MM: *All Blue* molekulatömeg marker



**10. ábra:** Különbségfehérjék detektálása a nGM és GM borsólisztek 2-DE szeparált fehérjemintázatai között. A referencia kép a GM borsóliszt mintázata. A pirossal jelzett foltok a GM borsóban jelenlévő fehérjéket jelölik, a zölddel jelölt foltok a nGM és a GM borsóban található fehérjéket jelölik.



**11. ábra:** A GM borsóliszt és a nGM borsóliszt 2-DE térképén detektált foltok intenzitás értékeinek PDQUEST szoftveres összehasonlító vizsgálata (SSP: a szoftver által az egyes foltoknak adott jelzőszám)

#### 4.1.3. A hőkezelés hatásának vizsgálata az $\alpha$ AI-ok aktivitására

A bioaktív fehérjék vizsgálatánál mindig fontos szempont a hőstabilitás. Ezért az  $\alpha$ AI-ok aktivitását a bab és borsó lisztek extrakcióját (3.3. fejezet) követően 60 °C, 80 °C és 100 °C-on történő 10 perces hőkezelés után mértem. Az 5. táblázatban látható, hogy a 60 °C-on való hőkezelés során átlagosan 15 %-kal csökkent az extraktumok inhibitor aktivitása. A legnagyobb csökkenés a Bokorbabnál volt megfigyelhető, ez 32 %. A 80 °C-on való hőkezeléssel az aktivitás már átlag 83 %-kal csökkent; legnagyobb arányban, 91 %-kal a Vörös vesebabban, míg a 100 °C-os hőkezelés után már nem volt mérhető aktivitás egyik extraktumban sem.

**5. táblázat:** A 10 perces hőkezelések hatása a különböző bab és borsó extraktumok  $\alpha$ AI aktivitására

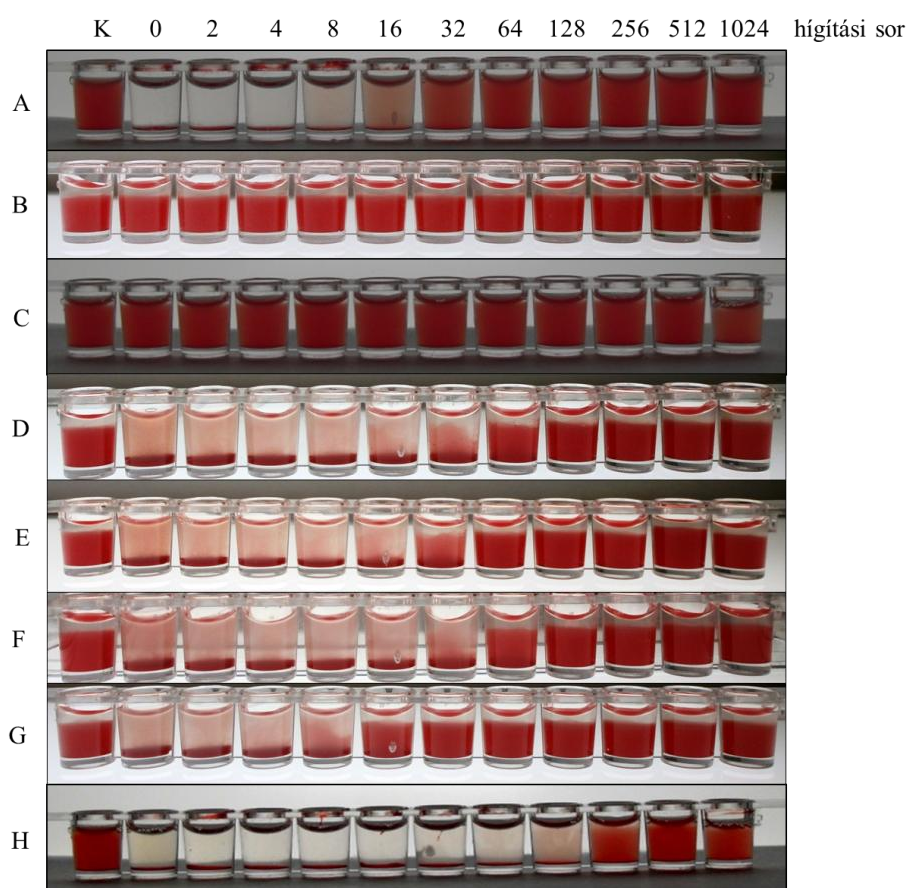
	<b><math>\alpha</math>AI aktivitás értékek (%)</b>							
<b>Hő- kezelés</b>	TG bab	KF borsó	nGM borsó	GM borsó	HSZ bab	BO bab	VV bab	TA bab
-	52 $\pm$ 1,5 %	0%	0%	58 $\pm$ 1,5 %	42 $\pm$ 1,5 %	38 $\pm$ 1,2 %	49 $\pm$ 2,0%	53 $\pm$ 2,6 %
60 °C	45 $\pm$ 4,5%	0%	0%	53 $\pm$ 2,5%	41 $\pm$ 4,1%	26 $\pm$ 2,0%	40 $\pm$ 1,0%	45 $\pm$ 4%
80 °C	12 $\pm$ 1,5%	0%	0%	8 $\pm$ 3,0%	7 $\pm$ 2,0%	7 $\pm$ 0,5%	4 $\pm$ 3,2%	11 $\pm$ 4,5%
100 °C	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

#### 4.1.4. A magyarországi babfajták, a Tendergreen bab, a GM borsó és a nGM borsó, valamint a negatív kontrollként használt Tendergreen bab és GM borsó eredetű $\alpha$ AI-ok lektin aktivitásának vizsgálata hemagglutinációs próbával

A bab  $\alpha$ AI-ok elődleges szerkezetük alapján nagyfokú hasonlóságot mutatnak a lektinekkel, amelyek hemagglutinációs aktivitással rendelkeznek (MORENO és CHRISPEELS, 1989) és a PHA szénhidrátkötőhelyet nem tartalmazó csonkított formái az  $\alpha$ AI-ok (SPARVOLI és BOLLINI, 2014). A Pfam fehérjeadatbázis alapján az  $\alpha$ AI és a bab lektin a koncavalin-típusú lektin (CL0004) szupercsaládba és azonbelül a *legumin lektin* (*Lectin legB*, PF00139) családba tartozik. Ezért indokolt volt az  $\alpha$ AI lektin aktivitásának vizsgálata agglutinációs próbával. A lektinek a vörösvérsejtek agglutinációját váltják ki, ezért a teszt során a fehérjéket vörösvérsejtekhez adszorbeáltatjuk, majd szobahőmérsékleten való inkubálás után az agglutináció mértéke szemmel is jól látható.

A 12. ábrán a mikrotiter lemezek első helye a negatív kontroll (K), a fehérje nélküli minta. A második helyen a fehérje minta kiindulási koncentrációja (100  $\mu$ l 0,5 g/2,5 ml), a harmadik helytől a minta kétszeres tova futó hígítású sorozata és a tízszeres hígítású vér agglutinációja látható. Az „A” ábra bab PHA hemagglutinációs aktivitását mutatja, ahol a 16x hígításig szemmel látható a hemagglutináció.

A bab extraktumokkal végzett hemagglutinációs próba során megállapítottam, hogy az egyes babfajták között a hemagglutinációs aktivitásban különbözőek lehetnek. A Bokorbab (D), a Vörös vesebab (E) és a Huanita szárazbab (F) a 32x hígításig, míg a Tarkabab csak a 8x hígításig mutat aktivitást. A vizsgált babfajták közül tehát a Tarkababnak a legkisebb a lektinaktivitása, amely táplálkozástani szempontból előnyös lehet a PHA toxicitása miatt. A Tendergreen babból izolált  $\alpha$ AI (B) azonban nem mutatott lektin aktivitást, hasonlóan a GM borsóból izolált  $\alpha$ AI-hoz (C). A GM borsó extraktum viszont 128x hígításig jól láthatóan aktivitást mutat, amellyel a borsó lektin jelenlétét igazoltam.



**12. ábra:** Hemagglutinációs teszt

K: negatív kontroll, 0: kiindulási koncentráció

**A.** 1 mg/ml PHA; **B.** 1 mg/ml TG bab  $\alpha$ AI; **C.** 1 mg/ml GM borsó  $\alpha$ AI; **D.** BO bab **E.** VV bab;  
**F.** HSZ bab; **G.** TA bab; **H.** GM borsó

#### 4.1.5. Kromatográfiás fehérjetisztítási módszer kidolgozása $\alpha$ AI izolálására Magyarországon termesztett *Phaseolus vulgaris* babfajtákból illetve a GM borsóból

Az  $\alpha$ AI-ok izolálására már több eljárást dolgoztak ki, melyek mindegyike több lépéses, időigényes módszer. Marshall és Lauda 1975-ben 1% NaCl oldatos extrakció után hőkezelést alkalmazva inaktiválták az alfa-amiláz enzimet és a kísérő hőlabilis fehérjéket. Az így kapott fehérjeoldatot dializálták, majd egy anioncsrlő (DEAE) valamint két gélzsűrő kromatográfiás oszlopon (Sephacryl S-200, Sephadex G-50) való tisztítással nyerték ki az  $\alpha$ AI-t.

Kutatásom során célom volt egy olyan kevésbé időigényes, hatékony módszer kidolgozása az  $\alpha$ AI tisztítására, amelyet a biológiai aktivitás mérésével nyomon tudok követni.

A cink-hidroxid [ $\text{Zn}(\text{OH})_2$ ] egy nagy fehérjemegkötő kapacitással rendelkező szervesetlen adszorbens. Először az 1930-as években alkalmazták fehérjék eltávolítására vércukor meghatározási módszerekben (SOMOGYI, 1930). Sikeresen alkalmazták még enzimmtisztítás során (SCOPES, 1982). NOLTMANN (1964) nyúl izomból foszfoglükóz-izomerázt izolált, később NOLTMANN és NAKAGAWA (1965) sörélesztőből szintén foszfoglükóz-izomerázt izoláltak  $\text{Zn}(\text{OH})_2$  segítségével. A  $\text{Zn}(\text{OH})_2$  fehérje-adszorpciós mechanizmusa azonban máig nem ismert.

Az  $\alpha$ AI izolálására bab és GM borsó lisztekből való extrakció (3.3. fejezet) után alkalmaztam a  $\text{Zn}(\text{OH})_2$ -ot, amely azért bizonyult megfelelő eljárásnak, mert az extraktumban lévő fehérjék nagy részét megkötötte, viszont az  $\alpha$ AI oldatban maradt. Ezt a  $\text{Zn}(\text{OH})_2$ -dal való kezelés előtti és utáni aktivitásmérésekkel igazoltam. Korábban alkalmazott  $\alpha$ AI tisztítási eljárásokkal szemben ez egy egyszerűbb, kevesebb lépésből álló módszer (SZAMOS és mts., 2012).

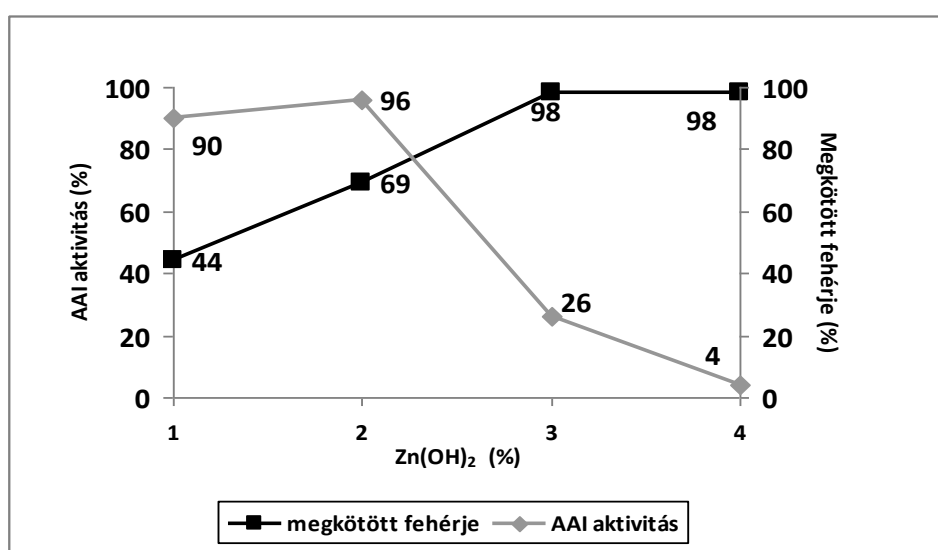
Az optimális  $\text{Zn}(\text{OH})_2$  mennyiségét úgy határoztam meg, hogy 1-4 tf% tartományban adagoltam a rendszerhez a  $\text{Zn}(\text{OH})_2$ -ot és a nem kötődött fehérjefrakcióban mértem az  $\alpha$ AI aktivitást. A különböző összetételű  $\text{Zn}(\text{OH})_2$  oldatokat a vizsgálandó fehérje extraktum térfogatára vonatkoztatott mennyiségű cink-acetát és nátrium-hidroxid elegyből állítottam elő. Például, az 1 tf%  $\text{Zn}(\text{OH})_2$ -dal való kezelés során  $0,10 \times V$  ml 1M cink-acetátot,  $0,18 \times V$  ml 1M NaOH-dal mértem össze és az így kapott csapadékot röviden vortexel összekevertem. Ezután  $0,21 \times V$  ml desztillált vizet adtam a csapadékhoz majd erőteljesen összekevertem és 4000 g értéken 5 percig centrifugáltam. A felülúszót leöntöttem, a  $\text{Zn}(\text{OH})_2$  pellethez  $V$  ml fehérjeoldatot adtam és homogenizáltam, majd 10000 g értéken 5 percig centrifugáltam. A felülúszó tartalmazta a  $\text{Zn}(\text{OH})_2$  által nem megkötött fehérjéket. Az oldatok összetevőinek pontos leírását az 6. táblázat tartalmazza.

**6. táblázat:** A cink-hidroxid összetevőinek százalékos összetétele

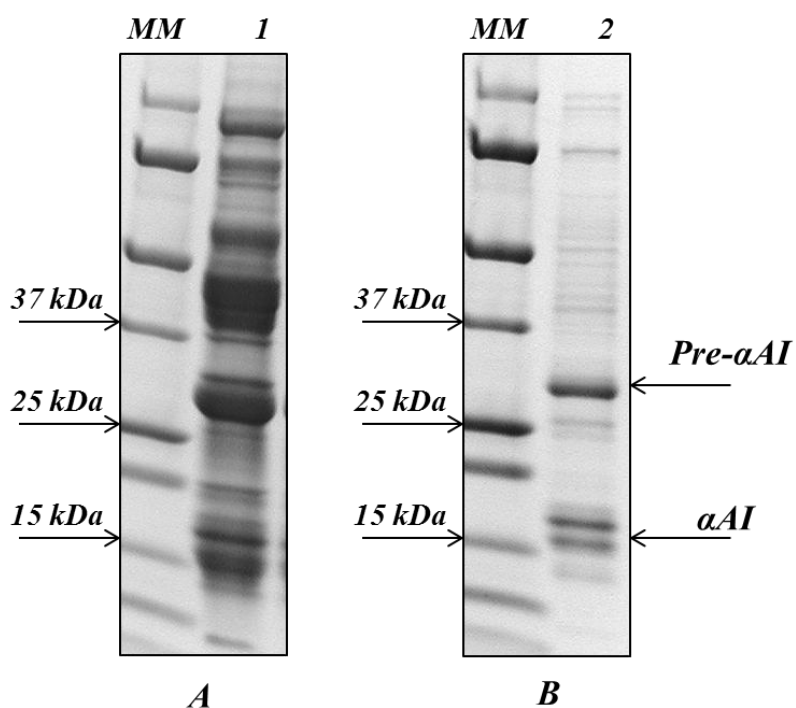
	1 tf % $\text{Zn(OH)}_2$	2 tf % $\text{Zn(OH)}_2$	3 tf % $\text{Zn(OH)}_2$	4 tf % $\text{Zn(OH)}_2$
<b>1M</b> $\text{ZnCH}_3(\text{COO})_2$	0,10 ml	0,20 ml	0,30 ml	0,40 ml
<b>1M NaOH</b>	0,18 ml	0,37 ml	0,55 ml	0,74 ml
<b>Desztillált víz</b>	0,21 ml	0,43 ml	0,65 ml	0,86 ml

Az 1-4 tf% tartományban a megkötött fehérje mennyisége 44 %-ról 98 %-ra nőtt, míg az  $\alpha\text{AI}$  aktivitása 90 %-ról 4 %-ra csökkent. A megkötött fehérje mennyisége az alkalmazott  $\text{Zn(OH)}_2$  mennyiségével 3 tf %-ig lineárisan nőtt, 3 tf %  $\text{Zn(OH)}_2$  alkalmazásakor azonban már jelentősen csökkent az  $\alpha\text{AI}$  aktivitása (13. ábra). A 2 tf %  $\text{Zn(OH)}_2$  alkalmazásával értem el a legnagyobb  $\alpha\text{AI}$  aktivitást, 96 %-ot.

A fehérje extrakt 2 tf %  $\text{Zn(OH)}_2$ -dal történő kezelése után a 15 kDa és a 30 kDa tartományban lévő fehérjesávok jelentős részét nem kötötte meg az adszorbens, az extraktban lévő többi fehérjével szemben (14. ábra). Így, ez az összetétel bizonyult optimálisnak a kísérő fehérjék eltávolítására a rendszerből, és az  $\alpha\text{AI}$  frakció dúsítására. Ezért a továbbiakban a 2 tf%  $\text{Zn(OH)}_2$ -oldatot alkalmazva izoláltam az  $\alpha\text{AI}$ -t a magyarországi babokból és a *GMSAFOOD* keretében kapott GM borsóból.



**13. ábra:** A  $\text{Zn(OH)}_2$  által a TA bab fehérje extraktumból megkötött fehérjék mennyiségének változása és az oldatban maradt fehérjék  $\alpha\text{AI}$  aktivitásának alakulása



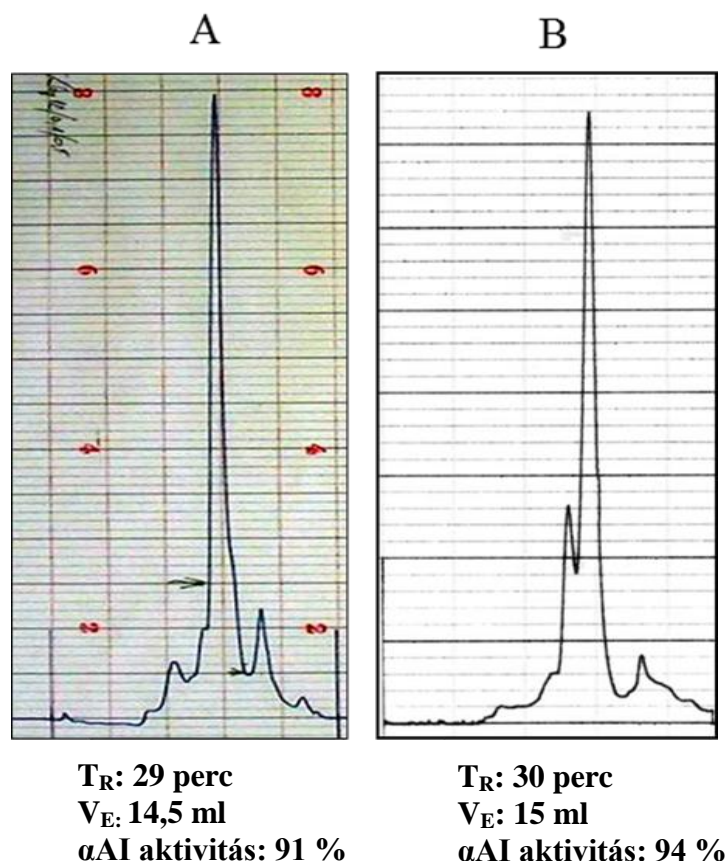
**14. ábra:** TA bab fehérje extraktumának (A) és a TA bab 2 tf%  $\text{Zn}(\text{OH})_2$ -dal való kezelése után kapott fehérjeoldatának (B) SDS- PAGE mintázata

MM: *All Blue* molekulatömeg marker

1. TA bab fehérje extraktum; 2.  $\text{Zn}(\text{OH})_2$ -dal kezelt TA bab fehérje extraktum

A 2 tf%  $\text{Zn}(\text{OH})_2$ -os kezeléssel kapott felülúszóból anioncserélő oszlopon tovább dúsítottam az  $\alpha\text{AI}$  frakciót, majd gélszűrő oszlopon megkaptam a tiszta fehérjét. A gélszűrés utáni kromatogramokat és a hozzájuk tartozó paramétereket a 15. ábra mutatja a TA babból és a GM borsóból izolált  $\alpha\text{AI}$  példáján.



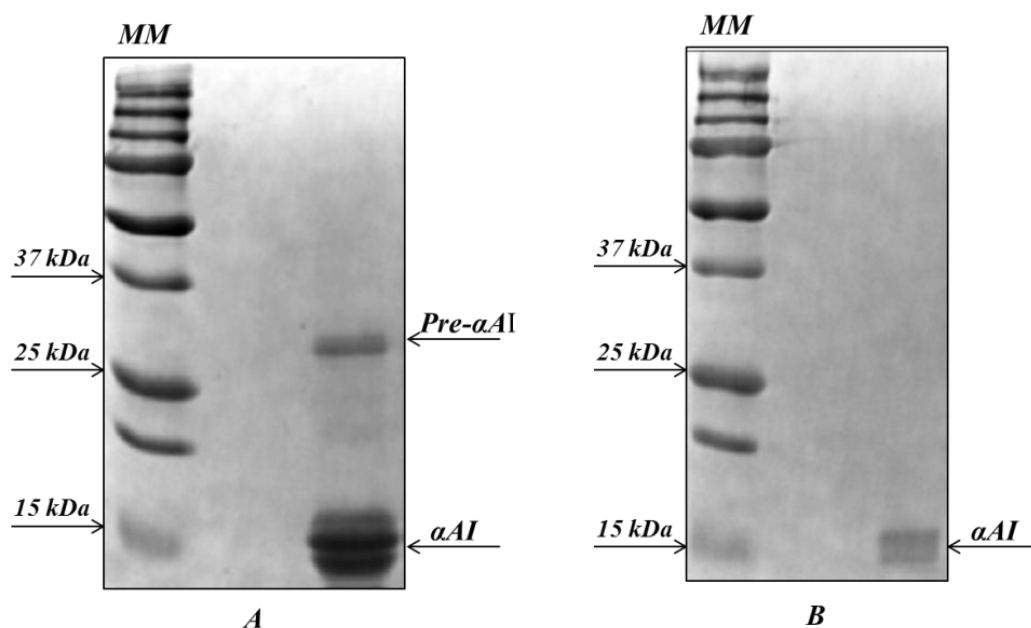


**15. ábra:** TA babból (A) és GM borsóból (B) izolált αAI kromatogramja Superose 12 FPLC (Pharmacia) gélszűrő oszlopon  
 Injektált minta: 200μl, eluens: PBS. Áramlási sebesség: 0,5 ml/perc, nyomás: 0,6 MPa

#### 4.1.6. Az izolált fehérjék azonosítása molekulatömeg (1-DE, immunblott, LOC, Schiff-festés) szerint valamint Tendergreen bab αAI-1 ellen nyúlban termelt ellananyaggal

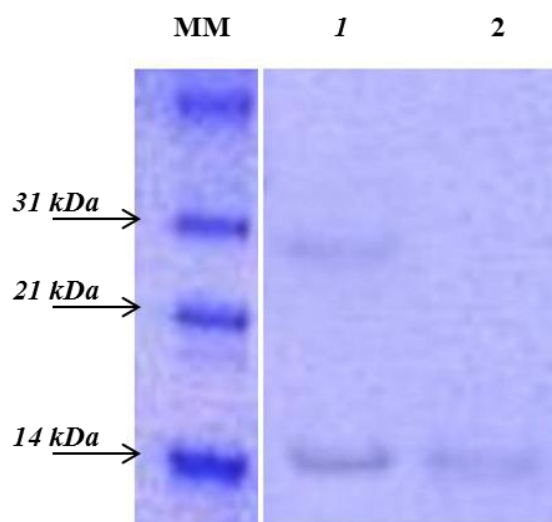
A babokból és a GM borsóból izolált αAI-ok tisztaságát elektroforetikus elválasztással ellenőriztem. Az elválasztást elvégeztem a *GMSAFOOD* pályázat keretében kapott Tendergreen bab és GM borsó αAI-okkal is. Az SDS-PAGE mintázatok a Tarkabab és a GM borsó eredetű αAI-ok példáján mutatom be (16. ábra). A bab izolátumban a 15 kDa molekulatömeg tartományban voltak detektálhatóak fehérjesávok, valamint 25 és 37 kDa közötti molekulatömeg tartományban, feltételezhetően az αAI nem processzáldott előproteinje (pre-αAI) volt látható. Mivel a tisztítást αAI aktivitás alapján végeztem, ezért a processzáldott aktív tartomány jelentősen feldúsult az előfehérjével szemben. A magyarországi babokból izolált αAI-ok hasonló mintázatot mutattak. A GM borsó eredetű αAI esetében azonban csak az aktív fehérje molekulatömeg tartományában (15 kDa) voltak detektálható sávok. Az előfehérje a borsóban valószínűleg teljes mértékben

processzáldott. MORENO és mts. (1990) SDS-PAGE módszerrel bab  $\alpha$ AI-ban öt fehérjesávot detektáltak a 15 kDa és a 19 kDa közötti régióban, továbbá a 28 kDa régióban előfehérjét találtak. Egy későbbi publikációban szintén a 14 kDa és 31 kDa molekulatömegnél azonosították a bab  $\alpha$ AI-t (DAYLER és mts., 2005). CAMPBELL és mts. SDS-PAGE mintázaton szintén 10 és 20 kDa tartományban azonosítottak  $\alpha$ AI fehérjesávokat különböző babokból és GM borsóból izolált  $\alpha$ AI-okban, valamint a bab izolátumok 30 kDa molekulatömeg tartományában azonosították az előfehérjét is (CAMPBELL és mts., 2011).



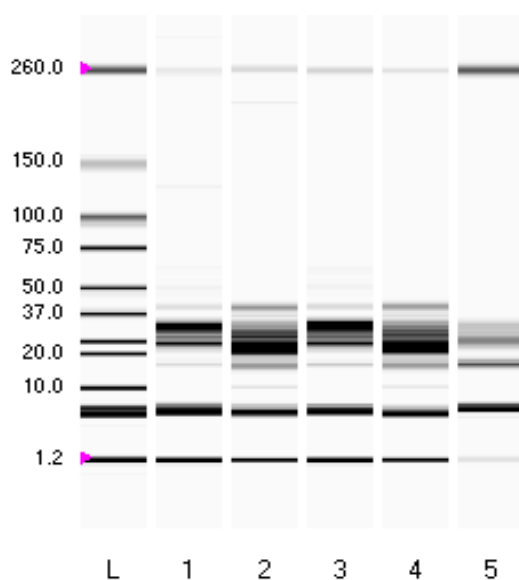
**16. ábra:** TA babból (A) és GM borsóból (B) izolált  $\alpha$ AI 15 %-os SDS-PAGE mintázata  
MM: *All Blue* molekulatömeg marker

A bab eredetű  $\alpha$ AI-ok azonosítására Tendergreen bab  $\alpha$ AI ellen nyúlban termelt poliklonális ellenanyagot használtam. Immunreaktív fehérjesávokat detektáltam a magyarországi babokból izolált  $\alpha$ AI-ok esetében a processzált 15 kDa illetve a nem processzált 30 kDa molekulatömeg tartományában és a GM borsó  $\alpha$ AI processzált inhibitor tartományában (17. ábra). PUEYO és mts. szintén immunreaktívnak találták a bab  $\alpha$ AI 30 kDa régióban lévő polipeptidjét valamint a processzált fehérjét is a 15-18 kDa tartományban (PUEYO és mts., 1993).



**17. ábra:** TA bab  $\alpha$ AI (1) és GM borsó  $\alpha$ AI (2) immunblott mintázata nyúlban TG bab  $\alpha$ AI ellen termelt ellenanyaggal (1:40) és anti-nyúl IgG HRPO konjugátummal (1:500)  
MM: *Low Range* molekulatömeg marker

A magyarországi babokból izolált fehérjéket LOC technikával is elválasztottam, melynek mintázatát mutatja a 18. ábra. A mintázatokat a retenciós idő alapján ( $t_R$ ) értékeltem. Az izolátumok 25-29 másodperc közötti  $t_R$ -vel jellemezhetőek, ezen kívül a bab izolátumoknál tapasztalható egy 30 másodpercnél megjelenő sáv is, ami valószínűleg az előfehérje retenciós ideje. A Huanita szárazbab, a Vörös vesebab és a GM borsó izolátumokban négy, míg a Bokorbab és a Tarkabab bab izolátumokban hét  $t_R$  jellemzi az aktív fehérjetartományt. A  $t_R$ -ket a hozzájuk tartozó fehérje mennyiségekkel a 7. táblázat foglalja össze, a 19. ábra pedig a Bokorbab izolátum és a GM borsó izolátum példáján keresztül szemlélteti a bab és borsó inhibitor közötti különbséget.



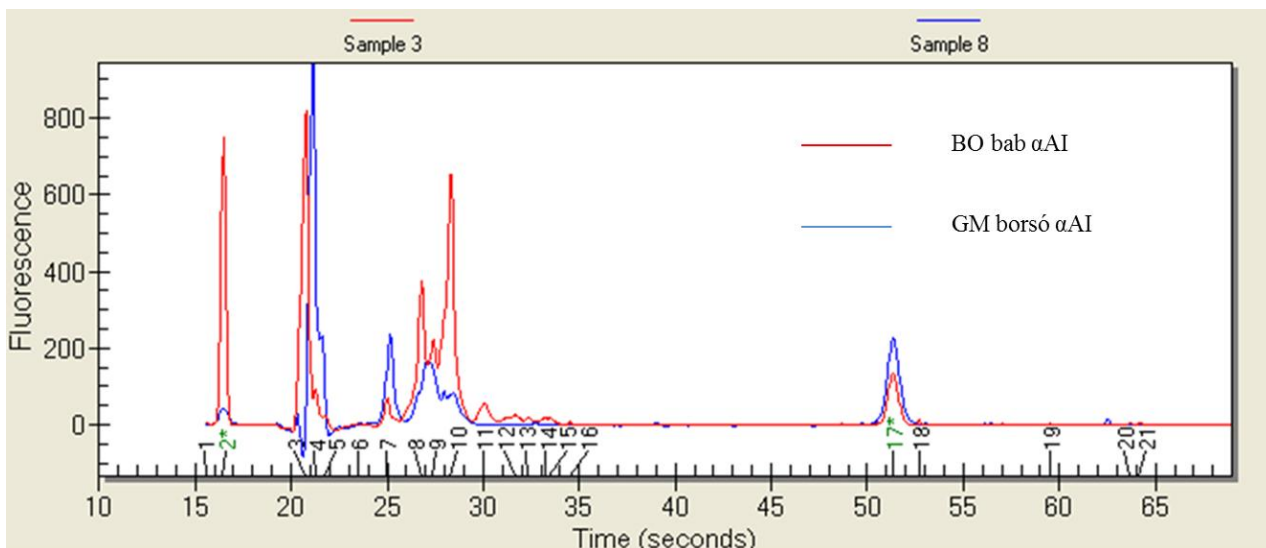
**18. ábra:** A különböző magyarországi babfajtákból és a GM borsóból izolált  $\alpha$ AI-ok LOC elektroforetikus elválasztása  
L: molekulatömeg markerek (kDa); 1. HSZ bab  $\alpha$ AI; 2. BO bab  $\alpha$ AI; 3. VV bab  $\alpha$ AI; 4. TA bab  $\alpha$ AI; 5. GM borsó  $\alpha$ AI;

**7. táblázat:** A hazai termesztésű babfajták  $\alpha$ AI-ainak LOC elválasztása során kapott görbék paraméterei

$t_R$ : retenció idő (másodperc);

t: az adott fehérjesáv százalékos aránya az összfehérje mennyiségben (%)

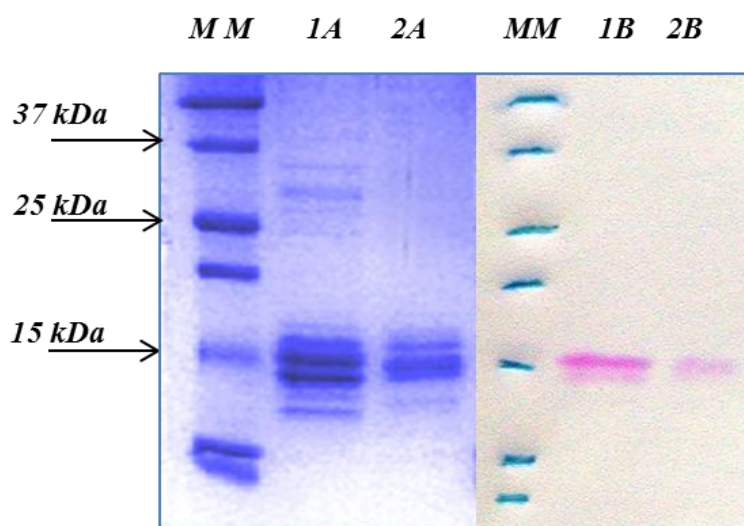
Huanita szárazbab $\alpha$ AI		Bokorbab $\alpha$ AI		Vörös vesebab $\alpha$ AI		Tarkabab $\alpha$ AI		GM borsó $\alpha$ AI	
$t_R$ (mp)	t (%)	$t_R$ (mp)	t (%)	$t_R$ (mp)	t (%)	$t_R$ (mp)	t (%)	$t_R$ (mp)	t (%)
24.97	3.52	24.91	8.34	25.04	1.41	24.92	8.28	25.14	34.02
26.74	28.30	26.13	39.92	26.85	25.40	26.22	40.66	27.05	44.45
27.40	10.20	26.69	20.40	27.43	13.98	26.79	20.25	27.99	5.74
28.35	50.51	27.46	8.62	28.31	49.93	27.52	8.07	28.43	13.42
30.07	3.97	27.81	9.37	30.12	2.99	27.93	9.55		
		28.48	3.56			28.51	3.56		
		29.19	1.15			29.23	1.20		
		30.01	6.68			30.12	6.84		



**19. ábra:** BO babból és GM borsóból izolált  $\alpha$ AI-ok elektroforetogramja LOC elválasztást követően

A tisztított  $\alpha$ AI-okat Schiff-reagenssel festettem meg annak érdekében, hogy a fehérjén lévő szénhidrátokat láthatóvá téve a fehérje glikoprotein jellegét igazoljam. Az eljárás során a szénhidráton lévő aldo-csoportokat perjódsavval aldehiddé oxidáljuk, majd az aldehideket fukszint tartalmazó aldehyd reagenssel, ú.n. Schiff-reagenssel mutatjuk ki.

A 20. ábra szemlélteti a Bokorbab és a GM borsó  $\alpha$ AI-ok Schiff-reagenssel való reakciójának eredményét. Látható, hogy az aktív régióban lévő inhibitor magenta színű sávokat ad, tehát ez a régió glikoproteint tartalmaz. A poszt-transzlációs módosulásokon keresztülment fehérje az alfa- és béta alegységekre való szakadásakor glikozilálódik (MORENO és mts., 1990). A bab esetében a 30 kDa előfehérje tartományban viszont nem láthatóak sávok, ez igazolja azt, hogy ez a sáv még a poszt-transzlációs módosulás előtti nem processzáldott fehérje, ahol a szénhidrát részek még nem kapcsolódtak a fehérjéhez. A Tendergreen bab  $\alpha$ AI és a magyarországi babfajtákból izolált  $\alpha$ AI-ok a 15 kDa tartományban festődtek meg a Schiff-reagenssel.



**20. ábra:** BO bab  $\alpha$ AI és GM borsó  $\alpha$ AI SDS-PAGE mintázata (A) és Schiff-reagenssel való festés után (B)

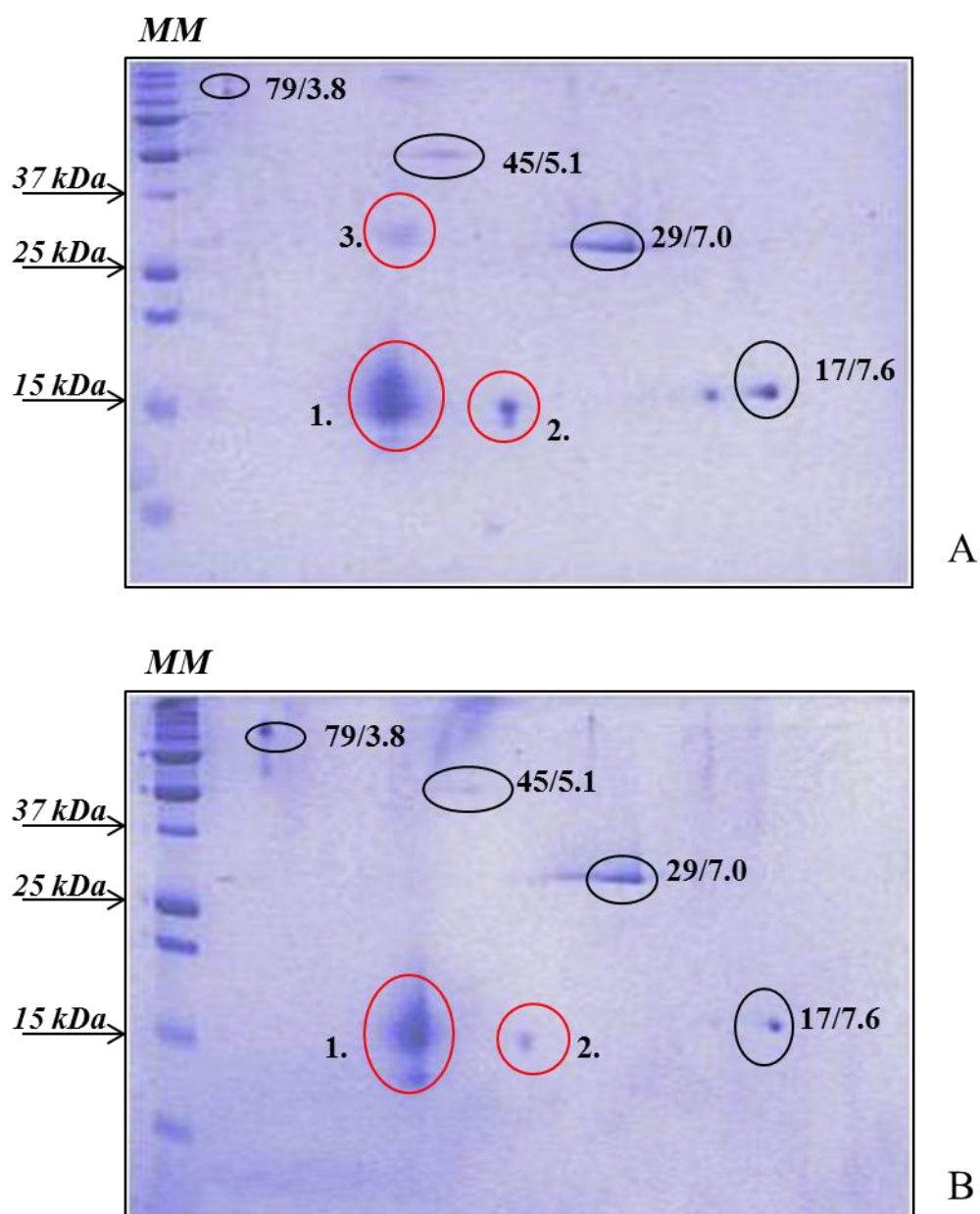
MM: *All Blue* molekulatömeg marker

SDS-PAGE: 1A: BO bab  $\alpha$ AI; 2A: GM borsó  $\alpha$ AI

Schiff-festés: 1B: BO bab  $\alpha$ AI; 2B: GM borsó  $\alpha$ AI

#### 4.1.7. Az izolált $\alpha$ AI-ok $\alpha$ - és $\beta$ -alegységeinek marker peptidek alapján történő 2-DE elválasztást követő tömegspektrometriás azonosítása

Az elválasztás hatékonyságának növelése érdekében 2-DE módszerrel szeparáltam az izolált  $\alpha$ AI-okat. Így, azok az első dimenzióban az izoelektromos pontjuk alapján válnak szét, a második dimenzióban pedig a molekulatömegük szerint. Ennek eredményeképpen az egydimenziós elválasztáshoz képest extra fehérjefoltokat tudtam detektálni. A Coomassie Blue festést követően kapott 2-DE mintázatokat Tarkabab és GM borsó izolátumának példáján a 21. ábra mutatja. A 2-DE szeparálást elvégeztem a referenciaként használt Tendergreen bab és GM borsó  $\alpha$ AI-okkal (ref.), valamint a magyarországi  $(\text{ZnOH})_2$  módszerrel izolált  $\alpha$ AI-okkal és a GM borsóból a  $(\text{ZnOH})_2$  módszerrel izolált  $\alpha$ AI-al, annak érdekében, hogy összehasonlítsam a preparátumok tisztaságát is. A fehérjesávok izoelektromos pontjainak és molekulatömegeinek értékeit PDQUEST (Bio-Rad) szoftver segítségével értékeltem ki. A kapott értékeket a 8. táblázat foglalja össze. A Tendergreen bab  $\alpha$ AI és a magyar babfajtákból izolált  $\alpha$ AI-ok esetében három fő fehérjefoltot, míg a GM borsóból származó  $\alpha$ AI-ok esetében két fő fehérjefoltot detektáltam.



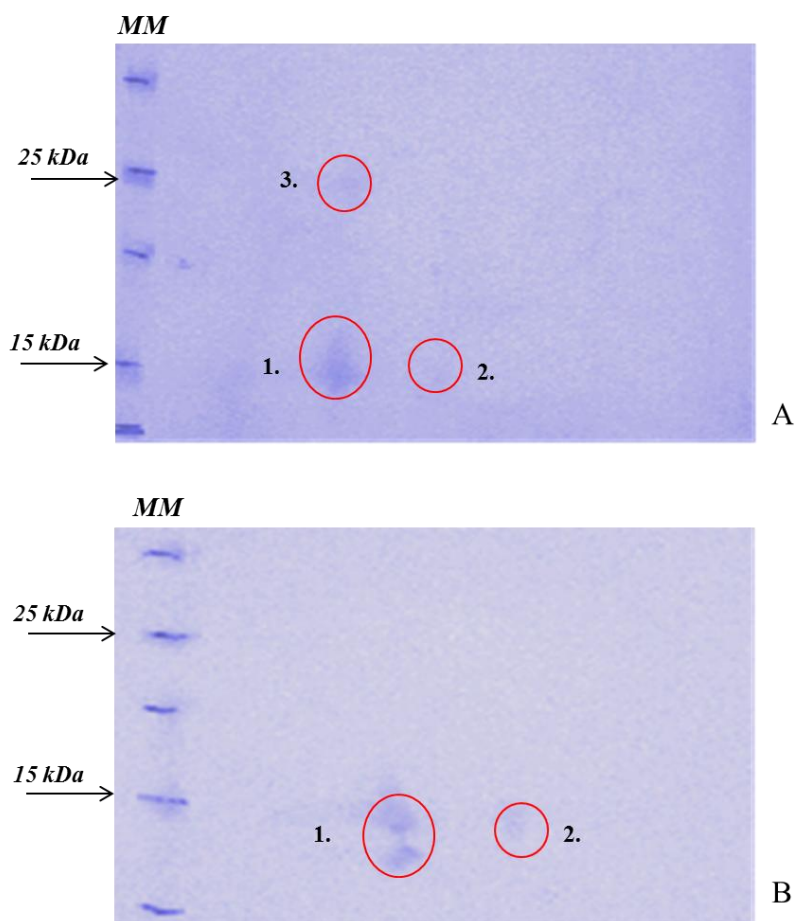
**21. ábra:** TA bab  $\alpha$ AI (A) és GM borsó  $\alpha$ AI (B) 2-DE szeparált fehérjemintázata  
A pirossal bekarikázott és számozott foltok az  $\alpha$ AI szeparált polipeptidjei, a feketével bekarikázott foltok a 2-DE markerfehérjék [MW(kDa)/pI]  
Molekulatömeg markerek: MM: *All Blue* molekulatömeg marker  
Molekulatömeg és izoelektreomos pont markerek (MM/pI): amiloglükózidáz (79/3,8); ovalbumin (45/5,1); karbon-anhidráz (29/7,0); mioglobin (17/7,6)

**8. táblázat:** A bab és borsó eredetű  $\alpha$ AI-ok PDQUEST szoftveres kiértékeléssel kapott molekulatömegei (MM, kDa) és izoelektromos pontjai (pI) 2-DE elválasztást követően

	TG bab $\alpha$ AI (ref.)		HSZ bab $\alpha$ AI		BO bab $\alpha$ AI		VV bab $\alpha$ AI		TA bab $\alpha$ AI		GM borsó $\alpha$ AI (ref.)		GM borsó $\alpha$ AI	
Fehérjefolt	MM (kDa)	pI	MM (kDa)	pI	MM (kDa)	pI	MM (kDa)	pI	MM (kDa)	pI	MM (kDa)	pI	MM (kDa)	pI
1.	13-17	4,7	14-18	5,1	13-15	4,7	14-17	4,8	14-18	4,9	14-16	4,8	13-16	4,8
2.	16	5,7	16	6,0	16	5,8	17	5,8	17	5,9	16	5,7	16	5,8
3.	30	4,8	31	5,3	31	4,9	32	4,8	31	5,0	-	-	-	-

Az aktív inhibitor molekulatömeg tartományában két különböző izoelektromos pontnál azonosítottam fehérjefoltokat. Ezek a *folt 1* (MM 13-18 kDa; pI 4,7.-5,1) és a *folt 2* (MM 16-17 kDa; 5,7-6,0). Mind az öt bab és mind a kétféle GM borsó izolátum 2-DE mintázatában jól elkülöníthető a két izoelektromos pontnál lévő fehérjefolt, ezzel az egydimenziós szeparáláshoz képest többlet információt kaptam. A pre-proteinnek megfelelő molekulatömeg tartományban az egydimenziós elválasztáshoz hasonlóan a bab izolátumoknál fehérjefoltot azonosítottam a 30 - 32 kDa között 4,8 – 5,3 pI-nál (*folt 3*). Ebben a molekulatömeg tartományban nem detektáltam fehérjefoltot a GM borsóból származó  $\alpha$ AI esetében sem a referencia fehérjében, sem az általam izolált fehérjében. DE LA FUENTE és mts. (2011) bab (*Phaseolus vulgaris*) fehérjéinek 2-DE elválasztása után tömegspektrometriás azonosítással hasonlóan a 15,1 kDa és 27,2 kDa molekulatömeg tartományban és 4,4 izoelektromos pontnál azonosított  $\alpha$ AI-t. A Tendergreen bab  $\alpha$ AI ellen nyúlban termelt poliklonális ellenanyag 2-DE szeparálást követő immunblotton felismerte mindhárom fehérjefoltot a bab izolátumokban és mindkét fehérjefoltot a borsó izolátumokban (22. ábra).





**22. ábra:** TA bab (A) és GM borsó (B)  $\alpha$ AI 2-DE szeparálást követő immunblott mintázata  
Tendergreen bab  $\alpha$ AI ellen nyúlban termelt antitesttel (1:40) és anti-nyúl IgG HRPO  
konjugátummal (1:200)

Az 1. és 2. fehérjefoltok az aktív  $\alpha$ AI polipeptidjei, a 3. fehérjefolt a nem-processzált inhibitor  
forma

MM: *All Blue* molekulatömeg marker

A 2-DE szeparált  $\alpha$ AI fehérjefoltokat LC-ESI-TOF-MS módszerrel azonosítottam (MACZÓ és mts., 2014). Ezeket a vizsgálatokat a *COST Infogest FA 1005* projekt keretében a Genti Egyetem Élelmiszerbiztonsági- és Minőségi Tanszékének Élelmiszerkémiai és Táplálkozástudományi Kutatócsoportjában végeztem.

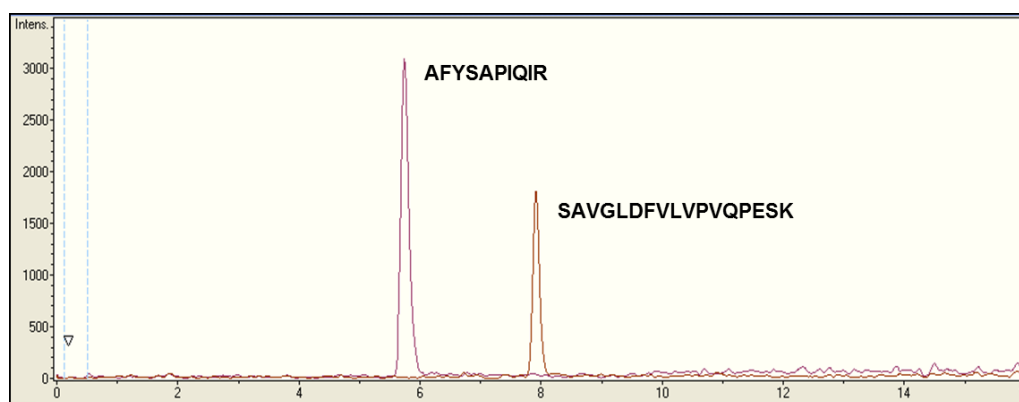
A gélről kivágott fehérjefoltokat tripszinnel emésztettem, majd az emésztett peptideket az  $\alpha$ AI  $\alpha$ - és  $\beta$ -láncainak marker peptidjei alapján azonosítottam. A UniProt adatbázis segítségével megállapítottam az  $\alpha$ AI (*Phaseolus vulgaris*, Kidney bean, French bean, P02873) *in silico* tripszinnel emésztett peptidjeinek elméleti molekulatömegét (9. táblázat). Az  $\alpha$ -lánc 77 aminosavból áll (24-100 pozíció), míg a  $\beta$ -lánc 139 aminosav hosszúságú (101-239 pozíció).

**9. táblázat:** Az  $\alpha$ - és  $\beta$ - lánc *in silico* tripszinnel emésztett peptidjei

\* marker peptidek

Alfa-lánc			Béta-lánc		
pozíció	szekvencia	MM	pozíció	szekvencia	MM
37-65	TNLILQGDATVSSNGNLQLSYNSYDSMSR	1574,7462	193-226	EVYDWVSVGFSATSGAYQWS YETHDVLSWSFSSK	1953,383
76-94	DSTTGNVASFDTNFTMNIR	1045,9760	143-159	SVPWDVHDYDQGNAEVR	993,9506
24-36	ATETSFIIIDAFNK	728,8695	101-117	SAVGLDFVLVPVQPESK *	892,9932
66-75	AFYSAPIQIR *	583,3218	118-131	GDTVTVFEFDTFLSR	793,8885
95-97	THR	207,1164	168-180	VFSVSLSNPSTGK	661,8511
98-100	QAN	166,5819	181-192	SNNVSTTVELEK	660,8357
			132-142	ISIDVNNNDIK	622,8277
			160-167	ITYNSSTK	457,2349
			227-231	FINLK	317,6998
			235-237	SER	196,1004
			232-234	DQK	195,6028
			238-239	SN	110,5500

CAMPBELL és mts. (2011) két marker peptidet határoztak meg a Tendergreen bab  $\alpha$ AI  $\alpha$ - és  $\beta$ -láncának detektálására. Ezek az AFYSAPIQIR szekvencia a 66-75 aminosav pozíciónál az  $\alpha$ -láncra és az SAVGLDFVLVPVQPESK szekvencia a 101-117 aminosav pozíciónál a  $\beta$ -láncra vonatkozóan. A 23. ábra az  $\alpha$ -és  $\beta$ -láncok kromatogramjait mutatja.



**23. ábra:** Az  $\alpha$  (AFYSAPIQIR)- és  $\beta$  (SAVGLDFVLVPVQPESK)- láncok marker peptidjeinek kromatogramjai

A vizsgálat során a tripszinnel emésztett peptideket és különös tekintettel a két marker peptidet kerestem a fehérjefoltokban. A 10. táblázat összegzi, hogy mely  $\alpha$ AI, mely 2-DE szeparált foltjában azonosítottam az  $\alpha$ - illetve a  $\beta$ -láncokhoz tartozó peptideket. Először összehasonlítottam a két referencia  $\alpha$ AI-ban detektált peptideket (10. A táblázat). A Tendergreen bab és a GM borsó eredetű  $\alpha$ AI processzált (aktív) fehérje tartományban (*folt 1* és *folt 2*) az  $\alpha$ -láncból származó peptidek száma megegyezik. Négy peptidet, köztük a marker peptidet (37-65; 76-94; 24-36; 66-75) detektáltam a *folt 1*-ben, ami 92 %-os szekvencia lefedettségnek felel meg. A *folt 2*-ben viszont csak a marker peptid (66-75) volt detektálható, ami egy 10 aminosavból álló peptid, így a szekvencia lefedettség 13 %-os. A  $\beta$ -láncból származó peptidek száma szintén egyezett, kilenc peptidet, beleértve a marker peptidet detektáltam a Tendergreen bab és a GM borsó  $\alpha$ AI-ban a *folt 1*-ben (143-159; 101-117; 118-131; 168-180; 181-192; 132-142; 227-231; 235-237; 232-234), ez 68 % szekvencia lefedettséget jelent. Azonban eltérést találtam a  $\beta$ -láncba tartozó peptidekben az aktív inhibitor tartomány magasabb izoelektromos pontjánál (*folt 2*), ugyanis egyetlen peptidet sem detektáltam a GM borsó  $\alpha$ AI-ban ellentétben a Tendergreen bab  $\alpha$ AI-val (24. ábra).

A magyarországi babfajtákból és a GM borsóból  $\text{Zn}(\text{OH})_2$  módszerrel izolált  $\alpha$ AI-okban detektált peptideket a 10. B táblázat összegzi. A babokból izolált inhibitorok  $\alpha$ -láncában csak a marker peptidek voltak detektálhatóak a *folt 1*-ben és *folt 2*-ben (66-75) 13-13 % szekvencia lefedettséggel, kivétel a Huanita szárazbab, ahol egyetlen peptid sem volt detektálható a *folt 2*-ben.

A  $\beta$ -láncot tekintve a *folt 1*-ben a Huanita szárazbab és a Bokorbab  $\alpha$ AI-ban 44 %-os szekvencia lefedettséggel öt peptidet (101-117; 118-131; 168-180; 181-192; 227-231), a Vörös vesebab  $\alpha$ AI-ban 22 %-os lefedettséggel két peptidet (101-117; 118-131) és a Tarkabab  $\alpha$ AI-ban 60 %-os lefedettséggel nyolc peptidet (143-159; 101-117; 118-131; 168-180; 181-192; 227-231; 235-237; 232-234) detektáltam. Az aktív inhibitor tartomány magasabb izoelektromos pontjánál (*folt 2*), Vörös vesebab esetén, csak a  $\beta$ -lánc marker peptidjét detektáltam (101-117), ami 12 %-os szekvencia lefedettségnek felel meg. A Tarkabab esetén viszont a marker peptid mellett még négy peptid volt detektálható (101-11; 118-131; 168-180; 181-192; 227-231), ez a szekvencia lefedettség 44 %-os volt. Nem detektáltam  $\beta$ -láncba tartozó peptideket ebben a tartományban a Huanita szárazbab és a Bokorbab  $\alpha$ AI-ban.

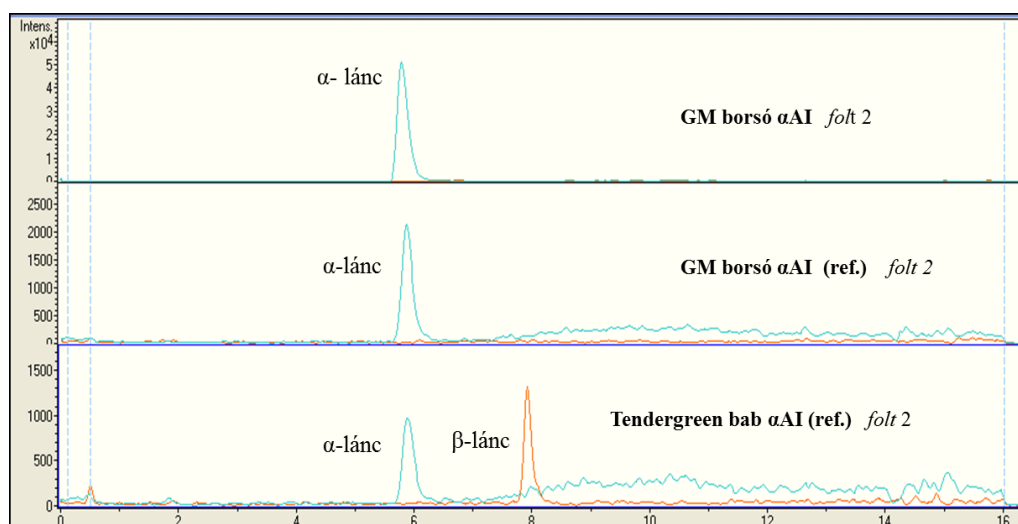
A pre-protein régiójában (31 kDa) variabilitást találtam a tripszinnel emésztett peptidek detektálhatóságában a különböző babok esetében. A Tendergreen bab, a Huanita szárazbab és a Tarkabab  $\alpha$ AI-ok ebben a tartományban tartalmazták mind az  $\alpha$ - és  $\beta$ -lánc marker peptidjét. A Bokorbab és a Vörös vesebab  $\alpha$ AI-ok ugyanezen molekulatömeg tartományában egyetlen peptidet sem detektáltam (10. B táblázat). Azonban ezek a fehérjefoltok immunológiai reaktivitást mutattak a Tendergreen bab  $\alpha$ AI elleni poliklonális antitesttel. Feltételezhetően az ebben a molekulatömeg tartományban található pre-protein genetikailag közel álló más fehérjét is tartalmazott, vagy

teljesen processzálódott illetve részlegesen processzálódott. CAMPBELL és mts. (2011) két kontamináns fehérjét azonosítottak a pre-protein régióban, ezek a fitohemagglutinin (PHA, trEMBL Q8RVX5) és egy inhibitor-típusú fehérje (AIL, GenBank BAA86927). Továbbá CAMPBELL és mts. (2011) a különböző *Phaseolus vulgaris* babfajtákból izolált  $\alpha$ AI-ok aminosav szekvenciájában eltéréseket mutatott ki (pl. Vörös vesebab és Tarkabab). Mivel a magyarországi babokból származó  $\alpha$ AI-ok aminosav szekvenciája pontosan nem ismert, azokban is előfordulhatnak aminosav kiesések, illetve cserélődések, melyek nehézséget okozhatnak a peptidek tömeg alapján történő azonosításában. A  $\text{Zn}(\text{OH})_2$  módszerrel izolált GM borsó  $\alpha$ AI-ban ugyanazokat a peptideket azonosítottam, melyeket a referencia GM borsó  $\alpha$ AI-ban, ezzel igazoltam a tisztítási módszer hatékonyságát.

**10. táblázat:** A referencia Tendergreen bab és GM borsó eredetű  $\alpha$ AI (A) és a magyarországi babfajtákból izolált  $\alpha$ AI-ok (B) 2-DE szeparált fehérjefoltjaiban azonosított peptidek, aláhúzással jelölve a marker peptidek

A	<i>folt 1</i>		<i>folt 2</i>		<i>folt 3</i>	
	$\alpha$ -lánc	$\beta$ -lánc	$\alpha$ -lánc	$\beta$ -lánc	$\alpha$ -lánc	$\beta$ -lánc
<b>TG bab <math>\alpha</math>AI (ref.)</b>	37-65 76-94 24-36 66-75	143-159 101-117 118-131 168-180 181-192 132-142 227-231 235-237 232-234	<u>66-75</u>	<u>101-117</u> 118-131 168-180 181-192 227-231 235-237 232-234	<u>66-75</u>	<u>101-117</u>
<b>GM borsó <math>\alpha</math>AI (ref.)</b>	37-65 76-94 24-36 <u>66-75</u>	143-159 <u>101-117</u> 118-131 168-180 181-192 132-142 227-231 235-237 232-234	<u>66-75</u>	-	nem várt	nem várt

<b>B</b>	<i>fol 1</i>		<i>fol 2</i>		<i>fol 3</i>	
	$\alpha$ -lánc	$\beta$ -lánc	$\alpha$ -lánc	$\beta$ -lánc	$\alpha$ -lánc	$\beta$ -lánc
<b>HSZ bab <math>\alpha</math>AI</b>	<u>66-75</u>	<u>101-117</u> 118-131 168-180 181-192 227-231	-	-	<u>66-75</u>	<u>101-117</u>
<b>BO bab <math>\alpha</math>AI</b>	<u>66-75</u>	<u>101-117</u> 118-131 168-180 181-192 227-231	<u>66-75</u>	-	-	-
<b>VV bab <math>\alpha</math>AI</b>	<u>66-75</u>	<u>101-117</u> 118-131	<u>66-75</u>	<u>101-117</u>	-	-
<b>TA bab <math>\alpha</math>AI</b>	<u>66-75</u>	143-159 <u>101-117</u> 118-131 168-180 181-192 227-231 235-237 232-234	<u>66-75</u>	<u>101-117</u> 118-131 168-180 181-192 227-231	<u>66-75</u>	<u>101-117</u>
<b>GM borsó <math>\alpha</math>AI</b>	37-65 76-94 24-36 <u>66-75</u>	143-159 <u>101-117</u> 118-131 168-180 181-192 132-142 227-231 235-237 232-234	<u>66-75</u>	-	nem várt	nem várt



**24. ábra:** TG bab és GM borsó  $\alpha$ AI-ok 2. számú foltjában detektált  $\alpha$ - és  $\beta$ -lánc peptid markereinek kromatogramjai 2-DE elválasztás után

#### 4.2. A Tendergreen bab és a GM borsó $\alpha$ AI immunogenitásának vizsgálata súlyos kombinált immunhiányos humanizált egérmodellben (HuSCID) orális érzékenyítést követően

Az allergiás immunválasz fajszerifikus, ezért ennek vizsgálatára még nincs validált módszer.

##### 4.2.1. A bab $\alpha$ AI aminosav szekvencia *in silico* homológia vizsgálata már ismert allergén szekvenciákkal

Az allergenitás vizsgálatánál először az  $\alpha$ AI szekvenciájának már ismert allergének szekvenciáihoz történő összehasonlítását végeztem el. Mivel, ma már számos adatbázis áll rendelkezésünkre a fehérjék allergenitásának szekvencia alapján való becslésére, ezért többféle adatbázis segítségével próbáltam esetleges szekvencia homológiát keresni más fehérjékkel. Mindegyik esetben a UniProt fehérjeadatbázisból kapott  $\alpha$ AI aminosav szekvencia információval dolgoztam (25. ábra).

Az adatbázisokban többféle kritérium alapján van lehetőség homológia keresésre. Az EFSA (2011) és a FAO/WHO (2001) által meghatározott kritériumok alapján keresztreakció lehetősége áll fenn a genetikai módosítás alkalmával expresszált új fehérjék esetében, ha 35 %-os szekvencia homológia figyelhető meg már ismert allergén szekvenciákkal vagy 6 egymást követő aminosav teljes homológiát mutat a szekvenciákban. A Full FASTA formátum alapon a teljes szekvencia alapján történik a predikció. Ez ugyan nem képezi részét az EFSA kritériumoknak, viszont a

nagyobb fokú homológiák keresésénél gyakori a használata. A szekvencia illesztés történhet 80 aminosav alapján, ahol szintén 35 % szerkezeti azonosság felett beszélhetünk homológiáról. Mindhárom kritériumot figyelembe vettem az  $\alpha$ AI szekvencia homológia vizsgálatánál.

10	20	30	40	50	
MIMASSKLLS	LALFLALLSH	ANSATETSF	IDAFNKTNLI	LQGDATVSSN	
	60	70	80	90	100
GNLQLSYNSY	DSMSRAFYSA	PIQIRDSTTG	NVASFDTNFT	MNIRTHRQAN	
	110	120	130	140	150
SAVGLDFVLV	PVQPESKGD	VTVEFDTF	RISIDVNNND	IKSVPWDVHD	
	160	170	180	190	200
YDGQNAEVRI	TYNSSTKVFS	VLSNPSTGK	SNNVSTTVEL	EKEVDWVSV	
	210	220	230	240	
GFSATSGAYQ	WSYETHDVL	WSFSSKFINL	KDQKSERSNI	VLNKIL	

**25. ábra:** *Phaseolus vulgaris* eredetű  $\alpha$ AI aminosav szekvenciája (**P02873**) a UniProt adatbázis alapján

Az SDAP adatbázis „FAO/WHO Allergenicity Test” alapján a bab  $\alpha$ AI aminosav szekvencia az első 80 aminosavat tekintve 51,21 % homológiát mutatott egy már ismert szója allergénnel, a *Gly m* lektinnel. Hat egymást követő aminosav (SLALFL) megtalálható volt a *Gly m* TI (szója Kunitz tripszin inhibitor) szekvenciájában is, továbbá öt olyan peptid szakasz volt a *Gly m* lektin aminosav szekvenciájában, amely hat aminosavból áll és a bab  $\alpha$ AI szekvenciája is tartalmazza ezeket (ILQGDA, VEFDTF, HDVLSW, DVLSWS, VLSWSF). Ha a teljes aminosav szekvenciát vesszük figyelembe, akkor a bab  $\alpha$ AI 41,06 %-ban mutatott szekvencia azonosságot a *Gly m* lektinnel (Full FASTA illesztés).

Az ADSF adatbázisban a teljes lánchosszat tekintve 33,7 %-ban találtam szekvencia azonosságot egy ismert allergénnel, a moggyoró *Ara h* allergénjével. Hat folytonos aminosavat nézve ez az adatbázis a Kunitz tripszin inhibitor mellett szintén talált hasonlóságot az *Ara h* allergénnel (TGNVASF).

A ProAP adatbázis szerint a 80 aminosav alapján történő illesztéssel az *Ara h* allergénnel kaptam 28,75 %-os szekvencia azonosságot. Hat egymást követő aminosav a *Gly m* (SLALFL) és az *Ara h* (TGNVAS) allergénekben megegyezett az  $\alpha$ AI szekvenciájában található ugyanazon hat

egymást követő aminosavval. A 11. táblázat a három adatbázisból kapott eredményeket foglalja össze.

**11. táblázat:** Az adatbázisokban talált szekvencia homológiák összegzése

	<b>SDAP</b>		<b>ADSF</b>		<b>ProAP</b>	
	<b>Allergén</b>	<b>szekvencia homológia (%)</b>	<b>Allergén</b>	<b>szekvencia homológia (%)</b>	<b>Allergén</b>	<b>szekvencia homológia (%)</b>
<b>80 aminosav alapján</b>	<i>Gly m</i> lektin	51,25 % (pozíció 1-80)	-	-	<i>Ara h</i>	38,75 % (pozíció 1-80)
<b>6 folytonos aminosav alapján</b>	<i>Gly m</i> TI <i>Gly m</i> lektin	SLALFL ILQGDA, VEFDTF, HDVLSW, DVLSWS, VLSWSF	<i>Gly m</i> /Kunitz tripszin inhibitor  <i>Ara h</i>	SLALFL  TGNVASF	<i>Gly m</i> TI  <i>Ara h</i>	SLALFL  TGNVASF
<b>Teljes lánc hossz alapján (Full FASTA)</b>	<i>Gly m</i> lektin	41,06 %	<i>Ara h</i>	33,7 %	-	-

Az allergiát kiváltó fehérjék legfőbb jellemezője, hogy IgE epitópokat hordoznak. Napjainkban számos bioinformatikai módszer áll rendelkezésre, melyek a laboratóriumi kísérletek megtervezését segítik. Egy predikciós szoftver (IEDB) segítségével a bab  $\alpha$ AI aminosav szekvenciáján potenciális lineáris B-sejt epitópokat térképeztem fel. Ezeket a potenciális immunepitóp aminosavakat a 12. táblázatban tüntettem fel.



**12. táblázat:** A bab  $\alpha$ AI szekvenciáján predikciós alapon feltérképezett potenciális lineáris B-sejt epitópok

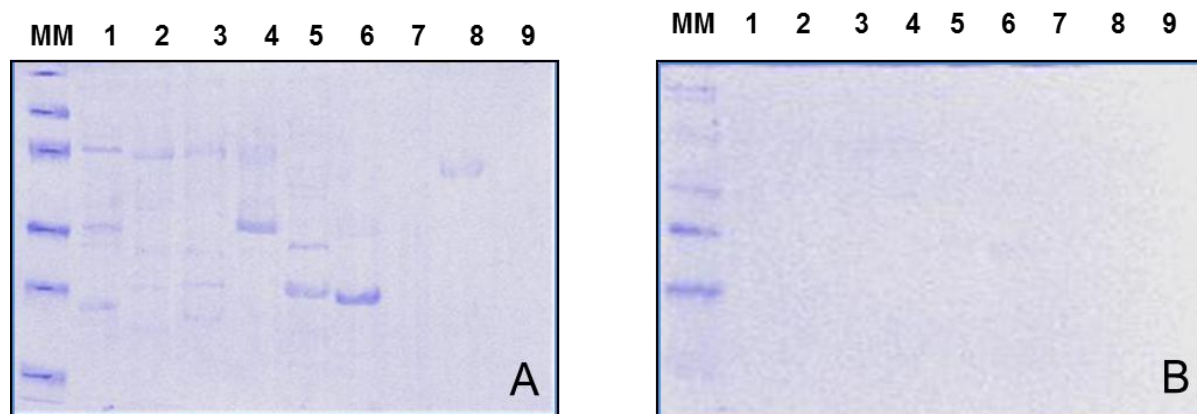
No	Start pozíció	Végpozíció	Peptid	Peptid hossz
1	22	26	NSATE	5
2	45	50	ATVSSN	6
3	73	84	QIRDSTTGNVAS*	12
4	112	122	VQPESKGDTV	11
5	137	144	NNNDIKSV	8
6	146	157	WDVHDYDGQNAE	12
7	174	185	SNPSTGKSNNVS	12
8	203	214	SATSGAYQWSYE	12
9	232	237	DQKSER	6

TGNVAS\*: Az *Ara h* allergénnel homológ szekvencia

A predikció alapján 9 peptid szakasz tekinthető potenciálisan B-sejt epitópoknak. Ezek közül a 6 aminosavból álló 79-84 pozícióban lévő TGNVAS szakasz (\*) az ADSF és ProAP adatbázisban *Ara h* allergénnel azonosított homológ szekvencia.

#### 4.2.2. Hüvelyes allergia klinikai hátterével rendelkező és egészséges donoroktól származó anonim humán szérumok szelekciója bab eredetű $\alpha$ AI specificitásra 1-DE/ és 2-DE/immunblot segítségével

Az epitóp predikció alapján a bab  $\alpha$ AI potenciális B-sejt epitópokat hordoz, ezért célom volt a fehérje IgE reaktivitásának vizsgálata. Mivel az allergia egy fajspezifikus immunválasz, ezért az allergiát kiváltó IgE-reaktív polipeptidek azonosítása céljából humán mononukleáris sejtekkel rendelkező egerek (HuSCID) vérérumait immunblotton vizsgáltam. Ehhez első lépésként a rendelkezésemre álló hüvelyes allergia klinikai tüneteivel és „*Prick in Prick*” teszttel pozitívnak (Skála érték: 3) minősített, anonim humán szérumoknál mind a 18 esetben, immunblottal igazoltam a hüvelyes fehérjékkel szembeni IgE reaktivitást (26. ábra). Kontrollként indifferens fehérjéket (gliadin, ovalbumin, kazein) használtam.



**26. ábra:** Klinikailag igazolt hüvelyes allergiás anonim humán szérumok (1:20) IgE reaktivitása 15 % SDS-PAGE/immunblotton

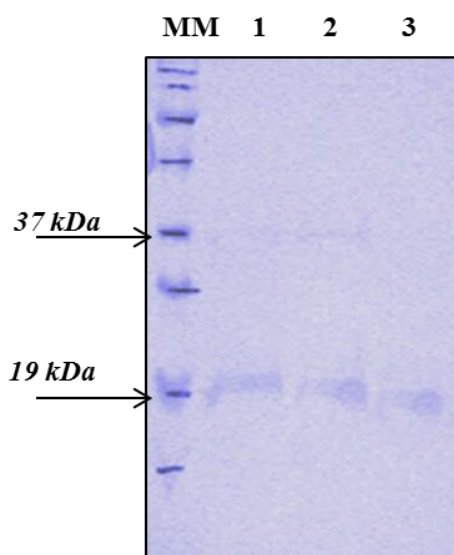
A: pozitív szérum (20. sz.); B: negatív szérum (21. sz.)

Alkalmazott konjugátum: kecskében termelt anti-humán IgE HRPO (1:100)

MM: *All blue* molekulatömeg marker

1. szója; 2. zöldborsó; 3. lencse; 4. bab; 5. amerikai mogoró; 6. szezám; 7. gliadin; 8. ovalbumin; 9. kazein

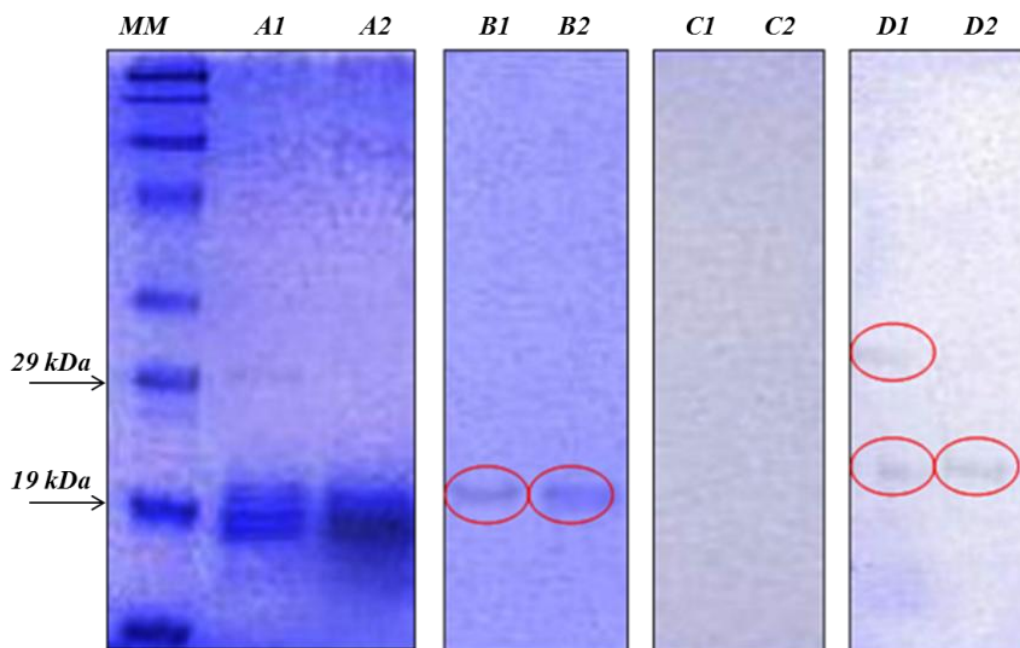
A hüvelyes fehérjékkel szemben IgE-reaktivitást mutató pozitív szérumok közül, a szénhidrát epitópok (CCD) kizárását követően, 3 db szérum esetében detektáltam  $\alpha$ AI-ra specificitást (27. ábra). A nem peptid specifikus CCD epitópok eliminálásához a szeparált fehérjéket enyhén savas közegben deglikoziláltam és Schiff-festéssel bizonyítottam a szénhidrátok eliminálását (28. ábra).



**27. ábra:** Bab és borsó  $\alpha$ AI specifikus humán szérum (20. sz) (1:20) immunblott mintázata kecskében termelt anti-humán IgE HRPO konjugátummal (1:100)

MM: *Broad Range* molekulatömeg marker

1. TG bab  $\alpha$ AI; 2. TA bab  $\alpha$ AI; 3. GM borsó  $\alpha$ AI

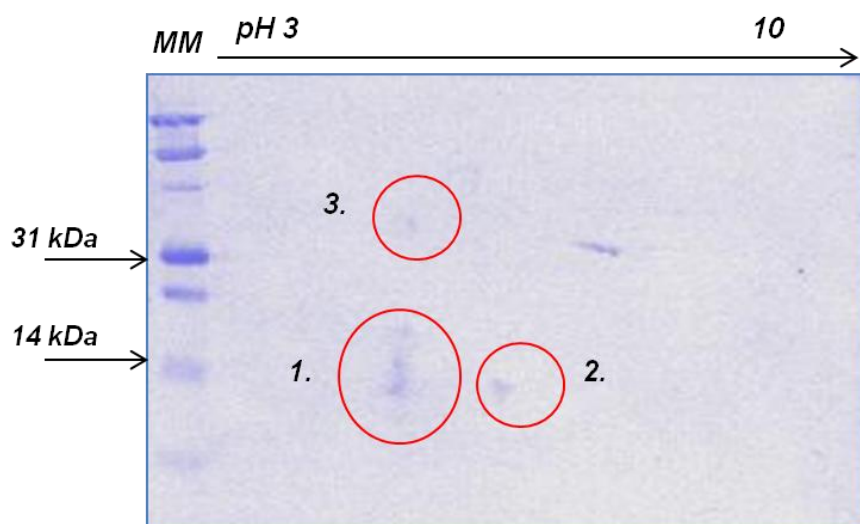


**28. ábra:** A TG bab és GM borsó  $\alpha$ AI SDS-PAGE elválasztást (A) követő membránon történő Schiff-festése (B), majd a fehérjék deglikozilálás utáni Schiff-festése (C) és a 20. sz. humán szérummal (1:20), majd kecskében termelt anti humán IgE HRPO konjugátummal (1:100) való inkubálást követően előhívott IgE-reaktív fehérjesávok (D)

MM: *Broad Range* molekulatömeg marker

1.TG bab  $\alpha$ AI; 2. GM borsó  $\alpha$ AI

A szelektált pozitív humán szérumok bab  $\alpha$ AI-ral szembeni IgE reaktivitását 2-DE szeparálást követően is megvizsgáltam. Mind a Tendergreen babból, mind a magyarországi babokból izolált  $\alpha$ AI-ok IgE-reaktivitást mutattak a fehérje mindhárom 4.1.7. fejezetben azonosított foltjával (*folt 1*, *folt 2*, *folt 3*) szemben (29. ábra). A GM borsóból izolált  $\alpha$ AI-hoz tartozó 4.1.7. fejezetben azonosított két fehérjefolt (*folt 1*, *folt 2*) szintén IgE-reaktivitást mutatott a szelektált humán szérumokkal szemben.



**29. ábra:** TG bab  $\alpha$ AI 2-DE szeparálását és deglikozilálását követő immunblott mintázata a szelektált IgE-reaktív humán szérummal (1:20) szemben, melynek azonosítása kecskében termelt anti-humán IgE HRPO konjugátummal (1:100) történt  
MM: *Low Range* molekulatömeg marker

#### 4.2.3. HuSCID modell a Tendergreen bab és a GM borsó eredetű $\alpha$ AI immunogenitásának igazolására, továbbá az egérszérumokkal azonosított IgE-reaktív polipeptidek humán pozitív szérumokkal való összehasonlító vizsgálata

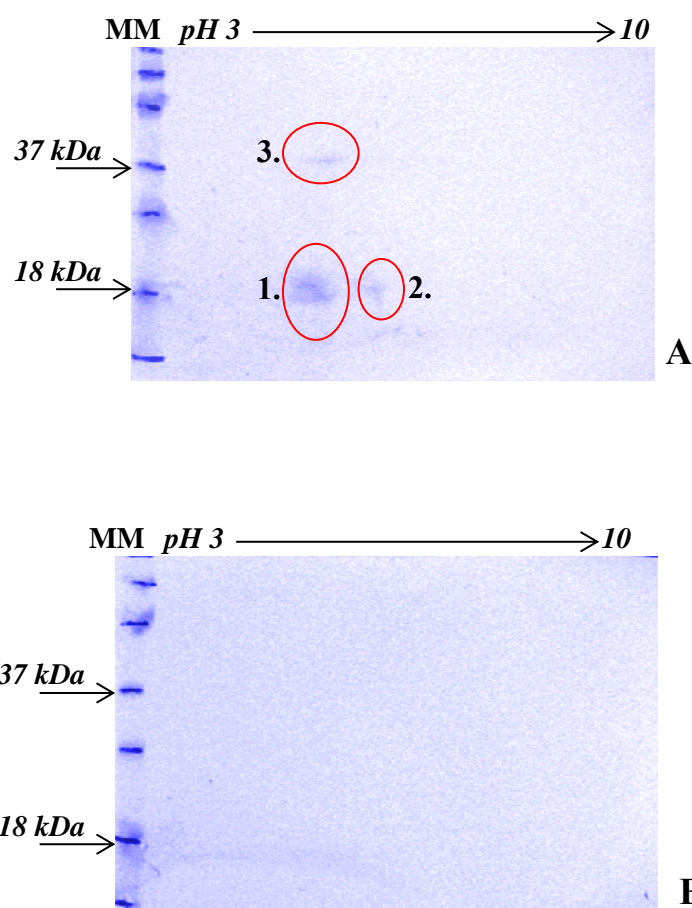
Az  $\alpha$ AI specificitással rendelkező hüvelyes allergiás betegszérumok segítségével azonosított beteg és egészséges donorok véréből nyert immunkompetens sejteket (PBMC) HuSCID egérbe vitték be, majd az egereket egy asztma protokoll szerint érzékenyítették  $\alpha$ AI-ral (13. táblázat).

**13. táblázat:** Hu-SCID egér érzékenyítési protokoll sémája

Csoport	Intragasztrális érzékenyítés (szájon át)	Intranazális érzékenyítés (orr nyálkahártyán keresztül)	HuSCID egér/ 10 <sup>7</sup> sejt	
			Egészséges donorból származó PBMC)	αAI pozitív hüvelyes allergiás betegdonorból származó PBMC)
A	PBS	PBS	HA1-HA5	PA1-PA5
C	TG bab	TG bab αAI	HC1-HC5	PC1-PC5
D	nGM borsó	nGM borsó αAI	HD1-HD5	PD1-PD5
E	GM borsó	GM borsó αAI	HE1-HE5	PE1-PE5
N	-	-	N1-5	N1-5

A HuSCID egérmodellből származó szérumok IgE-reaktivitásának vizsgálatából egyrészt arra szerettem volna következtetni, hogy az asztma protokoll szerint érzékenyített állatokban az αAI-tartalmú diéta (TG bab, GM borsó) képes-e specifikus IgE-típusú ellenanyagválasz kiváltására, szemben a nGM tartalmú diétát fogyasztó állatokkal, illetve a PBS-sel kezelt kontroll vagy kezeletlen naív állatokkal szemben. Amennyiben az egérszérumokban αAI-specifikus IgE-típusú ellenanyag termelődött a 2-DE szeparált és a membránra rögzített, deglikozilált αAI-antigénben reaktív polipeptideket talál. Ezért a következő kérdés az volt, hogy pozitív ellenanyagválasz csak allergiás betegdonorból (P) származó PMBC-ben vagy egészséges donorból (H) származó PBMC-ben is kiváltható-e. További kérdés volt, hogy a felismert polipeptidek megegyeznek-e a humán szérumokkal már azonosítottakkal. Mivel korábbi vizsgálataimban azt tapasztaltam, hogy a Tendergreen babban lévő αAI szintje nem biztosít megfelelő érzékenységet a fenti kérdések tisztázására, ezért ebben az esetben αAI izolátummal, míg GM és nGM borsó esetén őrlményben vizsgáltam az IgE-reaktív polipeptideket. Az érzékenyítésre felhasznált fehérje antigéneket (TG bab αAI, GM borsó őrlmény, nGM borsó őrlmény) 2-DE-el szeparáltam, majd membránra blottoltam és deglikoziláltam. Az IgE-reaktív polipeptideket a HuSCID egerek szérumaival és anti-humán IgE konjugátummal detektáltam. Az azonosítás érdekében, a szoftveres kiértékelés során, az őrlmények esetében is használtam marker fehérjéket. Eredményeim azt mutatták, hogy az αAI-tartalmú diéta specifikus IgE-ellenanyagok termelését indította. A részletes eredményeket az M5 melléklet tartalmazza. A felismert polipeptidek az esetek többségében a humán szérumokkal már

jellemzett polipeptid mintázatot mutatták. Néhány esetben az egészséges donor PBMC-ket kapott állatokból nyert szérumokkal is találtam pozitív felismerést. Ezt LEE és mts. (2013b) azzal magyarázták, hogy az alkalmazott HuSCID modell nem tudott érdemi különbséget tenni abban, hogy az első érzékenyítés már korábban (allergiás betegek) vagy csak érzékenyítési protokoll során történt meg. További megfigyelés volt, hogy a nGM borsó szintén mutatott IgE-keresztreaktivitást, amit LEE és mts. (2013a) a borsó lektin és a Tendergreen bab  $\alpha$ AI között meglévő immunológiai keresztreaktivitásnak tulajdonítottak. A PBS-sel kezelt, illetve naív egerekből származó szérumokkal szemben nem mutattam ki IgE-reaktív epitópokat. A 30. ábrán a Tendergreen bab  $\alpha$ AI HuSCID szérummal (PC1) felismert IgE reaktív polipeptid mintázát mutatom be (A ábra), illetve egy PBS-sel kezelt egér szérummal (PA2) előhívott immunblottot (B ábra). A PC1 szérum a hüvelyes allergiás szérumhoz hasonlóan mindhárom azonosított  $\alpha$ AI foltot IgE-reaktívnak ismerte fel.



**30. ábra:** TG bab  $\alpha$ AI 2-DE elválasztását követően a hüvelyes allergiás egyén mononukleáris sejtjeit hordozó és TG babbal érzékenyített HuSCID egér szérumával (PC1) (1:10) felismert IgE reaktív polipeptid mintázata (A) és hüvelyes allergiás egyén mononukleáris sejtjeit hordozó és PBS-sel kezelt HuSCID egér szérumának (PA2) (1:10) immunblott mintázata anti-humán IgE konjugátummal (1:100) (B)  
MM: *Broad Range* molekulatömeg marker

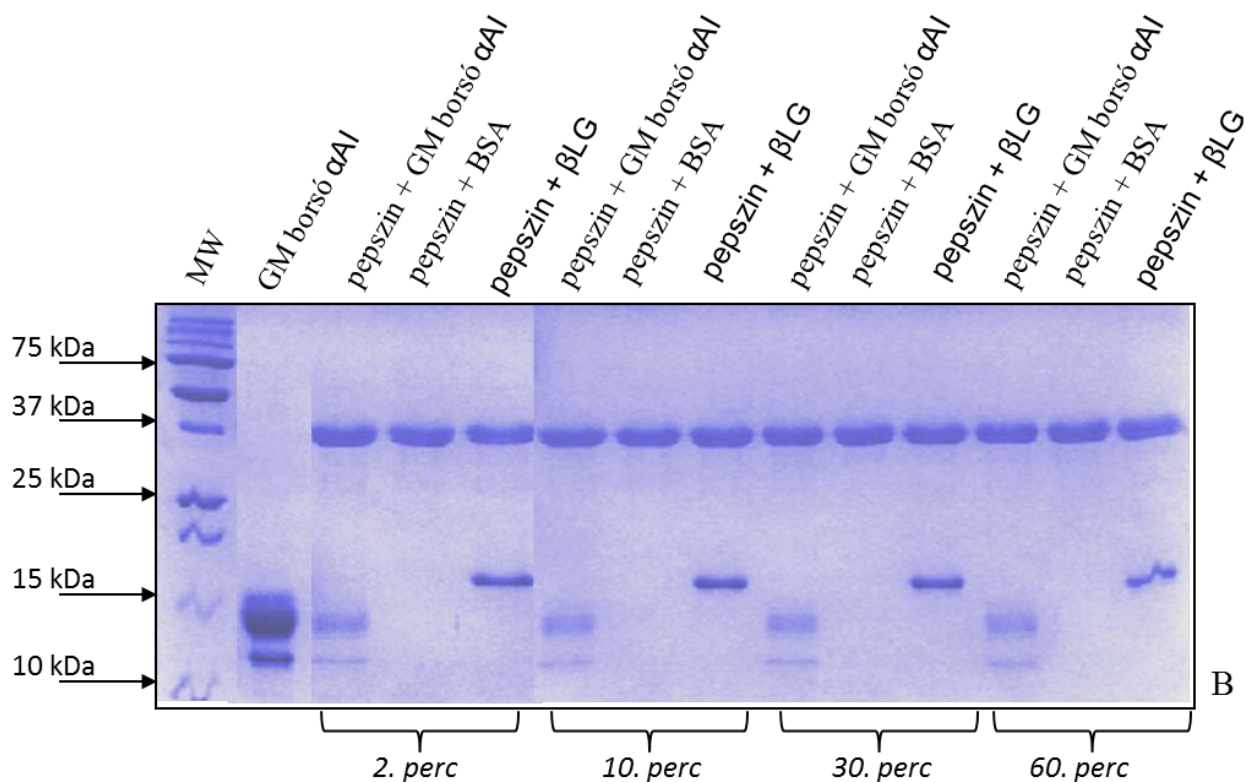
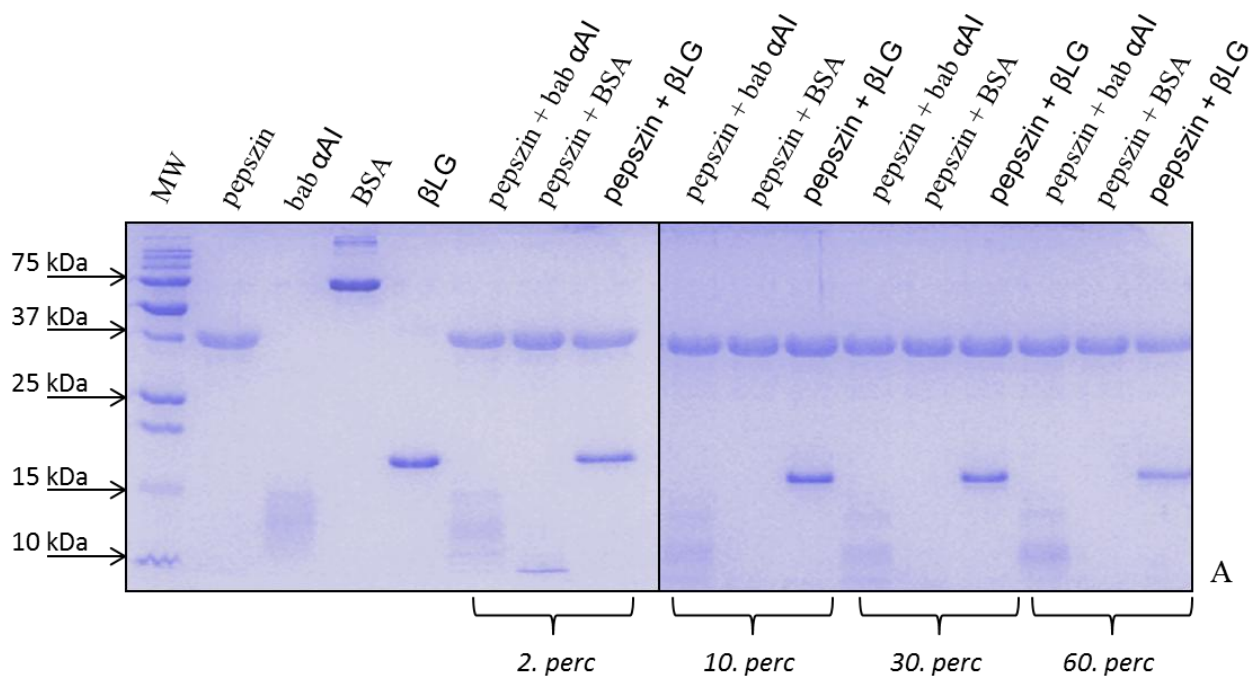
### **4.3. A bab $\alpha$ AI-ok viselkedésének vizsgálata szimulált gyomorfoliadékban, illetve egy Tarkabab őrlemény tápcsatornában való viselkedésének vizsgálata akut patkánymodellben, különös tekintettel az immunreaktív és az enzimaktív szerkezet megőrzésére**

A bab illetve a GM borsóban expresszáldott  $\alpha$ AI tápcsatornában való viselkedésének megismerésével képet kaphatunk arról, hogy a fehérje képes-e immunreaktív és/vagy enzimaktív formában túlélni az emésztést, megnövelve ezzel az allergén kockázatot, illetve képes-e az amiláz enzimmel komplexbe lépve beavatkozni a szénhidrát metabolizmusba.

#### **4.3.1. Az $\alpha$ AI-ok *in vitro* pepszines emésztése**

A hazai bab  $\alpha$ AI-ok *in vitro* pepszines emésztését szimulált gyomorfoliadékban (SGF) végeztem a referenciaként használt Tendergreen bab és GM borsó  $\alpha$ AI-al történő összehasonlításban. A 31. ábra Tendergreen bab és GM borsó  $\alpha$ AI emésztése során, különböző időpontokban vett minták SDS-PAGE mintázatát mutatja be. Egy jól emészthető kontroll fehérjeként BSA-t és egy nehezebben emészthető kontroll fehérjeként  $\beta$ -laktoglobulint használtam. A BSA molekulatömeg tartományában (70 kDa) már a 2. perc után eltűnt a fehérjesáv, míg a  $\beta$ -laktoglobulin 60 perc után is detektálható volt a 20 kDa körüli molekulatömeg tartományban. Ez azt bizonyítja, hogy a BSA már 2 perc után lebomlott szemben a  $\beta$ -laktoglobulinnal, mely ellenállt a pepszines emésztésnek. A Tendergreen babból és GM borsóból izolált  $\alpha$ AI-nál, hasonlóan a  $\beta$ -laktoglobulinhoz a 2, 10, 30 és 60 perces emésztési idő után is ugyanolyan intenzitású fehérjesávok voltak láthatóak a 15 kDa molekulatömegnél, amely alapján elmondható, hogy a bab  $\alpha$ AI ellenállt az *in vitro* pepszines emésztésnek.



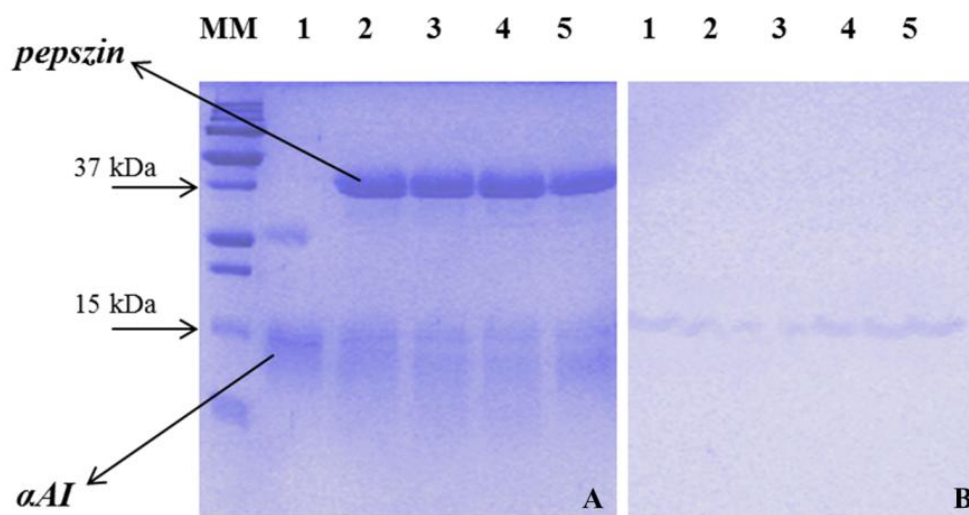


**31. ábra:** A TG bab  $\alpha$ AI (A) és a GM borsó  $\alpha$ AI (B) pepszines emésztése (pH 2) során a 2., 10., 30. és 60. percben vett minták 15% SDS-PAGE mintázata  
MW: All Blue molekulatömeg marker



A különböző magyarországi babfajtákból izolált  $\alpha$ AI-ok *in vitro* emésztése után kapott elektroforézis mintázatát mutatja be a 32. A ábra. Mindegyik izolátumban detektálható volt az  $\alpha$ AI 60 perc után a 15 kDa molekulatömeg tartományban, azonban az előfehérje a 30 kDa tartományban az emésztett minták esetén nem detektálható, feltehetőleg alegységeire bomlott. A 37 kDa molekulatömeg tartományban az emésztett minták esetén jól látható a pepszin sávja. Az *in vitro* emésztett fehérjék immunreaktivitását nyúlban Tendergreen bab  $\alpha$ AI ellen termelt antitest segítségével vizsgáltam. Mind a négy babfajtából izolált  $\alpha$ AI megtartotta immunreaktivitását a pepszines emésztés alatt (32. B ábra). Hasonló eredményt kaptam a GM borsó  $\alpha$ AI 60 perces emésztését követően is (33. ábra).

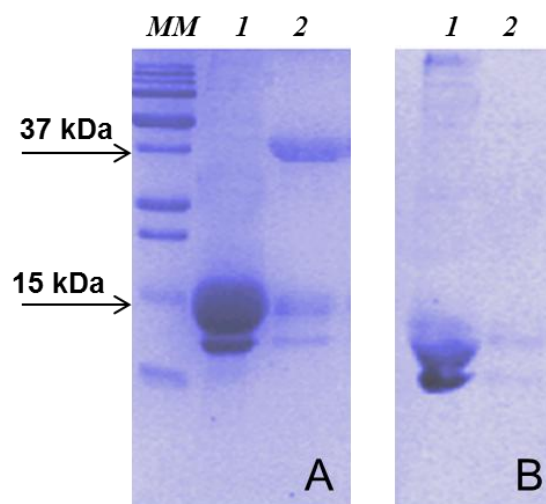
Az emésztett fehérjék inhibitor aktivitását Natív-PAGE-n vizsgáltam, ahol kontrollként intakt  $\alpha$ AI-t és búza eredetű  $\alpha$ AI-t használtam. A 34. ábrán látható, hogy az  $\alpha$ AI a 60 perces pepszines emésztés során elveszítette inhibitor aktivitását.



**32. ábra:** Különböző babfajtákból izolált  $\alpha$ AI-ok 60 perces *in vitro* pepszines emésztését követő minták 15% SDS-PAGE (A) és immunblott (B) mintázata Tendergreen bab  $\alpha$ AI ellen nyúlban termelt antitesttel (1:40) és anti-nyúl IgG HRPO konjugátummal (1:200)

MM: *All Blue* molekulatömeg marker

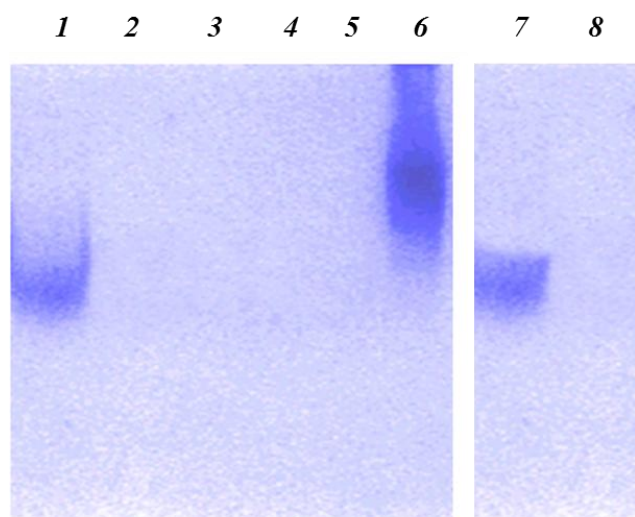
Kontroll: 1. natív TG bab  $\alpha$ AI; 60 perces *in vitro* pepszines emésztés utáni minták: 2. HSZ bab  $\alpha$ AI; 3. BO bab  $\alpha$ AI; 4. VV bab  $\alpha$ AI; 5. TA bab  $\alpha$ AI



**33. ábra:** A GM borsóból izolált  $\alpha$ AI 60 perces *in vitro* pepszines emésztését követő 15 % SDS-PAGE (A) és immunblott (B) mintázata Tendergreen bab  $\alpha$ AI ellen nyúlban termelt antitesttel (1:40) és anti-nyúl IgG HRPO konjugátummal (1:200).

MM: *All Blue* molekulatömeg marker

1. natív GM borsó  $\alpha$ AI; 2. GM borsó  $\alpha$ AI pepszines emésztést követően



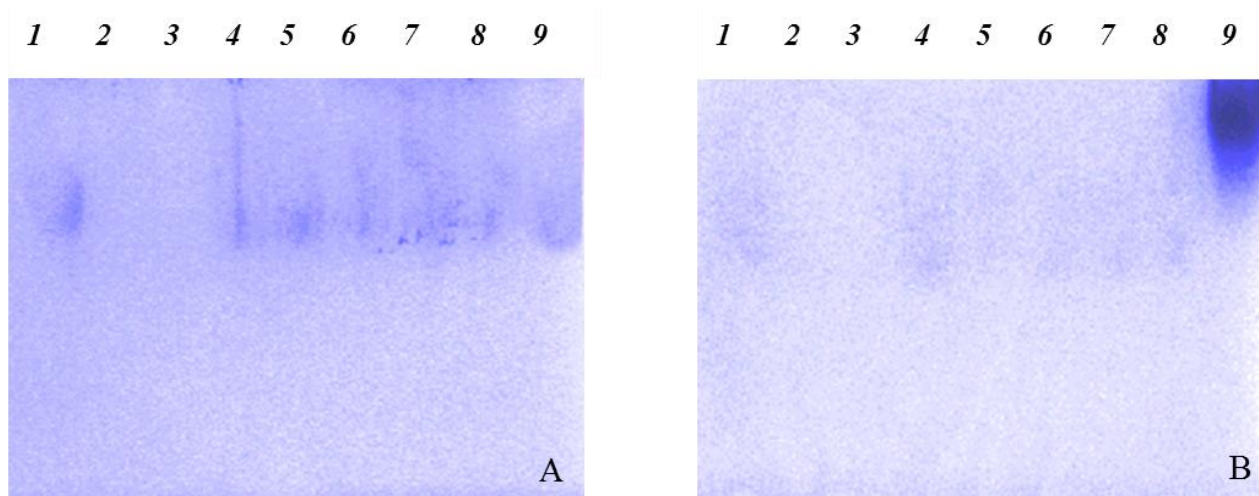
**34. ábra:** Magyarországon termesztett babfajtákból izolált  $\alpha$ AI-ok 60 perces *in vitro* pepszines emésztését követő Natív-PAGE mintázat

Kontroll minták: 1. natív TG bab  $\alpha$ AI; 6. búza  $\alpha$ AI; 7. natív GM borsó  $\alpha$ AI.

Emésztett minták: 2. HSZ bab  $\alpha$ AI; 3. BO bab  $\alpha$ AI; 4. VV bab  $\alpha$ AI; 5. TA bab  $\alpha$ AI; 8. GM borsó  $\alpha$ AI

Az 1980-as években bab  $\alpha$ AI-t tartalmazó étrend kiegészítő készítményt forgalmaztak Amerikában, amely a szénhidrát anyagcsere szabályozására az  $\alpha$ -amiláz enzimet blokkolta. Klinikai vizsgálatok során azonban a készítmény hatását nem sikerült igazolni. Később, a Mayo Clinic kutatócsoport bab fehérje nyers kivonatát tartalmazó készítményt fejlesztett ki elhízottak és a 2. típusú diabéteszben szenvedő betegek étrendjének kiegészítésére, amely már hatásosnak bizonyult

(BARRETT és UDANI, 2011). Ezért megvizsgáltam a bab extraktumok szimulált gyomorfoliadékban való viselkedését is (35. ábra). Az izolált  $\alpha$ AI-okkal szemben az extraktumok részlegesen megtartották inhibitor aktivitásukat az emésztés alatt (35. B ábra). Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy az  $\alpha$ AI inhibitor aktivitás alapon történő izolálása során a 30 kDa  $\alpha$ AI-előfehérje koncentrációja lényegesen lecsökkent szemben az extraktumokéval. A pepszines emésztés során az aktív láncok bár elveszítették inhibitor aktivitásukat, ennek ellenére az előfehérje valószínűleg aktiválódott.



**35. ábra:** Bab és borsó lisztek fehérjéinek amiláz inhibitor aktivitásfestése Natív-PAGE-n történő elválasztást követően *in vitro* pepszines emésztés előtt (A) és emésztés után (B)

1. TG bab; 2. KF borsó; 3. nGM borsó; 4. GM borsó; 5. HSZ bab; 6. VV bab; 7. TA bab; 8. BO bab; 9A. TG bab  $\alpha$ AI; 9B. búza  $\alpha$ AI

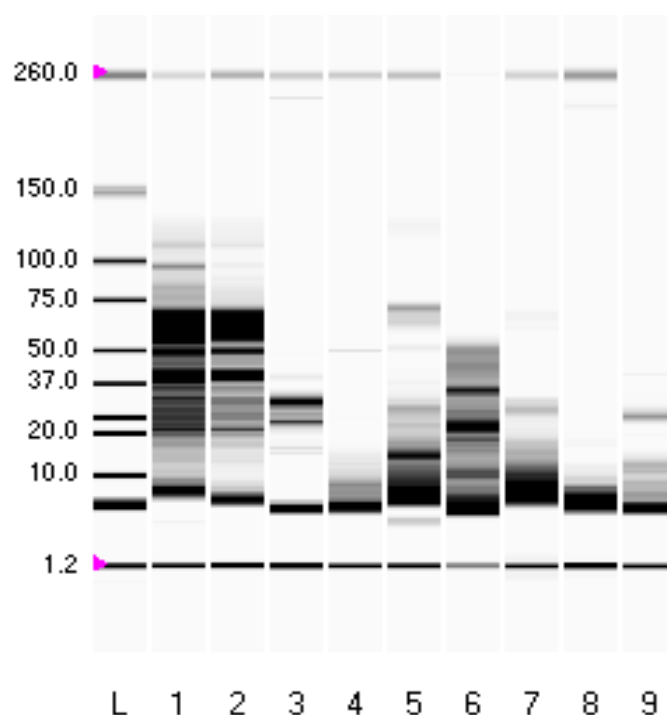
#### 4.3.2. Az $\alpha$ AI tápcsatornában történő túlélésének vizsgálata akut patkánymodellben

Mivel a bab nyersfehérje extraktumok *in vitro* pepszines emésztés alatt részlegesen megtartották  $\alpha$ AI aktivitásukat, így ezek az  $\alpha$ -amiláz emésztőenzim blokkolása révén ígéretes összetevői lehetnek bizonyos szénhidrát anyagcserét befolyásoló készítményeknek. Ennek bizonyítására indokolt volt a babfehérjék viselkedésének tanulmányozása akut patkánymodellben *in vivo* körülmények között. A kísérlet során az állatok Tarkabab extraktummal való etetése után eltávolított gyomor és vékonybél mintáiban elektroforézissel, immunblottal és aktivitásfestéssel monitoroztam az  $\alpha$ AI tápcsatornában való túlélését. Korábbi eredményeim alapján (4.1.3.) az  $\alpha$ AI 100 °C-on elveszíti inhibitor aktivitását, azonban a szimulált gyomorfoliadékban való pepszines emésztés során arra a következtetésre jutottam, hogy a bab extraktumban nagyobb arányban

előforduló pre-protein aktiválódni képes az emésztés során, ezért 100 °C-on hőkezelt bab extraktummal is elvégeztem az etetési kísérletet, melynek eredményéből arra szerettem volna választ kapni, hogy az előfehérje hőkezelt formában is képes-e aktiválódni.

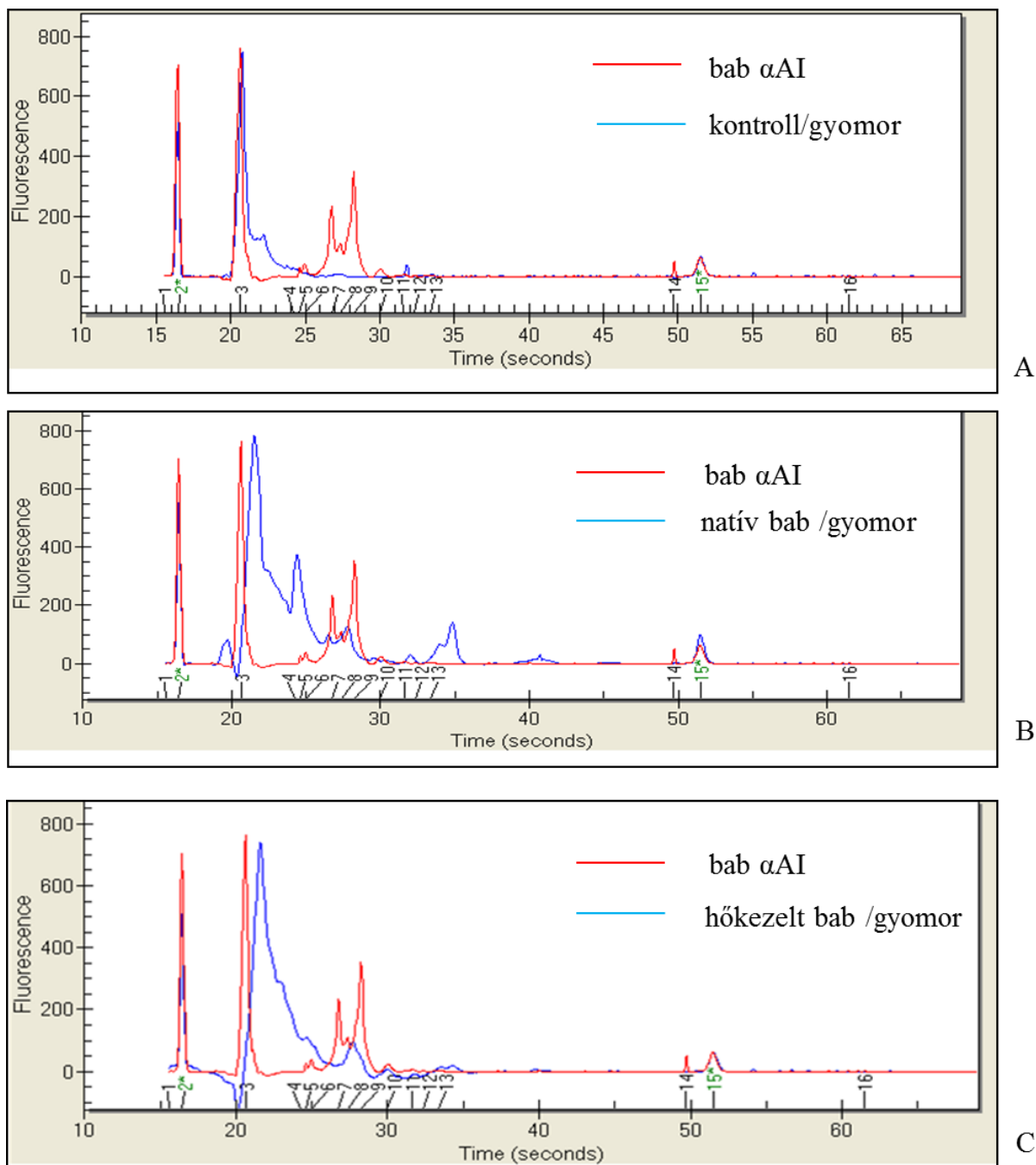
A gyomor mintákból extrahált fehérjét először LOC elektroforézissel szeparáltam. A 36. ábrán az elektroforetikus mintázat látható. Azonban ennél pontosabb információt kapunk a retenciók idői alapján történő azonosítással (37. ábra). A processzált  $\alpha$ AI azonosítását a gyomor és vékonybél mintákból a tisztított bab  $\alpha$ AI-ok retenciók ideje (24-28 másodperc) alapján (4.1.6. fejezet, 7. táblázat) végeztem. A pre- $\alpha$ AI a tiszta preparátumokban 30,01 és 30,12 másodperc közötti retenciók időnél detektálható (4.1.6. fejezet, 7. táblázat). A pepszin retenciók ideje 32.76 és 33.76 másodperc volt. A kontroll állat gyomrában nem volt detektálható fehérjesáv az  $\alpha$ AI retenciók idejének megfelelő tartományban, szemben a bab extraktumokkal etetett állatok gyomrával. A natív bab extraktumot evett patkány gyomrából extrahált fehérjékben négy különböző retenciók időpontnál, a 24,36; 26,54; 27,81; 29,54 másodpercnél azonosítottam az  $\alpha$ AI-nak megfelelő fehérjesávokat. A hőkezelt bab extraktumot evett állat gyomrából extrahált fehérjékben szintén detektáltam négy fehérjesávot az  $\alpha$ AI tartományában a 24,87; 25,91; 26,55; 27,93 másodperc retenciók időknél. A gyomor mintákban, az előfehérjére jellemző 30,01 és 30,12 másodperc közötti retenciók időnél nem detektáltam sávokat, ami azt jelenti, hogy az előfehérje aktív láncokra bomlik az emésztés hatására. Ennek további igazolására a fehérjék immunreaktivitását és inhibitor aktivitását vizsgáltam.

A vékonybélből extrahált fehérjét retenciók idő alapján nem tudtam azonosítani, mivel a vékonybélben található emésztőenzimek (tripszin, kimotripszin) retenciók ideje nagyon közeli az  $\alpha$ AI retenciók idejéhez. Ezért ezeket a mintákat csak immunreaktivitás és inhibitor aktivitás alapján vizsgáltam (38. ábra). Az  $\alpha$ AI megtartotta immunreaktivitását mind a natív és mind a hőkezelt babbal etetett állatok gyomrában, mivel az  $\alpha$ AI molekulatömeg tartományában (15 kDa) Tendergreen bab  $\alpha$ AI ellen nyúlban termelt ellenanyaggal szemben immunreaktív sávok voltak detektálhatóak. Több immunreaktív fehérjesávot is detektáltam a magasabb molekulatömeg tartományban, ami azonban felveti a keresztreakció lehetőségét is, ugyanis a bab lektin (PHA) és a pre- $\alpha$ AI hasonló molekulatömeg tartományban detektálható. Natív-PAGE elválasztást követően mind a natív és mind a hőkezelt babfehérjét evett állat gyomrában erős  $\alpha$ AI aktivitást detektáltam. Ez az aktivitás azonban már nem volt tapasztalható ugyanezen állatokból származó vékonybél mintákban, melyből arra következtettem, hogy a gyomorban aktiválódott pre- $\alpha$ AI a vékonybélbe kerüléskor a pankréász  $\alpha$ -amiláz enzimével találkozva komplexbe lépett a pankréász eredetű amilázzal (39. ábra).



**36. ábra:** Akut patkánymodellből származó gyomor és vékonybél minták fehérjéinek LOC elektroforézis mintázata

L: molekulatömeg markerek; 1. natív TA bab fehérje; 2. hőkezelt TA bab fehérje; 3. TA babból izolált  $\alpha$ AI; 4. kontroll állat/gyomor; 5. natív TA bab fehérjét evett állat/gyomor; 6. natív TA bab fehérjét evett állat/vékonybél; 7. hőkezelt TA bab fehérjét evett állat/gyomor; 8. hőkezelt TA bab fehérjét evett állat/vékonybél; 9. kontroll állat/ bél

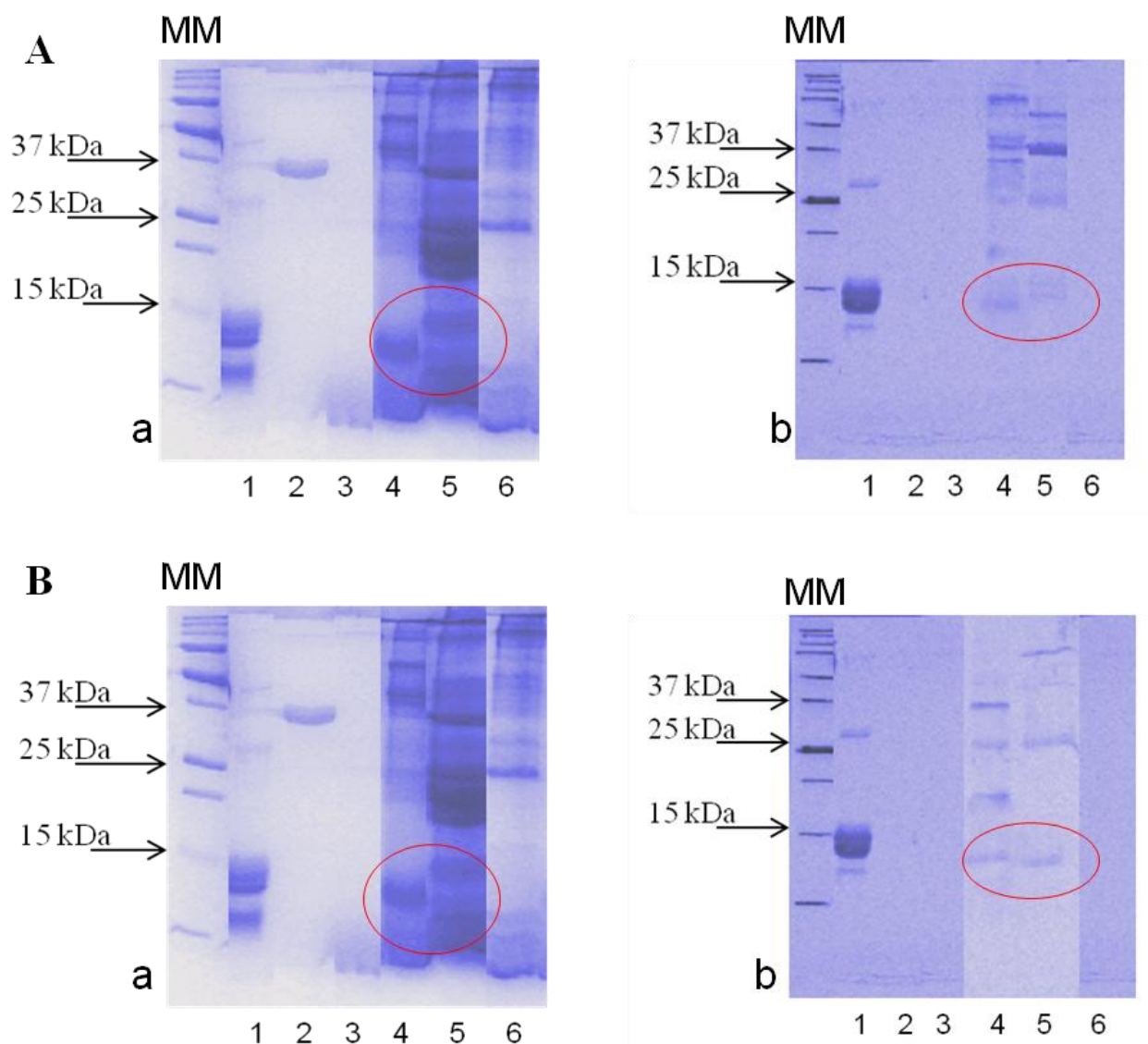


**37. ábra:** LOC elektroforetogramok

**A:** A tisztított bab  $\alpha$ AI (piros) és a kontroll állat gyomrából extrahált fehérjék (kék) elektroforetogramja. Az  $\alpha$ AI retenciós ideje: 24,96; 26,76; 27,36; 28,29; 30,04 másodperc. A pepszin retenciós ideje: 32,76; 33,76 másodperc.

**B:** A tisztított bab  $\alpha$ AI (piros) és a natív bab fehérjét evett állat gyomrából extrahált fehérjék (kék) elektroforetogramja. Az  $\alpha$ AI retenciós ideje: 24,96; 26,76; 27,36; 28,29; 30,04 másodperc. A gyomor mintában lévő fehérjék retenciós ideje: 24,36; 26,54; 27,81; 29,54 másodperc.

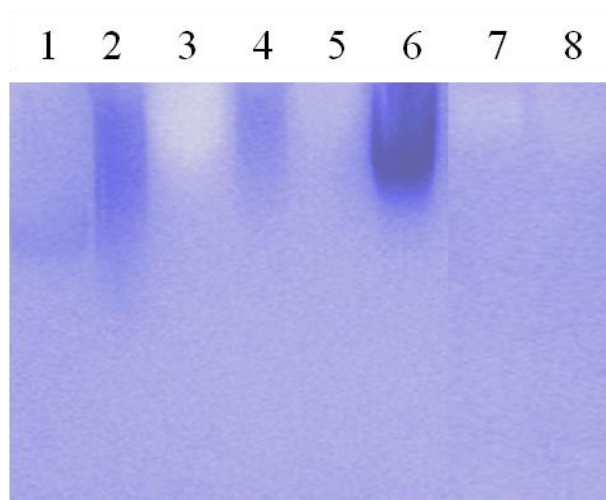
**C:** A tisztított bab  $\alpha$ AI (piros) és a hőkezelt babot evett állat gyomrából extrahált fehérjék (kék) elektroforetogramja. Az  $\alpha$ AI retenciós ideje: 24,96; 26,76; 27,36; 28,29; 30,04 másodperc. A gyomor mintában lévő fehérjék retenciós ideje: 24,87; 25,91; 26,55; 27,93 másodperc.



**38. ábra:** Natív babot (A) és hőkezelt babot evett patkány (B) gyomor és vékonybél mintáiból extrahált fehérjék elektroforetikus (a) és immunblott (b) mintázata a 60 perces emésztést követően  
MM: *All Blue* molekulatömeg marker

1. TG bab  $\alpha$ AI; 2. pepszin; 3. kontroll gyomor; 4. gyomor; 5. vékonybél; 6. kontroll vékonybél





**39. ábra:** Natív és hőkezelt babot evett patkány gyomor és vékonybél mintáiból extrahált fehérjék festése alfa-amiláz inhibitor aktivitásra Natív-PAGE-n

1. TG bab  $\alpha$ AI; 2. natív bab/gyomor; 3. natív bab/vékonybél; 4. hőkezelt bab/gyomor; 5. hőkezelt bab/vékonybél; 6. búza  $\alpha$ AI; 7 kontroll gyomor; 8. kontroll vékonybél



## 5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Cink-hidroxid szervesetlen adszorbens alkalmazásával az izolálási időt jelentősen lerövidítő új kromatográfiás módszert dolgoztam ki bab  $\alpha$ AI izolálására. A módszerrel négy hazai babfajtából (*Phaseolus vulgaris* vs. Huanita szárazbab, Bokorbab, Vörös vesebab, Tarkabab) készített izolátum  $\alpha$ AI aktivitását mutattam ki.
2. Bab és GM borsó eredetű  $\alpha$ AI-okban proteomikai úton nem processzáldott, Schiff-festéssel nem festődő, a Tendergreen bab eredetű  $\alpha$ AI-specifikus ellenanyagokkal keresztreaktivitást mutató előfehérjéket azonosítottam, a nem processzáldott alfa- és béta láncok variabilitását igazoltam.
3. Babból és GM borsóból izolált  $\alpha$ AI-okban processzáldott glikozilált izofehérjéket azonosítottam a 13-18 kDa molekulatömeg tartományban 4,7-5,1, valamint 5,7-6,0 izoelektromos pontnál. Az alfa- és béta láncok variabilitását mutattam ki a processzáldott fehérjékben is.
4.  $\alpha$ AI specificitását bizonyítottam klinikailag igazolt hüvelyes allergiában szenvedő betegek szérumában az allergiakutatásokban még újnak számító HuSCID egérmodellel.
5. Immunreaktivitást és részleges inhibitor aktivitást mutattam ki bab és GM borsó  $\alpha$ AI-okban szimulált gyomorfoliadékban *in vitro* pepszines emésztés után, amelyet az extraktumban lévő előfehérje bomlásakor keletkező aktív láncok okozhatnak.
6. Bizonyítottam, hogy a 100 °C-on hőkezelt Tarkabab fehérje extraktum akut patkánymodellben történő *in vivo* emésztése után az  $\alpha$ AI a gyomorból származó mintákban immunogén és inhibitor aktív formában is kimutatható, míg a vékonybélben már nincs aktivitás.

## KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Első célkitűzésemnek megfelelően, új tudományos eredményeim alapismeretekkel járultak hozzá a Magyarországon termesztett *Phaseolus vulgaris* babfajtákban található  $\alpha$ AI-ok biokémiai tulajdonságainak megismeréséhez. Az  $\alpha$ AI  $\alpha$ - és  $\beta$ -láncainak detektálása során variabilitást találtam a különböző babokból izolált  $\alpha$ AI-okban. Mivel a detektálás a Tendergreen bab  $\alpha$ AI aminosav szekvenciájára leírt marker peptidek alapján történt, ezért a munka folytatásaként szükségesnek tartom a magyarországi babokból izolált  $\alpha$ AI-ok pontos aminosav szekvenciájának meghatározását.

Második célkitűzésem szerint, az  $\alpha$ AI fehérje vizsgálata során arra szerettem volna választ kapni, hogy jelent-e az  $\alpha$ AI élelmiszerbiztonsági szempontból kockázatot a hüvelyes allergiás egyének számára. Mivel a rendelkezésemre álló, klinikailag igazoltan hüvelyes allergiás anonim humán szérumok közül sikerült olyanokat szelektálnom, amelyek  $\alpha$ AI specificitással rendelkeztek, elmondható, hogy az  $\alpha$ AI potenciális allergénforrás lehet az arra érzékeny betegek számára. Mivel az allergia kóros, fajspecifikus immunválasz eredménye, ezért nincs validált állatmodell ennek vizsgálatára. Ugyanakkor a humán vizsgálatoknál számos etikai korlát merül fel. Ezért az *EU FP7 GMSAFOOD* keretprogram által biztosított együttműködés keretében lehetőségem nyílt az allergiakutatásban még újnak számító súlyos kombinált immunhiányos humanizált egérmodellben (HuSCID) a bab és GM borsó eredetű  $\alpha$ AI ellenanyagválaszt tanulmányozni. A HuSCID egér modellben lehetőség nyílt a bab és GM borsó eredetű  $\alpha$ AI immunválaszának megismerésére a tápcsatornán keresztül történő érzékenyítést követően. Saját tapasztalataink és LEE és mts. (2013b) eredményei szerint, a modell csak bizonyos korlátokkal alkalmazható. A HuSCID modell ugyanis nem tudott érdemi különbséget tenni abban, hogy az első érzékenyítés már korábban (allergiás betegek) vagy csak az érzékenyítési protokoll során történt meg. További megfigyelés volt, hogy a nGM borsó szintén mutatott IgE-keresztreaktivitást, amit LEE és mts. (2013 a) a borsó lektin és a Tendergreen bab  $\alpha$ AI között meglévő immunológiai kereszt-reaktivitásnak tulajdonítottak. Ugyanakkor pozitív tapasztalat volt, hogy a kísérletekből származó ellenanyagok IgE felismerőhelyei jó egyezést mutattak a szelektált humán szérumok IgE felismerőhelyeivel.

Harmadik célkitűzésem volt annak megismerése, hogy az  $\alpha$ AI immunreaktív és enzimaktív formában éli-e túl a tápcsatorna degradáló hatását, mivel csak ebben az esetben jelenthet potenciális allergén kockázatot a hüvelyes allergiás betegek számára, vagy léphet interakcióba az  $\alpha$ -amiláz enzimmel, gátolva ezzel a szénhidrátok lebontását. Eredményeimből arra következtettem, hogy a kevésbé tisztított  $\alpha$ AI tartalmú preparátumok azért tudtak nagyobb inhibitor aktivitást mutatni

klinikai körülmények között, mivel nagyobb mennyiségben tartalmazták a 30 kDa molekulatömeg tartományban lévő pre- $\alpha$ AI-t, míg az enzimaktivitás alapján tisztított  $\alpha$ AI fehérjékben ez az inhibitor aktivitás szempontjából inaktív frakció lecsökkent. Az előfehérje ugyanis a szimulált gyomorfoliadékban vagy a patkánymodellben történő gyomoremesztés során inhibitor aktív alegységekké degradálódott. Érdekes tapasztalat volt, hogy míg a natív bab fehérje extraktumokban az inhibitor aktivitás már 80°C-on jelentősen csökkent és 100°C-on teljesen megszűnt, a 100°C-on hőkezelt Tarkabab fehérje extraktum *in vivo* gyomoremesztése során mégis inhibitor aktivitást tapasztaltam. További vizsgálatok lennének szükségesek annak megismerése, hogy az előfehérje milyen konformációs változásokat szenvedett a hőkezelés során és a hőkezelés hogyan hat más fehérjékre, mint pl. a lektinek vagy allergének szerkezetére. Ez utóbbi azért is érdekes, mivel  $\alpha$ AI-specifikus ellenanyagokkal végzett vizsgálataim szerint az  $\alpha$ AI fehérjék immunreaktív formában éltek túl az emésztést. További vizsgálatok lennének azonban szükségesek annak megismerésére, hogy maradtak-e aktív IgE-reaktív epitópok is. Mivel a vékonybélben való emésztést követően az inhibitor aktivitása már nem detektálható, valószínűleg komplexet képzett a pankréasz  $\alpha$ -amiláz enzimmel, amely során gátolni képes az enzim működését. Így, hatásos összetevője lehet az elhízottak és 2. típusú cukorbetegség diétájának, melynek igazolására természetesen klinikai vizsgálatok szükségesek. Ugyanakkor, mai tudásom szerint, a fehérje étrendkiegészítőben való alkalmazása egészségügyi kockázatot is jelenthet az  $\alpha$ AI-ra érzékeny allergiás betegek számára. Továbbá az étrendkiegészítőben alkalmazott bab extraktum alacsonyabb vagy magasabb lektin aktivitással rendelkezhet eredetétől függően, amely szintén egészségügyi kockázatot jelenthet, ezért szükségesnek tartok erre irányuló további vizsgálatokat.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Napjainkban egyre több kutatás irányul a hüvelyes növényekre azok jelentős fehérjetartalma miatt. Ugyanakkor számos kutatás bizonyította, hogy a növényi fehérjéket kísérő antinutritív komponensek a kémiai elvárhatónál rosszabb tápanyaghasznosítást eredményeznek. Az utóbbi évtizedben bekövetkezett szemléletváltás azonban jelentős fejlődést eredményezett e komponensek egészséggel és életminőséggel kapcsolatos előnyös alkalmazásának irányába. Kiemelt szerepet kapott a tápcsatornával való kölcsönhatásuk vizsgálata, melynek alapján megítélésüknél a bioaktív kifejezést részesítették előnyben.

A WHO becslései szerint 2020-ra a globális megbetegedések kétharmada az elhízás és azzal kapcsolatos betegségeknek, mint például a 2. típusú diabétesznek lesz tulajdonítható. Ugyanakkor az elhízás elleni készítményeknek, számos nem kívánatos mellékhatását bizonyították, melyek vetekednek a tényleges hatással. Ezért lett fontos a nem gyógyszeralapú alternatívák kutatása az elhízás megelőzésére és kezelésére. A babokban (*Phaseolus vulgaris*) található  $\alpha$ AI-ok szénhidrát metabolizmust befolyásoló funkciójuk miatt (ún. „starch blocker”) kínáltak egy alternatív lehetőséget az életminőség javításában. A tisztított  $\alpha$ AI klinikai körülmények között kevésbé volt hatásos a részlegesen tisztított bab fehérje extraktumokkal szemben. Ennek megértése újabb kutatásokat igényelt.

Az új biotechnológiai kutatásokban ugyanezt a szénhidrát metabolizmust befolyásoló funkciót eredményesen hasznosították a növényi kártevők elleni védekezésben. A Tendergreen bab (*Phaseolus vulgaris* L. vs Tendergreen) eredetű  $\alpha$ AI gén borsóba (*Pisum sativum*) való transzformálása hatásosnak bizonyult a borsó kártevő (*Bruchus pisorum*) elleni védekezésben. További kutatások azonban rávilágítottak arra, hogy az  $\alpha$ AI transzformációja a fehérje immunológiai jellegének megváltozását eredményezte. Ez felvetette az allergén kockázat veszélyét is, mely fontos élelmiszerbiztonsági kérdés. Ezért további kutatások irányultak a bab eredetű  $\alpha$ AI-ok szerkezet funkció kapcsolatának vizsgálatára. Így derült fény arra a megfigyelésre, hogy az  $\alpha$ AI-ok nemcsak a GM borsóban, hanem egyes babfajtákban is hasonló immunogén jelleggel bírnak. Mivel az allergének fajspecifikusan képesek kóros immunválasz kiváltására és a humán vizsgálatok számos etikai problémát vetnek fel, jelenleg sincs validált állatmodell ennek vizsgálatára. Ezért, továbbra is nyitva maradt az a kérdés, hogy  $\alpha$ AI fehérje jelent-e allergén kockázatot a humán szervezetben.

A tápcsatornában a fehérjék többsége lebomlik és így járul hozzá a szervezet létfenntartáshoz és az egészség megőrzéséhez szükséges energia- és esszenciális aminosav ellátásához. *In vitro* emésztési vizsgálatokban a bab  $\alpha$ AI azonban rezisztenciát mutat a tápcsatorna

enzimekkel szemben. Tápcsatornában való viselkedésük és rezisztencia esetén kifejtett enzimgátló vagy immunmoduláló hatásuk megismerésében ma még sok feltáratlan terület maradt.

Ezért célul tűztem ki, hogy újabb ismereteket szerzek a Magyarországon termesztett babfajtákból izolált (*Phaseolus vulgaris* L.)  $\alpha$ AI-ok szerkezetére és funkciójára vonatkozóan egy már jól jellemzett babfajtából (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Tendergreen) izolált  $\alpha$ AI-ral, illetve ennek borsóban (*Pisum sativum* L.) expresszált, tisztított formájával összehasonlításban. Céлом volt továbbá egy súlyos kombinált immunhiányos humanizált egérmodellben (HuSCID) donor Tendergreen bab, és a transzformált GM borsó eredetű  $\alpha$ AI-1 immunogenitásának és IgE-reaktív epitóp mintázatának vizsgálata, klinikailag igazolt hüvelyes allergiában szenvedő betegek,  $\alpha$ AI specificitással rendelkező szérumával összehasonlításban. Az általam izolált bab eredetű  $\alpha$ AI-ok szimulált gyomorfoliadékban és a Tarkabab fehérje extraktum tápcsatornában való viselkedését az immunreaktív és az enzimaktív szerkezet megőrzésére szempontjából kívántam megismerni.

Munkám során új kromatográfiás módszert dolgoztam ki az  $\alpha$ AI tisztítására cink-hidroxid adszorbens alkalmazásával, amely jelenösen lerövidíti az izolálás idejét korábbi módszerekhez képest. Négyféle, Magyarországon termesztett *Phaseolus vulgaris* babfajtából (Huanita szárazbab, Bokorbab, Vörös vesebab, Tarkabab) és a GM borsóból sikeresen izoláltam  $\alpha$ AI-t, melyeket molekulatömeg és izoelektromos pont szerint jellemeztem, valamint az  $\alpha$ AI két alegységének ( $\alpha$ - és  $\beta$ -láncok) variabilitását detektáltam az egyes babfajták  $\alpha$ AI-ai között a Tendergreen babra jellemző marker peptidek alapján. Tendergreen bab  $\alpha$ AI ellen nyúlban termelt poliklonális ellenanyag segítségével immunológiai homológiát mutattam ki a magyarországi babokból, a Tendergreen babból és a GM borsóból izolált  $\alpha$ AI-ok között. A tisztított fehérjék  $\alpha$ -amiláz inhibitor aktivitást muttak és nem rendelkeztek lektin aktivitással. Allergenitás vizsgálata során klinikailag *Prick in Prick* teszttel igazolt hüvelyes allergiás humán szérumok közül szelektáltam  $\alpha$ AI-ra specifikusakat. Az így azonosított beteg és egészséges donorok immunkompetens (PBMC) sejtjeit hordozó, tápcsatornán keresztül  $\alpha$ AI-val érzékenyített HuSCID egerekből származó szérumok által felismert IgE-reaktív polipeptidek mintázata a Tendergreen bab, a GM és nem GM borsó specifikus IgE típusú ellenanyag termelését indította. A specifikus IgE ellenanyagok az érzékenyítő antigénekben hasonló felismerést mutattak, mint az  $\alpha$ AI specificitással rendelkező klinikailag igazolt hüvelyes allergiás betegek szérumai. Szimulált gyomorfoliadékban való *in vitro* pepszines emésztést alkalmazva, az izolált  $\alpha$ AI fehérjék immunológiailag aktív formában élték túl az emésztést, azonban inhibitor aktivitásukat elvesztették. Az  $\alpha$ AI-t és annak elő-fehérjéjét tartalmazó bab fehérje extraktumok *in vitro* pepszines emésztését követően az inhibitor aktivitás viszont részlegesen detektálható volt. A 100 °C-on hőkezelt Tarkabab fehérje extraktum akut patkánymodellben való *in vivo* emésztése után az  $\alpha$ AI a gyomor mintákban immunogén formában és inhibitor aktív formában is detektálható volt. Az aktivitás a vékonybélben azonban már nem volt detektálható, mivel

valószínűleg az inhibitor és a pankreász eredetű  $\alpha$ -amiláz enzim komplexet formált. Így, valószínűleg gátolni képes az enzim működését, ezért hatásos összetevője lehet az elhízottak és 2. típusú cukorbetegség diétájának.

Új tudományos eredményeim hozzájárultak a Magyarországon termesztett babokban előforduló  $\alpha$ AI-ok biokémiai tulajdonságainak pontosabb megismeréséhez. A szerkezet és funkció megismerésében, az inhibitorok aktivitásáról, potenciális allergén hatásáról és tápcsatornában való túléléséről új eredményeket nyertem, melyek egyaránt hozzájárultak a táplálkozástudományi ismeretek és élelmiszerbiztonsági ismeretek bővítéséhez.

## SUMMARY

Food legumes play important and diverse role in the human nutrition and animal feeding around the world. Recent studies have demonstrated that antinutritional compounds of legumes, like lectins and protease inhibitors may have beneficial properties also. These compositional aspects have received considerable attention by the nutrition community and have been associated with beneficial health-promoting properties, such as managing high cholesterol and type-2 diabetes and in the prevention of various forms of cancer.

According to the World Health Organization (WHO) by 2020, two thirds of the global disease will be attributable to obesity and obesity associated complications. Existing anti-obesity drugs have displayed undesirable side effects which counterweigh their beneficial effects. Therefore it is reasonable to search for non-pharmacological alternatives for the prevention of obesity. The common bean, *Phaseolus vulgaris*, contains a glycoprotein, namely  $\alpha$ AI-1 that inhibits the activity of mammalian and insect  $\alpha$ -amylases, but not of plant  $\alpha$ -amylases. The  $\alpha$ AI-1 is derived from a pre-protein, of which the native or unprocessed molecular weight has been estimated to be around 28 kDa. It is synthesized on the endo-plasmic reticulum and after the cleavage of the signal peptide, glycans are added in the Golgi apparatus which leads to an increase in the molecular weight of the pre-protein to 32-36 kDa. Finally the pre-protein is transported to protein storage vacuoles, where proteolytic cleavage results two subunits ( $\alpha$ - and  $\beta$ -chains) of the inhibitor. More recently, common bean derived alpha-amylase inhibitor ( $\alpha$ AI) has been tested in clinical studies for its application in weight loss and glycemic control as they delay carbohydrate absorption. However, clinical studies have shown that crude preparation of bean  $\alpha$ AI had no inhibitor-activity effect, while a partially purified bean product was found to indicate body weight loss and reduce spikes in blood sugar due to its  $\alpha$ AI-1 activity. Up to now there is not enough experimental data to understand why a less purified preparation of  $\alpha$ AI-1 can be more effective physiologically. To understand the mechanism of this action requires further researches.

As the  $\alpha$ AI-1s play an important role in the starch digestion of animals, plants and microorganisms, the modern biotechnology has utilized this property in the plant protection against insects. The introduction of the bean (*Phaseolus vulgaris*)  $\alpha$ AI-1 gene in pea (*Pisum sativum*) leads to expression of seed-specific  $\alpha$ AI-1 protein accumulated at high level and undergoes post-translational modification as it traverses the seed endomembrane system. This proved to be a good strategy for protection of the plant from damage by pea weevil (*Bruchus pisorum*) under greenhouse and field growth conditions as well. However, a study demonstrated that the  $\alpha$ AI-1 expressing pea led to the synthesis of a modified form of the protein with altered immunogenicity. This

modification was thought to be responsible for the reported allergenicity in mice of the transgenic pea but not the bean. The authors presumed that the differences are due to the post-translational modifications. Further investigations revealed some heterogeneous structural variations in genetically modified pea and bean due to differences in glycans, but no evidence was found for the increased immunogenicity of the  $\alpha$ AI-1 in pea. The  $\alpha$ AI-1s from the two sources can induce similar immune responses, both  $\alpha$ AI-1 forms elicited Th1 and Th2 antibody responses, suggesting that both forms can be immunogenic. Therefore the allergenic effect of the  $\alpha$ AI-1 is still controversial.

Most of the proteins are hydrolyzed in the gastrointestinal tract, but some bioactive proteins can show resistance against the digestive enzymes. There are informations about the enzyme inhibitory effect of the bean derived  $\alpha$ AI-1 proteins, but the digestibility of this protein is still an open question.

Therefore my aims were (i) to characterize  $\alpha$ AI-1s obtained from Hungarian *Phaseolus vulgaris* bean varieties in comparison with  $\alpha$ AI-1 obtained from *Phaseolus vulgaris* L. cv. Tendergreen and a genetically modified pea (*Pisum sativum* L.) expressing  $\alpha$ AI-1 regarding their structures and functions; (ii) to investigate the IgE-reactivity of the Tendergreen bean and the GM pea  $\alpha$ AI-1s using sera obtained from severe combined immunodeficient mouse model in comparison with clinically proved legume allergic human sera; (iii) to describe the difference in the digestive fate of common bean alpha-amylase inhibitor released from the purified  $\alpha$ AI-1 and the crude protein extracts using simulated gastric fluid and acute rat digestion model.

In my PhD study a new zinc-hydroxide based chromatographic method was developed for  $\alpha$ AI-1 isolation.  $\alpha$ AI-1s were isolated from four Hungarian bean varieties and a GM pea. The purified proteins were identified by their molecular weight and isoelectric point using 2-DE separation. The processed forms of  $\alpha$ AI-1s were characterized as isoproteins at two isoelectric point values. The purified  $\alpha$ AI-1s showed inhibitory activities, but did not have lectin activities. Antibodies against Tendergreen bean  $\alpha$ AI-1 developed in rabbit recognised all the investigated  $\alpha$ AI-1s in immunoblotting. Mass-spectrometry was used to assess the presence of tryptic digested peptides including two peptide markers (AFYSAPIQIR for the  $\alpha$ -chain, and SAVGLDFVLVPVQPESK for the  $\beta$ -chain) in the  $\alpha$ AI-1s after 2-DE separation. Differences were observed in the presence of  $\alpha$ - and  $\beta$ -chain peptides in the different  $\alpha$ AI-1s.

Legume allergic anonym human sera with  $\alpha$ AI-1 specificity were selected by immunoblot. The PBMC (periferial blood mononuclear cell) cells of the selected sera were introduced to severe combined immunodeficient mice, which were then sensitized with the  $\alpha$ AI-1. Similar IgE-recognition patterns in immunoblot were observed in sera obtained from the human patients in comparison with sera obtained from the mouse model.



Using simulated gastric fluid for *in vitro* digestion, the purified  $\alpha$ AI-1s showed immunologically active, but not inhibitory active form after a 60 min pepsin digestion. In contrary, the raw bean protein extracts was still active after the *in vitro* digestion process. To understand the digestion process under physiological circumstances an acute rat digestion model was applied. Similar observations took place in stomach digesta samples of rat. As the bean extracts contained the pre-protein in higher concentration than the purified  $\alpha$ AI-1 did, the  $\alpha$ AI-1 may became active during digestion in the stomach. The protein survived the passage through the stomach in inhibitory active form and it was able to form an enzyme-inhibitor complex in the small intestine after when its inhibitory activity was not detectable anymore. A highly heat treated Pinto bean extract was prepared as well to reduce the potential harmful effects of other soluble antinutritive proteins present in such preparation. The results concerning the digestive fate of  $\alpha$ AI-1 released from the heat treated bean protein extract obtained from the rat digestion model were similar. In this way the common bean protein extract even the heat treated one containing  $\alpha$ AI-1 precursor can be active against the alpha-amylase digestive enzyme in the gastrointestinal tract. Further studies are necessary to conclude on the safe use of such preparation.

My new scientific results have contributed to the understanding of biochemical properties of  $\alpha$ AI-1s found in Hungarian common bean varieties. I have obtained new results about the structural pattern, potential allergenicity of the bean derived  $\alpha$ AI-1s and its activity in the gastrointestinal tract, assisting to the nutrition and food safety knowledge.

## IRODALOMJEGYZÉK

AMSTRONG W.B., KENNEDY A.R., WAN X.S., ATIBA J., McLAREN E., MEYSKENS F.L. (2000): Single-dose administration of Bowman- Birk inhibitor concentrate in patients with oral leukoplakia. *Cancer Epidemiol Biom Prev* 9 43–47. p.

ANDERSON N.L., ANDERSON N.G. (1998): Proteome and proteomics“New technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, 19 1853-1861. p. DOI: 10.1002/elps.1150191103

ANDREWS P. (1965): The gel-filtration behavior of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem J*, 96: 595-606. p.

ASTWOOD J.D., LEACH J.N., FUCHS R.L. (1996): Stability of food allergens to digestion *in vitro*. *Nature Biotechnology*, 14 1269-1273. p. DOI: 10.1038/nbt1096-1269

BABOOTA R.K., BISHNOI M., AMBALAM P., KONDEPUDI K.K., SARMA S.M., BOPARAI R.K., PODILI K. (2013): Functional food ingredients for the management of obesity and associated co-morbidities – A review. *Journal of Functional Food*, 5 997-1012.p. DOI:10.1016/j.jff.2013.04.014

BARRETT M.L., UDANI J.K. (2011): A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): A review of clinical studies on weight loss and glycemic control. *Nutrition Journal*, 10 24. p. DOI:10.1186/1475-2891-10-24

BELLINCAMPI D., CAMARDELLA L., DELCOUR J.A., DESSEAUX V., D'OVIDIO R., DURAND A., ELLIOT G., GEBRUERS K., GIOVANE A., JUGE N., SORENSEN J.F., SVENSSON B., VAIRO D. (2004): Potential physiological role of plant glycosidase inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta* 1696 265– 274. p. DOI:10.1016/j.bbapap.2003.10.011

BOMAN H.G. and WESTLUND L.E.(1956): Protein Chromatography on an Anion-Exchange Resin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 64, 217-239. p.

- BOUSSE L., MOURADIAN S., MINALLA A., YEE H., WILLIAMS K., DUBROW R. (2001): Protein sizing on a microchip. *Anal. Chem.* 73 1207-1212. p. DOI: 10.1021/ac0012492
- BOWMAN D.E. (1945): Amylase inhibitor of navy beans. *Science*, 102 358-359. p.
- BREHM M.A., WILES M.V., GREINER D.L., SHULTZ L.D. (2014): Generation of improved humanized mouse models for human infectious diseases. *Journal of Immunological Methods*, 410, 3-17. p. DOI: 10.1016/j.jim.2014.02.011
- BREITENEDER H., RADAUER C. (2004): A classification of plant food allergens. *J. Allergy Clin Immunol*, 821-831. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2004.01.779>
- BREITENEDER H., CLARE MILLS E.N. (2005): Plant food allergens — structural and functional aspects of allergenicity. *Biotechnology Advances*, 23 395 – 399. p. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2005.05.004
- BRUINSMA J. (2009): The resource outlook to 2050: By how much do land, water and crop yields need to increase by 2050? Rome, Italy: FAO. Expert Meeting on How to feed the World in 2050 (12-13 October 2009). <http://www.fao.org/wsfs/forum2050/wsfs-background-documents/wsfsexpert-papers/en>
- BUONOCORE V., PETRUCCI T., SILANO V. (1977): Wheat protein inhibitors of  $\alpha$ -amylase. *Phytochemistry*, 16 (7), 811-820. p. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)86672-8
- BURKS A.W., WILLIAMS L.W., HELM R.M., CONNAUGHTON C., COCKRELL G., O'BRIEN T. (1991): Identification of a major peanut allergen, *Ara h* I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 88 (2), 172-179. p. DOI: 10.1016/0091-6749(91)90325-I.
- BURKS A.W., WILLIAMS L.W., CONNAUGHTON C., COCKRELL G., O'BRIEN T., HELM R.M (1992): Identification and characterization of a second major peanut allergen, *Ara h* II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 90 (6) 962-969. p. DOI: 10.1016/0091-6749(92)90469-I

BURKS A.W., COCKRELL G., CONNAUGHTON C., GUIN J., ALLEN W., HELM R.M. (1994): Identification of peanut agglutinin and soybean trypsin inhibitor as minor legume allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* 105 143-149. p. DOI:10.1159/000236816

CAMPBELL P.M., REINER D., MOORE A. E., LEE R., EPSTEIN M.M., HIGGINS T.J.V. (2011): Comparison of the alpha-amylase inhibitor-1 from common bean, *Phaseolus vulgaris*, Varieties and transgenic expression in other legumes-post translational modifications and immunogenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 6047-6054. p. DOI: 10.1021/jf200456j

CARBONARO, M. (2006): 7S globulins from *Phaseolus vulgaris* L.: Impact of structural aspects on the nutritional quality. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 70 2620–2626. p. DOI:10.1271/bbb.60203

CASEY R., DOMONEY C., ELLIS N. (1986): Legume storage proteins and their genes. *Oxfors Surveys of Plant Molecular an Cell Biology*, 3 1-95. p.

CHAMP M.M. (2002): Non-nutrient bioactive substances of pulses. *British Journal of Nutrition* 88, 3 S307–S319. p. DOI: 10.1079/BJN2002721

CHEN H., BODULOVIC G., HALL P.J., MOORE A, HIGGINS T.J.V., DJORDJEVIC M.A., ROLFE B.G. (2009): Unintended changes in protein expression revealedby proteomic analysis of seeds from transgenic pea expressing a bean a-amylase inhibitor gene. *Proteomics*, 9 4406–4415. p. DOI: 10.1002/pmic.200900111

CHRISPEELS M. J., RAIKHEL N. V. (1991). Lectins, Lectin Genes, and Their Role in Plant Defense. *The Plant Cell* Vol.3, 1–9.

COMAI S., BERTAZZO A., BAILONI L., ZANCATO M., COSTA C.V.L., ALLEGRI G. (2007): Protein and non-protein (free and protein-bound) tryptophan in legume seeds. *Food Chemisrty*, 103 657-661. DOI:10.1016/j.foodchem.2006.07.045

CUADRADO C., BURBANO C., GELENCŚÉR É., GRANT G., PUSZTAI Á. (1998): Large scale purification of lectin from lentil seeds and determination of the lectin content in processed lentils. *COST 98, Effects of antinutrients on the nutritional value of legume diets*, 4 82-88. p.

DAYLER C.S., MENDES P.A., PRATES M.V., BLOCH C. JR., FRANCO O.L., GROSSI-DE-SÁ M.F. (2005): Identification of a novel bean  $\alpha$ -amylase inhibitor with chitinolytic activity. *FEBS Letters*, 579 5616–5620. p. DOI: doi:10.1016/j.febslet.2005.09.030

DE LA FUENTE M., BORRAJO A., BERMÚDEZ J., LORES M., ALONSO J., LÓPEZ M., SANTALLA M., DE RON A.M., ZAPATA C., ALVAREZ G. (2011): 2-DE-based proteomic analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *Journal of Proteomics*, 74 262-267. p. DOI:10.1016/j.jprot.2010.10.004

DESHPANDE S. S., DAMODARAN S. (1989): Structure-digestibility relationship of legume 7S proteins. *Journal of Food Science*, 54 108–113. p. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1989.tb08579.x

DURANTI M., GIUS C. (1997): Legume seeds: protein content and nutritional value. *Field Crop Research*, 53 31-45. p. DOI:10.1016/S0378-4290 (97) 00021-x

DURANTI M., GUERRIEL N., TAKAJASHL T., CERLETTI P. (1998): The legumin-like storage proteins of *Lupinus albus* seeds. *Phytochemistry*, 27 15-23. p DOI:10.1016/ 0031-9422 (88) 80586-7

DURANTI M. (2006): Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, 77 67-82. p. doi:10.1016/j.fitote.2005.11.008

EFSA (2010c): EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). Scientific Opinion on the assessment of allergenicity of GM plants and microorganisms and derived food and feed. *EFSA Journal*, 8 (7):1700 168. p.

EFSA (2011): Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). *EFSA Journal*, 9 (5) 2150. p.

ETZLER M.E. (1985): Plant lectins: Molecular and biological aspects. *Annual Review of Plant Physiology*, 36 209–234. p. DOI: 10.1146/annurev.pp.36.060185.001233

FAO/WHO (2001): Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. FAO, Rome, Italy, 22-25 January 2001.

FARIS R.J., WANG H., WANG T. (2008): Improving digestibility of soy flour by reducing disulfide bonds with thioredoxin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 7146–7150. p. DOI: 10.1021/jf801136n

FENN J.B., MANN M., MENG C. K., WONG S.F., WHITEHOUSE C.M., (1989): Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules *Science* 246, 64-71. p. DOI: 10.1126/science.2675315

FERGUSON L.R., HARRIS P.J. (1999): Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. *European Journal of Cancer Prevention* 8, 17–25. p.

FILHO F.F., LAJOLO F.M. (1985): Partial characterization of the amylase inhibitor of black beans (*Phaseolus vulgaris*), variety Rico 23. *Journal of Food Chemistry*, 33 132-138. p. DOI: 10.1021/jf00061a038

FU T.J., ABBOTT U.R., HATZOS C. (2002): Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid-a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 7154-7160. p. DOI: 10.1021/jf020599h

GELENCSEÉ É. (2009): Novel Research Strategy for safe use of legume protein sin human nutrition. *Acta Alimentaria*, 38: 61-70. p. DOI: 10.1556/AAlim.38. Suppl.4

GOESAERT H., DEBYSER W., GEBRUERS K., PROOST P., VAN DAME J., DELCOUR J.A. (2001): Purification and partial characterization of an endoxylanase inhibitor from barley. *Cereal Chem*, 87 (4) 453-457. p. <http://dx.doi.org/10.1094/CCHEM.2001.78.4.453>

GONZALEZ M.E., PRISECARU V.I. (2005): Lectins as Bioactive Plant Proteins: A Potential in Cancer Treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 425–445. p. DOI: 10.1080/10408390591034445

GRAHAM P.H., VANCE C.P. (2003): Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 131 872-877. p. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.017004>

GUILLAMÓN N E, PEDROSA MM, BURBANO C, CUADRADO C, SANCHEZ M, MUZQUIZ M (2008a): The trypsin inhibitors present in seed of different grain legume species and cultivar. *Food Chemistry* 10768–74. p. DOI:10.1016/j.foodchem.2007.07.029

HAJÓS GY., IDEI M. (2001): Elektroforetikus és elektrokratográfiás módszerek fejlődése és alkalmazási lehetőségei I. *Magyar Kémikusok Lapja*, 56 364-368. p.

HAJÓS GY., SZABÓ E., FARKAS J. (2003): High pressure effects on structure and immunological crossreactivity of meat proteins. *Acta Alimentaria* 32, 47-54. p.

HAJÓS GY., SZABÓ E., JANÁKY T. (2004): Two-dimensional Electrophoresis, MALDI TOF MS and Blotting for Identification and Characterisation of PR-Proteins in Wheat Cultivar. *Chromatographia*, 60, S257-S259.

HARBOE N., INGLID A. (1973): A Manual of Quantitative Immunelectrophoresis, Methods and Applications eds. Axelsen, N.H., Kroll, J., Weeke, B., *Scan.J.Immunology*, 2 161-164. p.

HELM, R.M., BURKS, A.W. (2000): Mechanisms of food allergy. *Current Opinions in Immunology*, 12 647–653. p. DOI:10.1016/S0952-7915 (00)00157-6

HOLZHAUSER T., WACKERMANN O., BALLMER-WEBER BK., JENSEN CB., SCIBILIS J., PERONO-GALOFFO L., UTSUMI S., POULSEN LK., VIETHS S. (2009): Soybean (Glycine max) allergy in Europe: Gly m 5 ( $\beta$ -conglycinin) and Gly m 6 (glycinin) are potential diagnostic markers for severe allergic reactions to soy. *J. Allergy Clinical Immunol* 123 452-458. p. DOI: 10.1016/j.jaci.2008.09.034

HUR S.J., LIM B.O., Decker E.A., MCLEMENTS D.J. (2011): In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125 1-12. p. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.08.036

IRSHAD M., SHARMA C.B. (1981): Purification and properties of an alpha-amylase inhibitor from *Arachis Hypogaea* seeds. *Biochimica et Biophysica Acta*, 659 326—333. p. <http://agris.fao.org/aos/records/XE8181536>

IULEK J., FRANCO O.L., SILVA M., SLIVINSKI C.T., BLOCH C., RIGDEN D.J., GROSSI DE SA M.F. (2000): Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new  $\alpha$ -

amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 32, 1195–1204. p. DOI: 10.1016/S1357-2725(00)00053-4

JACKSON W.F. (2003): Food Allergy ILSI (International Life Science Institute) Europe Concise Monograph Series. Brussels: ILSI Press 46. p.

JAFFÉ W.G., MORENO R., WALLIS V. (1973): Amylase inhibitor in legume seeds. *Nutr.Rep.Int.* 7 169-174. p.

JERNE N.K. (1960): Immunological speculations. *Annual Review of Microbiology*, 14 341-358. p. DOI: 10.1146/annurev.mi.14.100160.002013

JEZIERNY D., MOSENTHIN R., BAUER E. (2010): The use of grain legumes as a protein source in pig nutrition: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 157 111-128. p. DOI:10.1016/j.anifeedsci.2010.03.001

JORGENSEN J.W., LUKACS K.D. (1981): High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis. *Journal of Chromatography*, 218, 209-216. p.

KARAS M., HILLENKAMP F. (1988): Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons *Anal. Chem.*, 60 2299-2301. p. DOI: 10.1021/ac00171a028

KENNEDY A.R., BILLINGS P.C., WAN S.X., NEWBERNE P.M. (2002): Effects of Bowman-Birk Inhibitor on rat colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, 43 (2) 174–186. p. DOI: 10.1207/S15327914NC432\_8

KENNEY A., FOWEL S. (1992): *Practical Protein Chromatography*, Totowa, NJ: Humana Press

KERKAERT B., MESTDAGH F., OBANDO M., CUCU T., DE MEULENAER B. (2013): Identification of Modified Lysozyme Peptides upon Photo-oxidation by LC-TOF-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 12727–12736. p. DOI: 10.1021/jf404396c

KOPPELMAN S.J., WLOOSWIJK R.A.A., WENSING M., KNULST A.C., HEFLE S.L., GRUPPEN H., PIERSMAL S. (2003): Peanut allergen Ara h 3: Isolation from peanuts and biochemical characterization. *Allergy* 58 1144–1151. p. DOI: 10.1034/j.1398-9995.2003.00259.x



- KUMAR S., VERMA A.K., MISRA A., TRIPATHI A., CHAUDHARI B.P., PRASAD R., JAIN S.K., DAS M., DWIVEDI P.D. (2011): Allergenic responses of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* cv chitra) polypeptides in BALB/c mice recognized by bronchial asthma and allergic rhinitis patients. *Food Research International*, 44 2868–2879. p. DOI:10.1016/j.foodres.2011.06.043
- LAEMMLI VK. (1970): Cleavage of structural proteins during the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 680–685. p.
- LAJOLO F.M., FILHO F.F. (1985): Partial characterization of the amylase inhibitor of black-beans (*Phaseolus vulgaris*), Variety Rico 23. *J.Agric.Food Chem.* 33, 132-138. p.
- LAJOLO F.M., GENOVESE M.I. (2002): Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 6592-6598. p. DOI: 10.1021/jf020191k
- LAVER W.G., AIR G.M., WEBSTER R.G., SMITH-GILL S.J.(1990): Epitopes on protein antigens: misconceptions and realities. *Cell*, 61 553-556. p. DOI:10.1016/0092-8674 (90) 90464-P
- LE-BERRE-ANTON V., BOMPARD-GILLES C., PAYAN F., ROUGÉ P. (1997): Characterization and functional properties of the alpha-amylase inhibitor ( $\alpha$ -AI) from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1343 31-41.p.
- LE GALL M., QUILLIEN L., SÉVE B., GUÉGUEN J., LALLÉS J.P. (2007): Weaned piglets display low gastrointestinal digestion of pea (*Pisum sativum* L.) lectin and pea albumin 2. *Journal of Animal Science*, 85 2972-2981. p. DOI:10.2527/jas.2006-795
- LEE R.Y., REINER D., MACZÓ A., BAKOS N., GELENCSEÉ É., HIGGINS T.J.V., EPSTEIN E.E. (2013a): Using human severe-combined immunodeficiency (Hu-SCID) mice as a model for testing allergenicity of genetically modified organisms (GMOs). Food Allergy and Anaphylaxis Meeting, 7 – 9 February 2013., Nice, France. Clinical and Translational Allergy 2013, 3 P80 DOI:10.1186/2045-7022-3-S3-P80

LEE R.Y., REINER D., DEKAN, G., MOORE A.E., HIGGINS T.J.V., EPSTEIN M.M. (2013b): Genetically modified  $\alpha$ -amylase inhibitor peas are not specifically allergenic in mice. *PlosOne*, 8 (1) e52972. DOI: 10.1371/journal.pone.0052972

LIENER I.E. (1976): Phytohemagglutinins (Phytolectins). *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27:291-319. p.

LIENER I.E., SHARON N., GOLDSTEIN I.J. (1986): The lectins. Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine. *Molecular Biology, An International Series of Monographs and Testbooks*. ISBN: 0-12-449945-7.

MACZÓ A., CUCU T., MEULENAER B., GELENCSEÉ É. (2014): Comparison of the alpha-amylase inhibitor-1 from common beans and transgenic pea expressing the bean alpha-amylase inhibitor-1 by means of LC–TOF–MS. *Food Research International* doi:10.1016/j.foodres.2014.12.025

MARSH J.T., TRYFONA T., POWERS S.J., STEPHENS E., DUPREE P., SHEWRY P.R., LOVEGROVE A. (2011): Determination of the N-glycosylation patterns of seed proteins: Applications to determine the authenticity and substantial equivalence of genetically modified (GM) crops. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 59, 8779-8788. p. DOI: 10.1021/jf2010854

MARSHALL J.J., LAUDA C.M. (1975): Purification and properties of Phaseolamin, an inhibitor of alpha-amylase, from the kidney-bean, *Phaseolus vulgaris*. *The Journal of Biological Chemistry*, 250 8030-8037. p.

MILLS E.N.C., MADSEN C., SHEWRY P.R., WICHES H.J. (2003): Food allergens of plant origin—their molecular and evolutionary relationships *Trends in Food Science & Technology*, 14 145–156. p. DOI:10.1016/S0924-2244 (03) 00026-8

MONTOYA C.A., LALLÉS J.P., BEEBE S., LETERME P. (2010): Phaseolin diversity as a possible strategy to improve the nutritional value of common beans (*Phaseolus vulgaris*). *Food Research International*, 43 443-449. p. DOI:10.1016/j.foodres.2009.09.040

MORENO J., CHRISPEELS M.J.(1989): A lectin gene encodes the alpha-amylase inhibitor of the common bean. *Proc Natl Acad Sci* 86 7885–7889. p.

MORENO J., ALTABELLA T., CHRISPEELS M.J. (1990): Characterization of alpha-amylase inhibitor, a lectin-like protein in the seeds of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology*, 92 703-709. p.

MORENO J., CLEMENTE A. (2008): 2S albumin storage proteins: What makes them food allergens? *Open Biochemistry Journal*, 2, 16–28. p. DOI: 10.2174/1874091X00802010016

MORTON R.L., SCHROEDER H.E., BATEMAN K.S., CHRISPEELS M.J., AMSTRONG E., HIGGINS T.J.V. (2000): Bean alpha-amylase inhibitor 1 in genetically modified peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. *PNAS*, 97 3820-3825. p.

MURAO S., GOTO A., MATSUI Y., OHYAMA K., ARAI M. (1981): Isolation and identification of a hog pancreatic alpha-amylase inhibitor (haim) producing *Straptomyces*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45 2599-2604. p.

MUZQUIZ M., VARELA A., BURBANO C., CUADRADO C., GUILLAMO'n E., PEDROSA M.M. (2012): Bioactive compounds in legumes: pronutritive and antinutritive actions. Implications for nutrition and health. *Phytochem Rev* 11 227–244. p. DOI: 10.1007/s11101-012-9233-9

NAGY-GASZTONYI M., NAGY A., NEMETH-SZERDAHELYI E., PAUK J., GELENCSE E. (2010): The Activities of Amylases and alpha-Amylase Inhibitor in Wide-range Herbicide Resistant Wheat Lines. *Czech Journal of Food Sciences*, 28 217-224. p.

NASI A., PICARIELLO G., FERRANTIA P. (2009): Proteomic approaches to study structure, functions and toxicity of legume seeds lectins. Perspectives for the assessment of food quality and safety. *Journal of Proteomics*, 72 527-538. p. DOI:10.1016/j.jprot.2009.02.001

NOLTMANN A.E. (1964): Isolation of crystalline phosphoglucose isomerase from rabbit muscle. *J. Biol. Chem.*, 239 1545–1550. p.

NOLTMANN A.E., NAKAGAWA Y. (1965): Isolation of crystalline phosphoglucose isomerase from brewer's yeast. *J. Biol. Chem.*, 240, 1877–1881.p.

O'FARRELL P.H. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 250 4007–4021. p.

OGAWA T., BANDO N., TSUJI H., OKAJIMA H., NISHIKAWA K., SASAOKA K. (1991): Investigation of the IgE-binding proteins in soybean by immunoblotting with the sera of the soybean- sensitive patients with atopic dermatitis. *J Nutr Sci Vitaminol* 37 555-65.p. DOI: <http://dx.doi.org/10.3177/jnsv.37.555>

OGAWA T., BANDO N., TSUJI H., NISHIKAWA K., KITAMURA K. (1995): Alpha-subunit of beta-conglycinin, as an allergenic protein recognized by IgE antibodies of soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 832-833. p.

PEUMANS W.J., VAN DAMME J.M. (1995): Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109, 347-352. p.

POPELKA J.C., TERRY N., HIGGINS T.J.V. (2004): Gene technology for grain legumes: can it contribute to the food challenge in developing countries? *Plant Science*, 167 195-206. p. DOI:10.1016/j.plantsci.2004.03.027

POWERS J.R., WHITAKER J.R. (1977): Purification and some physical and chemical properties of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) alpha-amylase inhibitor. *Journal of Biochemistry*, 1 217-238. p.

PRESCOTT V.E., CAMPBELL P.M., MOORE A., MATTES J., ROTHENBERG M.E., FOSTER P.S., HIGGINS T.J.V., HOGAN S.P. (2005): Transgenic expression of bean alpha-amylase inhibitor in peas results in altered structure and immunogenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 9023-9030. p. DOI: 10.1021/jf050594v

PRYME I.F., PUSZTAI A., BARDOCZ S, EWEN S.W.B. (1998): The induction of gut hyperplasia by phytohaemagglutinin in the diet and limitation of tumour growth. *Histol Histopathol* 13 575–583.p.

PUEYO J.J, HUNT D.C, CHRISPEELS M.J.(1993): Activation of bean (*Phaseolus vulgaris*) alpha-amylase inhibitor requires proteolytic processing of the protein. *Plant Physiology*, 101 1341-1348. p. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.101.4.1341>

PUSZTAI A, GRANT G., BARDOCZ S, BAINNER K., GELENCSE E., EWEN S.W.B. (1997): Both free and complexed trypsin inhibitors stimulate pancreatic secretion and change duodenal enzyme levels. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 35 (2) G340-G350. p.

PUSZTAI A, GRANT G, BUCHAN WC, BARDOCZ S, DE CARVAHLO ADFU, EWEN S.W.B. (1998): Lipid accumulation in obese Zucker rats is reduced by inclusion of raw kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) in the diet. *Br J Nutr*, 79 213–221. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1079/BJN19980033>

RABILLOUD T. (2002): Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Old, old fashioned, but still climbs up the mountains. *Proteomics*, 2 3-10. p.

RABJOHN P., BURKS A.W., SAMPSON H.A., BANNON G.A. (1999): Mutational analysis of the IgE-binding epitopes of the peanut allergen, Ara h 3: a member of the glycinin family of seed-storage proteins. *J. Allergy and Clinical Immunology*, 103 101.p.

RAJENDRAN P., THAYUMANAYAN B. (2000): Purification of an alpha-amylase inhibitor from seeds of little millet (*Panicum sumatrense* Roth). *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 9 (2) 89-94. p. DOI

RAUDER C., BREITENEDER H. (2007): Evolutionary biology of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120 (3) 518-525. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2007.07.024>

ROY F., BOYE J.I., SIMPSON B.K. (2010): Bioactive proteins and peptides in pulse crops: pea, chickpea and lentil. *Food Research International*, 43 432-442. p. DOI:10.1016/j.foodres.2009.09.002

SANCHEZ-MONGE R., LOPEZ-TORREJON G., PASCUALW C.Y., VARELA J., MARTIN-ESTEBAN M., SALCEDO G. (2004): Vicilin and convicilin are potential major allergens from pea. *Clin Exp Allergy* 34 1747–1753. p. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2004.02085.x

SAUNDERS R.M., LANG J.A. (1973): Alpha-amylase inhibitors in *Triticum Aestivum*: Purification and physical-chemical properties. *Phytochemistry*, 12, 1237- 1241. p.

SAVAGE G.P., DEO S. (1989): The nutritional value of peas (*Pisum sativum* ). A literature review. *Nutrition Abstracts and Reviews* (Series A) 59 66–83. p.

SAWYER L., HOLT C. (1993): The secondary structure of milk proteins and their biological function. *Journal of Dairy Science*, 76 3062–3078. p. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(93)77646-8

SCHNEIDER A.V. C. (2002): Overview of the market and consumption of pulses in Europe. *Br. J. Nutr.* 88 (3) S243–S250. p SHEWRY P.R., NAPIER J.A., Tatham A.S. (1995): Seed storage proteins: Structures and Biosynthesis. *The Plant Cell*, 7 945-956. p.

SCHROEDER H.E., GOLLASCH S., MOORE A.E., TABE L.M., CARIG S., HARDIE D.C., CHRISPEELS M.J., SPENCER D., HIGGINS T.J.V. (1995): Bean alpha-amylase inhibitor confers resistance to pea weevil (*Bruchus pisorum*) in genetically modified peas (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiology*, 107 1233-1239. p.

SCOPES R.K. (1982): Protein purification, principles and practice. Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, p. 137.

SHADE R.E., SCHROEDER H.E., PUEYO J.J., TABE L.M., MURDOCK L.L., HIGGINS T.J.V., CHRISPEELS M.J. (1994): Transgenic pea seeds expressing the alpha-amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. *Nature/Biotechnology*, 12 973-976. p. DOI: 10.1038/nbt0894-793

SHAHIDI F. (1997): Beneficial Health Effects and Drawbacks of Antinutrients and Phytochemicals in Foods. ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC DOI: 10.1021/bk-1997-0662.ch001

SHEWRY P.R., NAPIER J.A., TATHAM A.S. (1995): Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis. *The Plant Cell*, 7 945-956. p. DOI:10.1105/tpc.7.7.945

SHULTZ L.D., BREHM M.A., GARCIA-MARTINEZ J.V., GREINER D.L. (2012): Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 786. p. DOI: 10.1038/nri3311

SICHERER S.H., SAMPSON H.A. (2010): Food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 125 S116-S125. p. DOI:10.1016/j.jaci.2009.08.028

SILANO V., POCCHIARI F., KASARDA D.D. (1973): Physical characterization of alpha-amylase inhibitors from wheat. *Biochimica et Biophysica Acta*, 317 139-148. p.

SINGH U., KHERDEKAR. M.S., JAMBUNATHAN (1982): Studies on Desi and Kabuli Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Cultivars. The Levels of Amylase Inhibitors, Levels of Oligosaccharides and In Vitro Starch Digestibility. *Journal of Food Science*, 47 510-512. p. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1982.tb10113.x

SMITH A.M. (1990): Pea weevil (*Bruchus pisorum* L.) and crop loss-implications for management. In K Fujii, AMR Gatehouse, CD Johnson, R Mitchell, T Yoshida, eds, *Bruchids and Legumes: Economics, Ecology and Coevolution*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 105-114. p.

SOMOGYI, M. (1930): A method for the preparation of blood filtrates for the determination of sugar. *J. Biol. Chem.*, 86 655. p.

SPARVOLI F., BOLLINI R. (2014): Nutritional quality of common bean: more nutrients or less antinutrients? Phaseolus: A new world gift to mankind. Why common beans are so common? *The Journal of the International Legume Society*, 2 50-52. p.

SVENSSON B., FUKUDA K., NIELSEN P.K., BONSAER B.C. (2004): Proteinaceous alpha-amylase inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1696 145-156. p. DOI:10.1016/j.bbapap.2003.07.004

SZAMOS J., MACZÓ A., GELENCSEÉ É. (2012): Application of zinc-hydroxide in the purification of bean alpha-amylase inhibitor. *Acta Alimentaria*, 41, 272-276. p. DOI: 10.1556/AAlim.41.2012.2.14

THOMAS K., AALBERS M., BANNON G.A., BARTELS M., DEARMAN R.J., ESDAILE D.J., FU T.J., GLATT C.M., HADFIELD N., HATZOS C., HEFLE S.L., HEYLINGS J.R., GOODMAN R.E., HENRY B., HEROUET C., HOLSAPPLE M., LADICS G.S., LANDRY T.D., MACINTOSH S.C., RICE E.A., PRIVALLE L.S., STEINER H.Y., TESHIMA R., VAN REE R.,

- WOOLHISER M., ZAWODNYK J. (2004): A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 39 87–98. p. DOI:10.1016/j.yrtph.2003.11.003
- THOMPSON L.U. (1993): Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. *Food Research International* 26 131–149. p. DOI:10.1016/0963-9969(93)90069-U
- VAN DER VEEN M.J., VAN REE R., AALBERSE R.C., AKKERDAAS J., KOPPELMAN S.J., JANSEN H.M., VAN DER ZEE J.S. (1997): Poor biologic activity of cross-reactive IgE directed to carbohydrate determinants of glycoproteins. *Journal of Clinical Immunology*, 100 (3) 327-334. p. DOI:10.1016/S0091-6749(97)70245-8
- WANG L., ZHOU X.T., WANG X.C., LIANG S.P. (2004): Purification and characterization of a novel  $\alpha$ -amylase inhibitor from wild Amaranth (*Amaranthus paniculatus*) weeds. *Chin. J. Biochem. Mol. Biol.* 20 (4) 434-439. p. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2007.00147.x
- WOODWARD M.P., YOUNG W.W., BLOODGOOD R.A. (1984): Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. *Journal of Immunological Methods*, 78 143-153. p. DOI:10.1016/0022-1759(85)90337-0
- YAMADA T., HATTORI K., ISHIMOTO M. (2001): Purification and characterization of two alpha-amylase inhibitors from seeds of tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). *Phytochemistry*. 58 59-66. p.
- YAMAGUCHI H. (1993): Isolation and characterization of of the subunits of a heat-labile  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris* white kidney bean. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57 297-302. p. DOI:10.1271/bbb.57.297
- YANG M.Y., ZHANG X.Q., MA Y., SHEN J., SONG J.R., ZHU H.L. (2008): Purification and partial characterization of a glycoprotein alpha-amylase inhibitor from white kidney bean (*Phaseolus vulgaris*. L). *Journal of Food Biochemistry*, 32 72-84. p. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2007.00147.x



ZACHARIUS R.M., ZEL T.E., MORRISON J.H., WOODLOCK J.J. (1969): Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 30 148-152. p. DOI:10.1016/0003-2697(69)90383-2

ZUCOLOTO S., SCARAMELLO A.C., LAJOLO F.M., MUCILLO G. (1991): Effect of oral phytohaemagglutinin intake on cell adaptation in the epithelium of the small intestine of the rat. *Int. J. Exp. Path.* 72 41-45. p.

<http://www.uniprot.org>

<https://fermi.utmb.edu/SDAP/>

<http://allergen.nihs.go.jp/ADFS/>

<http://gmobl.sjtu.edu.cn/proAP/main.html>

<http://immuneepitope.org>

## MELLÉKLETEK

### M1: Reagensek

*Molekulatömeg markerek (Bio-Rad Magyarország Kft.):*

- *All Blue*: 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250 kDa
- *Broad Range*: 6, 19, 29, 37, 52, 79, 116, 199 kDa
- *Low Range*: 6, 14, 21, 31, 45, 66, 97, 116, 200 kDa

*Molekulatömeg és izoelektromos pont markerek (Sigma-Aldrich Kft.):*

- amiloglükózidáz: 79/3,8 (MT/pI)
- ovalbumin: 45/5,1 (MT/pI)
- karbon-anhidráz: 29/7,0 (MT/pI)
- mioglobin : 17/7,6 (MT/pI)

*Egyéb reagensek*

- Anti-nyúl IgG HRPO konjugátum (Sigma-Aldrich Kft.)
- Anti-humán IgE HRPO konjugátum (Sigma-Aldrich Kft.)
- Sertés pankréász eredetű alfa-amiláz enzim (Sigma-Aldrich Kft.)
- Sertés eredetű pepszin (Sigma-Aldrich Kft.)
- Bab lektin, PHA-L (Sigma-Aldrich Kft.)
- Analitikai tisztaságú oldószerek, reagensek és egyéb vegyszerek (Sigma-Aldrich Kft., Bio-Rad Magyarország Kft., Invitrogen, Millipore, Reanal Finomvegyszergyár Zrt.)

### M2: Oldatok és pufferek összetétele

#### **SDS-PAGE-nél és 2-DE-nél használt pufferek:**

##### **15 %-os elválasztó gél összetétele (2 gélhez):**

Desztillált víz	2,06 ml
30 % akrilamid	4 ml
1,5 M TRISZ-HCl (pH 8,8)	1,8 ml
10 % SDS	50 µl
10 % ammónium-perszulfát	50 µl
TEMED	6 µl

**6 %-os gyűjtő gél összetétele (2 gélhez):**

Desztillált víz	1,6 ml
30 % akrilamid	0,5 ml
1,5 M TRISZ-HCl (pH 6,8)	0,33 ml
10 % SDS	27,5 µl
10 % ammónium-perszulfát	25 µl
TEMED	3 µl

**Laemmlí mintaoldó puffer (pH 6,8):**

3% SDS; 62 mM TRISZ; 8,7% glicerin; 10% β-merkaptoetanol

**Futtató- puffer (pH 7,0):**

0,0035 M SDS; 0,025 M TRISZ; 0,193 M glicin

**PAGE-mosó oldat:**

10 % etanol; 5 % ecetsav

**Fixáló oldat:**

20 % TCA

**Coomassie Blue festék:**

0,2 % Coomassie R-250; 45 % etanol; 9 % ecetsav

**Festékmosó oldat:**

10 % ecetsav

**Rehidratáló puffer:**

8 M karbamid; 1 % CHAPS; 20 mM DTT

**DTT tartalmú equilibráló oldat:**

200 mg DTT; 6 M urea; 2 % SDS; 1,5 M TRISZ-HCl (pH8,8); 20 % (v/v) glicerol

**Jódacetamid tartalmú equilibráló oldat:**

250 mg jódacetamid; 6 M urea; 2 % SDS; 1,5 M Tris-HCl (pH8,8); 20 % (v/v) glicerol

### **Natív-PAGE-nél használt pufferek:**

#### **10 %-os natív gél összetétele (2 gélhez):**

Desztillált víz	3,4 ml
30 % akrilamid	2,66 ml
1,5 M TRISZ-HCl (pH 8,8)	1,8 ml
10 % ammónium-perszulfát	50 µl
TEMED	6 µl

#### **Futtató-puffer (pH 7,0):**

0,025 M TRISZ; 0,193 M glicin

#### **Mintaoldó puffer:**

0,585 M szacharóz a futtató-pufferben

#### **Extrakciós puffer:**

40 mM TRISZ; 1 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 8,0)

#### **Kálium-jodid oldat:**

1 mM I<sub>2</sub>; 0,5 M KI

### **Immunblotthoz használt pufferek:**

#### **Katód-puffer (pH 9,4):**

0,25 M TRISZ bázis; 0,4 M glicin; 10 % metanol

#### **Anód I. puffer (pH 10,4):**

0,3 M TRISZ; 10 % metanol

#### **Anód II. puffer (pH 10,4):**

0,25 M TRISZ; 10 % metanol

#### **Blokkoló oldat:**

0,05 % Twin20; 1 % BSA

**PBS (pH 7,5):**

0,136 M NaCl; 0,0026 M KCl; 0,018 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> X H<sub>2</sub>O; 0,002 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**Mosó oldat:**

0,05 % Twin 20 tartalmú PBS

**4-chloro-1-naphftol szubsztrát oldat:**

0,48 mM 4-chloro-1-naphftol; 50 mM TRISZ-HCl; 0,2 M NaCl; 17 % metanol

**500 mM kálium-foszfát puffer (pH 7,5):**

0,5 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**In vitro emésztéshez használt oldatok:****SGF oldat (pH 2,0):**

1,5 ml 0,03 M NaCl; 3,2 mg pepszin; 4 µl 4 M CaCl<sub>2</sub>

**In vivo emésztéshez használt oldatok:****Mosóoldat a gyomor és vékonybél tartalmak kinyeréséhez:**

15 mM EDTA; 1 mM Na-azid; 2 mM PMSF

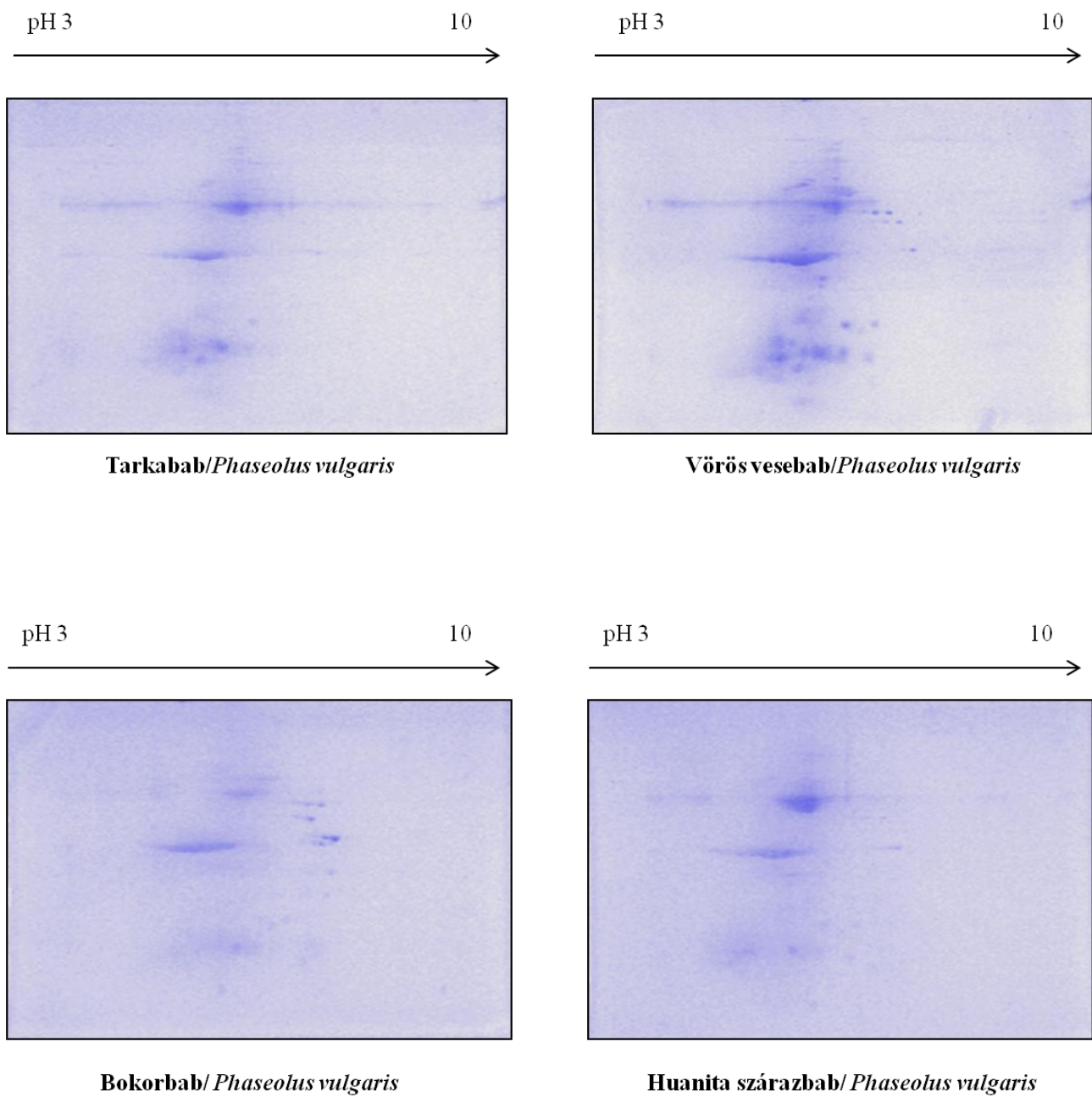
**Extrakciós puffer I. (pH 8,0):**

16 mM TRISZ-HCL; 140 mM SDS

**Extrakciós puffer II. (pH 8,0):**

10 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 150 mM NaCl

### M3: Magyarországi *Phaseolus vulgaris* babok fehérjéinek 2-DE mintázata



**40. ábra:** Magyarországi *Phaseolus vulgaris* babok fehérjéinek 2-DE mintázata

Felvitt mennyiség: 800 $\mu$ g sz.a./250 $\mu$ l rehidratáló puffer

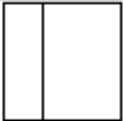

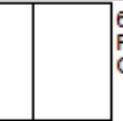
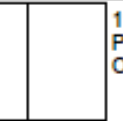
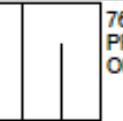



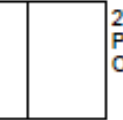
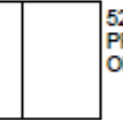



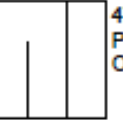
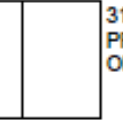



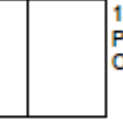
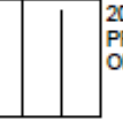



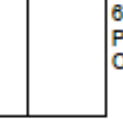
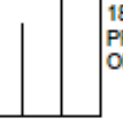
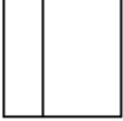


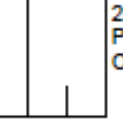
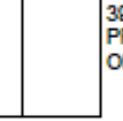




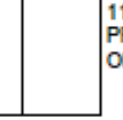
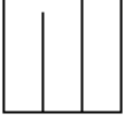

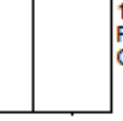
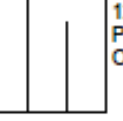
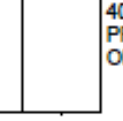



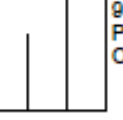
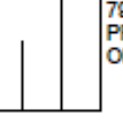
## M4: Különbségfehérjék a GM és nGM borsólisztben

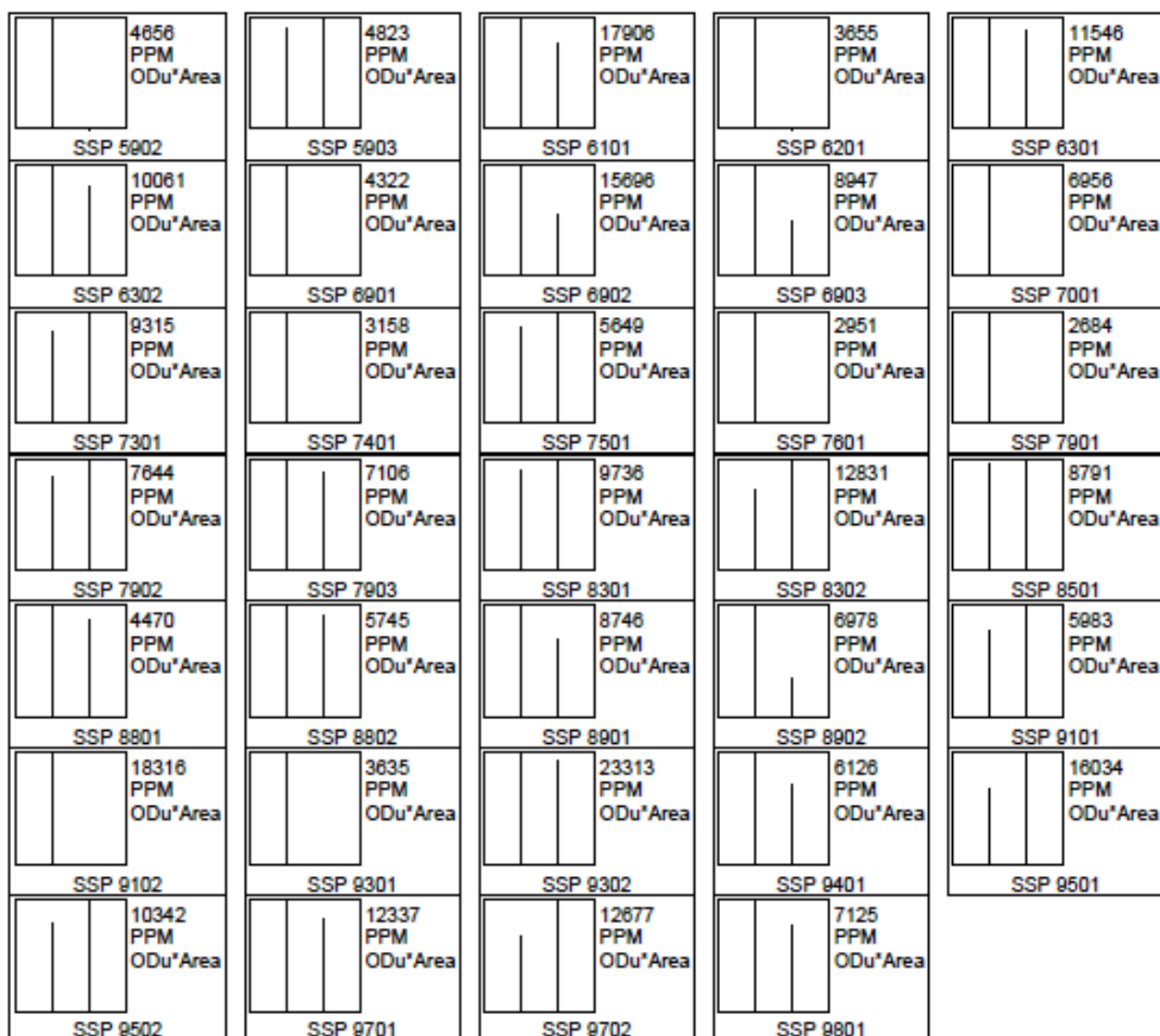
**14. táblázat:** A GM és nGM borsóban detektált különbség fehérjék mennyiségi összetétele

SSP	03.21. GM PEA crop	03.21. NONGM PEA crop	SSP	03.21. GM PEA crop	03.21. NONGM PEA crop
1	20065.2	---	4601	11286.7	---
2	57344.4	84820.9	4701	51434.4	61389.2
101	61652.8	---	4901	5395.2	18617.6
201	11873.6	---	5101	10721.4	---
601	7680.2	4942.6	5201	12621.1	9738.2
1301	7986.8	12349.8	5401	4074.7	---
1501	4101.8	5247.6	5402	8568.0	12158.5
1601	5835.3	5460.1	5403	9236.5	9179.2
1801	2731.8	---	5601	15902.1	---
1901	5282.8	---	5701	60043.3	91493.5
1902	4231.7	4186.2	5901	4738.7	7959.7
2001	55202.0	69260.1	5902	4655.8	---
2101	27208.8	31284.4	5903	4322.1	4822.6
2102	30311.4	47531.7	6101	17906.0	13881.4
2103	3170.2	---	6201	3654.7	---
2301	15228.9	17369.9	6301	11545.9	10264.2
2401	3848.0	9032.2	6302	10060.8	8015.4
2601	16517.1	28930.1	6901	4322.1	---
2801	13775.7	---	6902	15696.2	8701.8
2901	20346.5	18124.5	6903	8947.1	4441.1
2902	14060.6	---	7001	6956.2	---
3001	5334.6	---	7301	7606.8	9314.8
3101	7765.6	11252.6	7401	3157.9	---
3401	6751.2	---	7501	4885.6	5649.3
3501	14523.5	18676.7	7601	2950.6	---
3601	3045.2	---	7901	2683.8	---
3701	7886.2	10001.5	7902	6341.4	7644.2
3702	25984.3	41486.2	7903	7105.6	6278.0
3703	25984.3	6335.9	8301	8786.3	9735.6
4201	3984.1	---	8302	9274.4	12831.4
4202	5364.1	7782.4	8501	8407.4	8791.1
4301	9549.5	15630.0	8801	4470.2	3919.1
4401	14838.1	20960.2	8802	5744.7	5248.4
4501	2672.3	2897.5	8901	8746.3	6079.2

SSP	03.21. GM PEA crop	03.21. NONGM PEA crop
8902	6977.6	2352.4
9101	4619.9	5982.5
9102	18315.7	---
9301	3634.9	---
9302	23313.3	21636.0
9401	6126.0	4408.9
9501	10943.5	16034.1
9502	8122.3	10342.3
9701	12336.7	10265.1
9702	8656.8	12676.7
9801	7125.4	5527.9
TOTALS:	---	---
Matched Spots:	79	54
Quan:	994560.5	898942.6

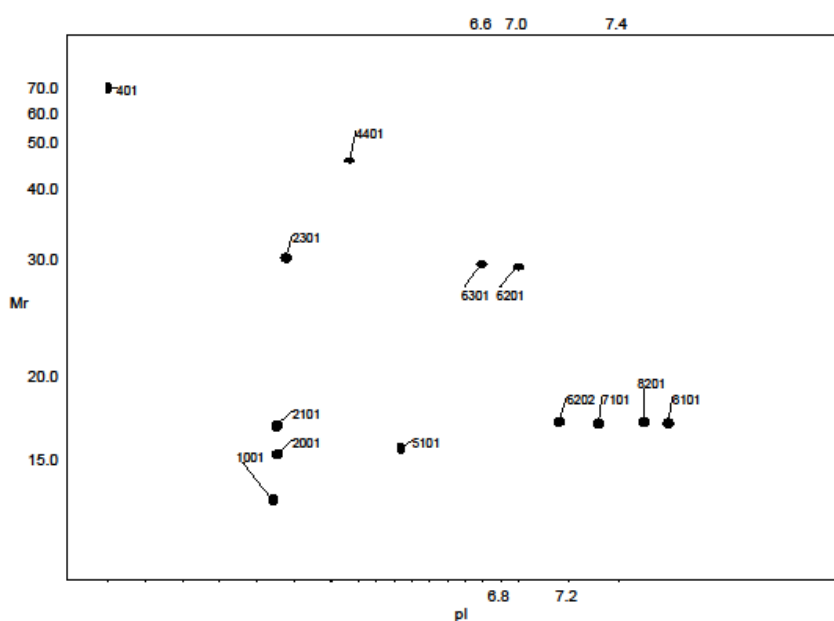
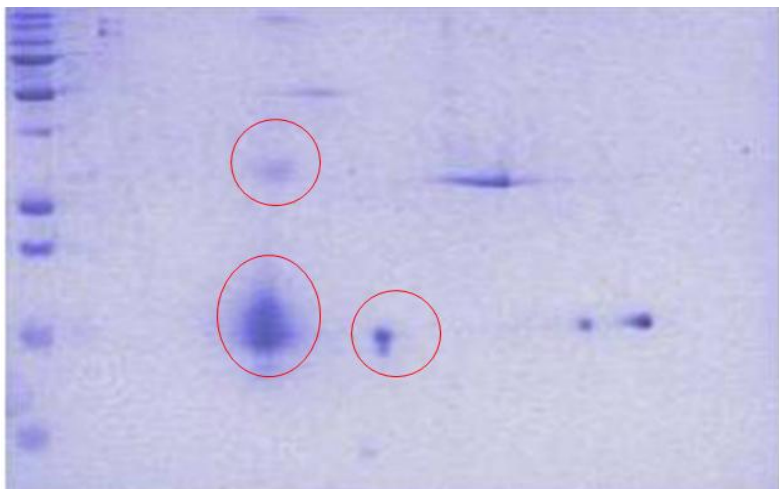


 20065 PPM ODu*Area SSP 0001	 84821 PPM ODu*Area SSP 0002	 61653 PPM ODu*Area SSP 0101	 11874 PPM ODu*Area SSP 0201	 7680 PPM ODu*Area SSP 0601
 12350 PPM ODu*Area SSP 1301	 5248 PPM ODu*Area SSP 1501	 5835 PPM ODu*Area SSP 1601	 2732 PPM ODu*Area SSP 1801	 5283 PPM ODu*Area SSP 1901
 4232 PPM ODu*Area SSP 1902	 69260 PPM ODu*Area SSP 2001	 31284 PPM ODu*Area SSP 2101	 47532 PPM ODu*Area SSP 2102	 3170 PPM ODu*Area SSP 2103
 17370 PPM ODu*Area SSP 2301	 9032 PPM ODu*Area SSP 2401	 28930 PPM ODu*Area SSP 2601	 13776 PPM ODu*Area SSP 2801	 20346 PPM ODu*Area SSP 2901
 14061 PPM ODu*Area SSP 2902	 5335 PPM ODu*Area SSP 3001	 11253 PPM ODu*Area SSP 3101	 6751 PPM ODu*Area SSP 3401	 18677 PPM ODu*Area SSP 3501
 3045 PPM ODu*Area SSP 3601	 10001 PPM ODu*Area SSP 3701	 41486 PPM ODu*Area SSP 3702	 25884 PPM ODu*Area SSP 3703	 3984 PPM ODu*Area SSP 4201
 7782 PPM ODu*Area SSP 4202	 15630 PPM ODu*Area SSP 4301	 20960 PPM ODu*Area SSP 4401	 2897 PPM ODu*Area SSP 4501	 11287 PPM ODu*Area SSP 4601
 61389 PPM ODu*Area SSP 4701	 18618 PPM ODu*Area SSP 4901	 10721 PPM ODu*Area SSP 5101	 12621 PPM ODu*Area SSP 5201	 4075 PPM ODu*Area SSP 5401
 12158 PPM ODu*Area SSP 5402	 9236 PPM ODu*Area SSP 5403	 15902 PPM ODu*Area SSP 5601	 91493 PPM ODu*Area SSP 5701	 7960 PPM ODu*Area SSP 5901



**41. ábra:** A GM és nGM borsóban detektált különbség fehérjék mennyiségi hisztogramjai

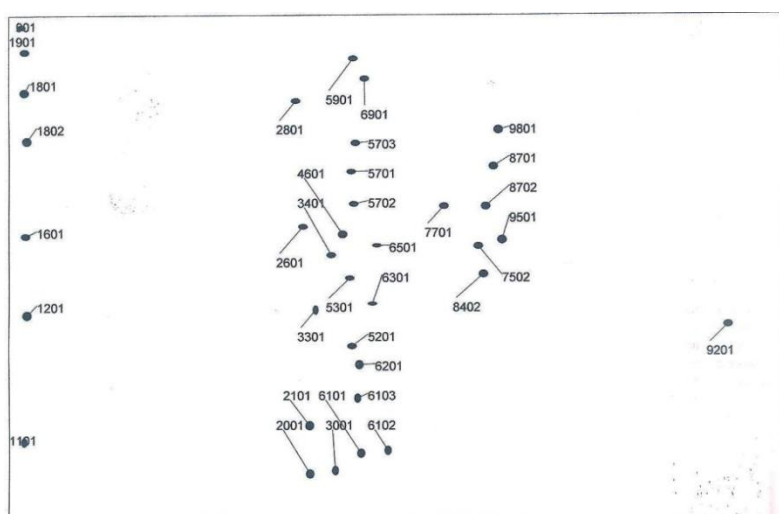
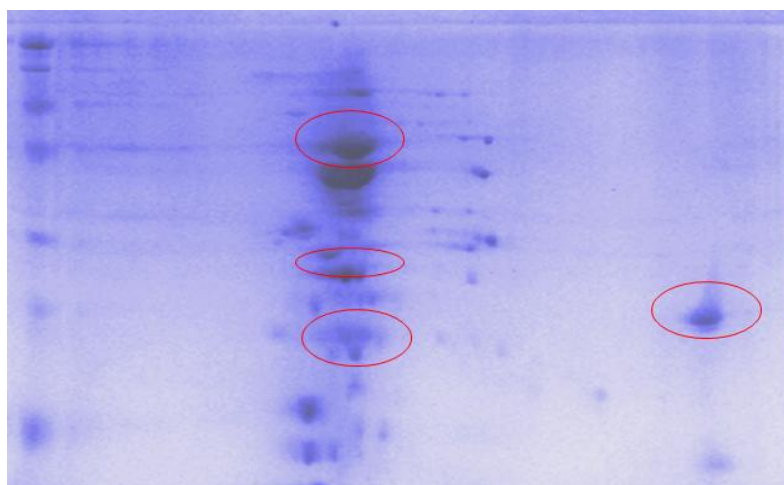
**M5: HuSCID egérszérumokkal azonosított IgE-reaktív polipeptidek humán pozitív  
szérumokkal való összehasonlító vizsgálata**



**42. ábra:** Tendergreen bab  $\alpha$ AI-ban azonosított 2-DE foltok

**15. táblázat:** Tendergreen babban azonosított 2-DE foltokhoz tartozó SSP számok

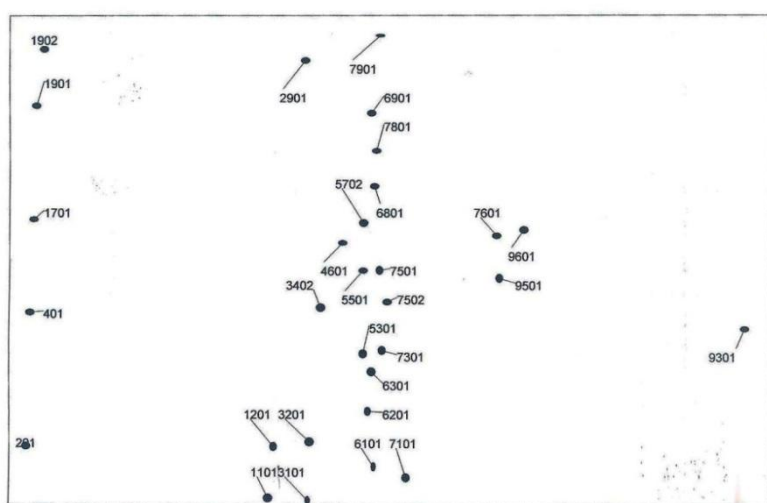
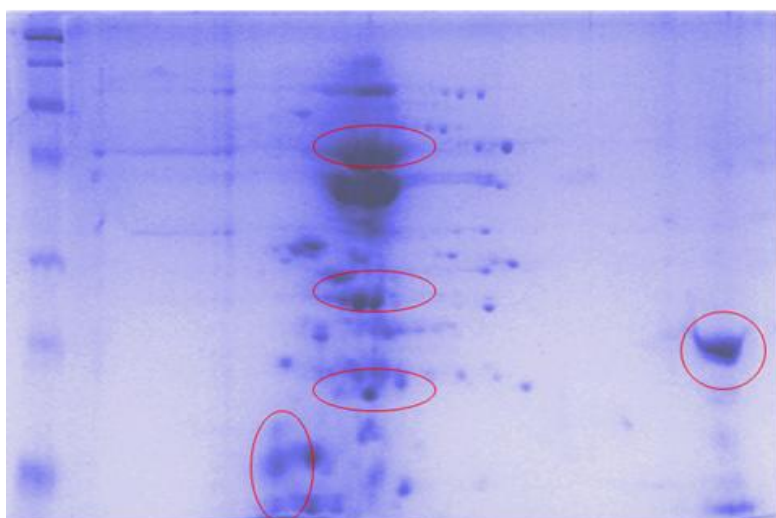
SSP szám	MT, kDa	pI
2301	30	4,8
2101	17	4,7
2001	15	4,7
1001	13	4,7
5101	16	5,7



**43. ábra:** A nGM borsó örleményben azonosított 2-DE foltok

**16. táblázat:** A nGM borsó örleményben azonosított 2-DE foltokhoz tartozó SSP számok

SSP szám	MT, kDa	pI
5601	53	5.2
3501	46	5.0
5502	46	5.2
5202	31	5.3
3201	30	5.0
4101	25	5.1
5101	25	5.2
9201	29	7.0



**44. ábra:** A GM borsó örleményben azonosított 2-DE foltok

**17. táblázat:** A GM borsó örleményben azonosított 2-DE foltokhoz tartozó SSP számok

SSP szám	MT, kDa	pI
6801	48	5.4
5702	46	5.0
5702	46	5.2
5501	34	5.0
5501	34	5.1
6301	26	5.0
6201	25	5.1
3101	17	4.8
3201	20	4.8
9301	30	6.9

**18. táblázat:** Humán szérumok IgE-reaktív kötőhelyeinek összehasonlítása humanizált egér szérumok IgE-reaktív kötőhelyeivel

Donor PBMC*	Csoport**	Antigén***	Szérum	IgE-reaktív polipeptid (MT/pI)		Azonosított IgE reaktív peptidek aránya****
				MT (kDa)	pI	
B	PBS (A)	TG bab $\alpha$ AI	PA2	-	-	0/5
B	PBS (A)	nGM borsó őrlemény	PA3	31 30 25 25	5,3 5,0 5,1 5,2	
B	PBS (A)	GM borsó őrlemény	PA4	-		
-	-	TG bab $\alpha$ AI	20. sz. humán	30 17 15 13 16	4,8 4,7 4,7 4,7 5,7	5
B	TG bab $\alpha$ AI (C)	TG bab $\alpha$ AI	PC1	30 17 15 13 16	4,8 4,7 4,7 4,7 5,7	5/5
B	TG bab $\alpha$ AI (C)	TG bab $\alpha$ AI	PC2	17 15 13 16	4,7 4,7 4,7 5,7	4/5
B	TG bab $\alpha$ AI (C)	TG bab $\alpha$ AI	PC3	30 17 15 13 16	4,8 4,7 4,7 4,7 5,7	5/5
B	TG bab $\alpha$ AI (C)	TG bab $\alpha$ AI	PC4	17 15 13 16	4,7 4,7 4,7 5,7	4/5
B	TG bab $\alpha$ AI (C)	TG bab $\alpha$ AI	PC5	-	-	0/5
-	-	nGM borsó őrlemény	20. sz. humán	53 46 46 31 30 25 25 29	5,2 5,0 5,2 5,3 5,0 5,1 5,2 7,0	8

B	nGM borsó őrlemény (D)	nGM borsó őrlemény	PD1	31 30 25 25	5,3 5,0 5,1 5,2	4/8
B	nGM borsó őrlemény (D)	nGM borsó őrlemény	PD2	53 46 46 31 30 25 25	5,2 5,0 5,2 5,3 5,0 5,1 5,2	7/8
B	nGM borsó őrlemény (D)	nGM borsó őrlemény	PD3	53 46 46 31 30 25 25 29	5,2 5,0 5,2 5,3 5,0 5,1 5,2 7,0	8/8
B	nGM borsó őrlemény (D)	nGM borsó őrlemény	PD4	53 46 46 31 30	5,2 5,0 5,2 5,3 5,0	5/8
B	nGM borsó őrlemény (D)	nGM borsó őrlemény	PD5	31 30	5,3 5,0	2/8
-	-	GM borsó őrlemény	20. sz. humán	48 46 46 34 34 26 25 17 20 30	5,4 5,0 5,2 5,0 5,1 5,0 5,1 4,8 4,8 6,9	10
B	GM borsó őrlemény (E)	GM borsó őrlemény	PE1	48 34 34 26 25	5,4 5,0 5,1 5,0 5,1	5/10
B	GM borsó őrlemény (E)	GM borsó őrlemény	PE2	34 34 26 25	5,0 5,1 5,0 5,1	4/10

B	GM borsó őrlemény (E)	GM borsó őrlemény	PE3	34	5,0	6/10
				34	5,1	
				26	5,0	
				25	5,1	
				17	4,8	
				20	4,8	
B	GM borsó őrlemény (E)	GM borsó őrlemény	PE4	34	5,0	2/10
				34	5,1	
B	GM borsó őrlemény (E)	GM borsó őrlemény	PE5	34	5,0	4/10
				34	5,1	
				26	5,0	
				25	5,1	
H	PBS (A)	TG bab $\alpha$ AI	HA2	30	4,8	5/5
				17	4,7	
				15	4,7	
				13	4,7	
				16	5,7	
H	PBS (A)	nGM borsó őrlemény	HA3	31	5,3	4/8
				30	5,0	
				25	5,1	
				25	5,2	
H	PBS (A)	GM borsó őrlemény	HA4	-	-	0/10
H	TG bab $\alpha$ AI (C)	TG bab $\alpha$ AI	HC1	-	-	0/5
H	TG bab $\alpha$ AI (C)	TG bab $\alpha$ AI	HC2	-	-	0/5
H	TG bab $\alpha$ AI (C)	TG bab $\alpha$ AI	HC3	30	4,8	5/5
				17	4,7	
				15	4,7	
				13	4,7	
				16	5,7	
H	TG bab $\alpha$ AI (C)	TG bab $\alpha$ AI	HC4	-	-	0/5
H	TG bab $\alpha$ AI (C)	TG bab $\alpha$ AI	HC5	-	-	0/5
H	nGM borsó őrlemény (D)	nGM borsó őrlemény	HD1	-	-	0/8
H	nGM borsó őrlemény (D)	nGM borsó őrlemény	HD2	-	-	0/8
H	nGM borsó őrlemény (D)	nGM borsó őrlemény	HD3	-	-	0/8
H	nGM	nGM borsó	HD4	-	-	0/8



	borsó őrlemény (D)	őrlemény				
H	nGM borsó őrlemény (D)	nGM borsó őrlemény	HD5	-	-	0/8
H	GM borsó őrlemény (E)	GM borsó őrlemény	HE1	-	-	0/8
H	GM borsó őrlemény (E)	GM borsó őrlemény	HE2	34 34 26 25	5,0 5,1 5,0 5,1	4/10
H	GM borsó őrlemény (E)	GM borsó őrlemény	HE3	34 34	5,0 5,1	2/10
H	GM borsó őrlemény (E)	GM borsó őrlemény	HE4	-	-	0/10
H	GM borsó őrlemény (E)	GM borsó őrlemény	HE5	-	-	0/10
N	N	TG bab $\alpha$ AI	SN2	-	-	0/5
N	N	nGM borsó őrlemény	SN3	-	-	0/8
N	N	GM borsó őrlemény	SN4	-	-	0/10

## A DISSZERTÁCIÓ TÉMÁJÁBAN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

### Impakt faktoros folyóiratcikkek

**Maczó A.**, Cucu T., De Meulenaer B., Gelencsér É. (2014): Comparison of the alpha-amylase inhibitor-1 from common beans and transgenic pea expressing the bean alpha-amylase inhibitor-1 by means of LC–TOF–MS. *Food Research International* doi:10.1016/j.foodres.2014.12.025 (IF 3,050)

Takács, K., Guillamon, E., Pedrosa, M. M., Cuadrado, C., Burbano, C., Muzquiz, M., Haddad, J., Allaf, K., **Maczó, A.**, Polgár, M., Gelencsér, É. (2013): Study of the effect of instant controlled pressure drop (DIC) treatment on IgE-reactive legume-protein patterns by electrophoresis and immunoblot. *Food and Agriculture Immunology*, 23, 1-13 DOI: 10.1080/09540105.2012.759539 (IF 0,984)

Szamos, J., **Maczó, A.**, Gelencsér, É. (2012): Application of zinc-hydroxide in the purification of bean alpha-amylase inhibitor. *Acta Alimentaria*, 41, 272-276 DOI: 10.1556/AAlim.41.2012.2.14 (IF 0,475)

### Nem impakt faktoros folyóiratcikkek

R. Lee, D. Reiner, **A. Maczó**, N. Bakos, É. Gelencsér, T. J. V. Higgins, M. M. Epstein (2013): Using human severe-combined immunodeficiency (Hu-SCID) mice as a model for testing allergenicity of genetically modified organisms (GMOs). Food Allergy and Anaphylaxis Meeting, 7 – 9 February 2013., Nice, France. *Clinical and Translational Allergy* 2013, 3 P80 DOI:10.1186/2045-7022-3-S3-P80

### Angol nyelvű konferencia kiadványok

Nagy A., **Maczó A.**, Hegyi F., Szabó E., Takács K., Szerdahelyi E., Gelencsér É. *In vivo* digestibility of common bean derived alpha-amylase inhibitors. 4<sup>th</sup> International Conference of Food Digestion organized by COST Action FA1005 Infogest. 17-19 March 2015, Naples, Italy. 17-19 March 2015, Naples, Italy. Abstract book P42. [www.cost-infogest.eu](http://www.cost-infogest.eu).

**A. Maczo**, T. Cucu, B. De Meulenaer, É. Gelencsér: Characterization of legume seed derived alpha-amylase inhibitors as potential source or precursors of putative nutraceutical compounds. 5th MC & WG Meetings of COST Action FA1005 23-25 September 2014 Dubrovnik, Croatia.

**Anita Maczó**, Éva Gelencsér: Characterization of Ig-E binding epitopes in allergens of *Phaseolus vulgaris* bean species. First International Conference on Food Digestion organized by COST Action FA1005 Infogest. 19-21 March 2012 Cesena, Italy. abstract number: P31. [www.cost-infogest.eu](http://www.cost-infogest.eu).

Anita Maczó, Éva Gelencsér: Investigation of alpha-amylase inhibitor from legume seeds. 2<sup>nd</sup> Management Committee & Working Group Meetings of COST Action FA1005. 19-21 October 2011 Le Croisic, France. [www.cost-infogest.eu](http://www.cost-infogest.eu).

### **Magyar nyelvű konferencia kiadványok**

**Maczó Anita**, Nagy András, Gelencsér Éva: Bab alfa-amiláz inhibitorok, mint potenciális bioaktív fehérjék. Magyar Táplálkozástudományi Társaság és NAIK Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet; Aktualitások a Táplálkozástudományi Kutatásokban PhD konferencia, 2015. január 22, Budapest. ISBN 978-963-88108-8-5

Gelencsér Éva, Takács Krisztina, **Maczó Anita**, Nagy András: Hüvelyes fehérjék bioaktív komponensei. Magyar Táplálkozástudományi Társaság XXXIX. Vándorgyűlése, Hajdúszoboszló, 2014. 10. 09-11

**Maczó Anita**, Gelencsér Éva: Egyes babfajtákban előforduló alfa-amiláz inhibitorok, mint potenciális hüvelyes allergének. Táplálkozástudományi kutatások konferencia - Kaposvári Egyetem, 2012. december 10-11. ISBN 978-963-9821-55-2

**Maczó Anita**, Szamos Jenő, Gelencsér Éva: Alfa-amiláz inhibitorok vizsgálata hüvelyesekben allergia szempontjából 2011. október 6-8. Balatonőszöd, Magyar Táplálkozástudományi Társaság XXXVI. Vándorgyűlése. ISBN 978-963-88108-4-7

## EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

### Impakt faktoros folyóiratcikkek

Elena Marcolini, Elena Babini, Alessandra Bordoni, Mattia Di Nunzio, Luca Laghi, **Anita Maczó**, Gianfranco Picone, Emőke Szerdahelyi, Veronica Valli and Francesco Capozzi (2015): Bioaccessibility of the Bioactive Peptide Carnosine during in Vitro Digestion of Cured Beef Meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (20), 4973-4978. p. (IF 3,107) DOI: 10.1021/acs.jafc.5b01157

### Nem impakt faktoros folyóiratcikk

Zsolt Zalán, Ferenc Hegyi, Erika Erzsébet Szabó, **Anita Maczó**, Erzsébet Baka, Muying Du, Yuting Liao, Kan Jianquan (2015): Bran fermentation with *Lactobacillus* strains to develop a functional ingredient for sourdough production. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 4 (4): 409-419. p. DOI: 10.11648/j.ijnfs.20150404.1

Hegyi Ferenc, Zalán Zsolt, Szabó E. Erika, **Maczó Anita**, Du Muying, Liao Yuting, Jianquan Kan (2015): Tejsavasan fermentált korpával készített kovász alkalmazhatóságának vizsgálata kenyér készítéséhrz. Élelmiszer-Tudomány-Technológia LXIX. évf., 2. szám. 3-10. old. ISSN: 2061-3954

### Angol nyelvű konferencia kiadványok

Takács K., Nagy A., Szerdahelyi E., **Maczó A.**, Brncic R., Gelencsér E. Mechanically deboned turkey meat with improved digestibility and biological value. 4<sup>th</sup> International Conference of Food Digestion organized by COST Action FA1005 Infogest. 17-19 March 2015, Naples, Italy. [www.cost-infogest.eu](http://www.cost-infogest.eu).

F. Capozzi, E. Babini, A. Bordoni, M. Di Nunzio, L. Laghi, E. Marcolini, G. Picone, V. Valli, E. Szerdahelyi, **A. Maczó**. In vitro digestion of the processed meat product bresaola. 3rd Management Committee & Working Groups Meeting of COST Action FA 1005. October 2-4 2012 Leatherhead, UK. [www.cost-infogest.eu](http://www.cost-infogest.eu)

Takács K., Nagy A., Gelencsér É., Szamos J., **Maczó A.** (2012): Identification of serpin as a potential allergic marker of wheat contamination. 3rd Management Committee & Working Groups Meeting of COST Action FA 1005 - October 2-4, 2012 Leatherhead, UK. [www.cost-infogest.eu](http://www.cost-infogest.eu)

**A.Maczó**, K.Takács, A.Nagy, J.Szamos, E.Gelencsér: Identification of serpin as a potential allergen marker of wheat contamination (poszter) 9<sup>th</sup> European Young Cereal Scientists and Technologists Workshop 25-27<sup>th</sup> May **2010**. Martonvásár-Budapest, Hungary

### **Magyar nyelvű konferencia kiadványok**

Mócsai Réka Tünde, **Maczó Anita**, Berki Mária, Nagyné Gasztonyi Magdolna, Milotay Péter, Tömösköziné Farkas Rita: Bioaktív komponensek és fehérjék vizsgálata *Solanum Lycopersicum* fajtákban és fajtajelöltekben. Magyar Táplálkozástudományi Társaság és NAIK Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet; Aktualitások a Táplálkozástudományi Kutatásokban PhD konferencia, 2015. január 22, Budapest. ISBN 978-963-88108-8-5

Mócsai Réka Tünde, **Maczó Anita**, Tömösköziné Farkas Rita, Simonné Sarkadi Livia: *Solanum Lycopersicum* fajtajelöltek minősítése táplálkozás-egészségügyi szempontból. Magyar Táplálkozástudományi Társaság XXXIX. Vándorgyűlése, Hajdúszoboszló, 2014. 10. 09-11.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Legnagyobb köszönettel témavezetőmnek, **Dr. Gelencsér Évának** tartozom, aki időt és energiát nem sajnálva széleskörű szakmai tudásával mindvégig segítette munkámat, személyes és szakmai támogatására mindig számíthattam.

Köszönettel tartozom a Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet (NAIK-ÉKI jogelődje) egykori igazgatóinak, **Dr. Bánáti Dianának** és **Dr. Székács Andrásnak**, valamint a NAIK-ÉKI jelenlegi igazgatójának **Dr. Kiss Attilának**, hogy lehetőséget biztosítottak az intézetben való munkához.

Doktori munkámat mindvégig figyelemmel kísérte és iránymutató tanácsaival segítette **Dr. Szamos Jenő**. Köszönettel tartozom neki a fehérje izolálási technikák elsajátításáért, szakmai támogatásáért. Köszönöm **Háderné Sólyom Katalinnak** a laboratóriumi mindennapokban nyújtott segítségét és gyakorlati tanácsait.

Köszönettel tartozom a Biológia osztály munkatársainak **Némethné Dr. Szerdahelyi Emőkének**, **Horváthné Dr. Szanics Enikőnek**, **Dr. Takács Krisztinának**, **Dr. Nagy Andrásnak**, **Dr. Zalán Zsoltnak**, **Dr. Hegyi Ferencnek**, **Koppányné Dr. Szabó Erikának**, **Dr. Jánosi Annának**, **Dr. Halász Annának**, **Kissné Valentin Évának**, **Molnár Mihálynének** és **Gyebróczki Józsefnek** akik segítségükkel és támogatásaikkal hozzájárultak doktori értekezésem elkészítéséhez.

Köszönettel tartozom **Dr. T. J. V. Higginsnek**, **Dr. Michelle Epsteinnek** és **Dr. Rui Leenek** a GMSAFOOD projekt keretében való együttműködésért.

Köszönöm **Dr. Didier Dupontnak**, a COST-Infogest FA1005 vezetőjének a program által biztosított három hónapos kutatói ösztöndíjat, melynek keretében a Genti Egyetemen Táplálkozástudományi kutatócsoportjában dolgozhattam.

Köszönet illeti **Dr. Bruno De Meulenaert** és **Dr. Tatiana Cucut**, akik a Genti Egyetemen lehetőséget biztosítottak a tömegspektrometriás mérések elvégzésére, nagyban hozzájárulva ezzel kutatásaim eredményességéhez.

Köszönöm **Hajósné Dr. Novák Márta** és **Dr. Szabó Erzsébet** opponensi munkáját házi védésem során, akik észrevételeikkel és tanácsaikkal hozzájárultak disszertációm végső formájának létrejöttéhez.

Végül, de nem utolsó sorban mérhetetlen köszönettel tartozom **Édesanyámnak** és **Édesapámnak** türelmükért, szülői és anyagi támogatásukért és, hogy mindvégig mellettem voltak. Köszönöm **Timinek** a testvéri támogatását és a hozzám való kitartó türelmét.