DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Totális herbiciddel szemben toleráns transzgénikus búza
(*Triticum aestivum* L.) élelmiszer-biztonsági kockázatainak vizsgálata

Nagy András

Budapest
2009

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: Dr. Fodor Péter,
egyetemi tanár, DSc
Budapesti Corvinus Egyetem

Témavezető: Dr. Gelencsér Éva
Főosztályvezető, címzetes egyetemi tanár, CSc
Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet
Élelmiszerbiztonsági Főosztály, Biológia Osztály

A doktori iskola- és a témavezető jóváhagyó aláírása:

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.

.....	.....
Dr. Fodor Péter	Dr. Gelencsér Éva
iskolavezető	témavezető

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2009. február 10-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke
Farkas József, MHAS, BCE

Tagjai
Mohácsiné Farkas Csilla, PhD, BCE
Horváth Erika, PhD**,** Campden & Chorleywood
Polgár Marianne, CSc, Heim Pál Gyermekkórház
Greiner Erika, CSc, OÉTI

Opponensek
Lásztity Radomir, DSc, BME
Kiss Erzsébet, CSc, SZIE

Titkár
Mohácsiné Farkas Csilla, PhD, BCE

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK **3**

JELÖLÉSEK ÉS RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE **6**

1. BEVEZETÉS **8**

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS **10**
2.1. Transzgénikus növények **10**
2.1.1. A transzgénikus növények csoportosítása 12
2.1.2. Az elsőgenerációs transzgénikus növények 13
2.1.2.1. Glifozát tolerancia 14
2.1.2.2. Glüfozinát tolerancia 15
2.1.3. Második és harmadik generációs transzgénikus növények 17
2.1.4. Transzgénikus növények előállítása 17
2.2. GM termények élelmiszer-biztonsági kockázatainak ismertetése **19**
2.2.1. Nemzetközi szervezetek szerepe a GM termények kockázatértékelési stratégiáiban 19
2.2.2. Genetikailag módosított fajták kockázat-becslésének integrált megközelítése 20
2.2.2.1. A szülői vonal jellemzése 21
2.2.2.2. A donor, a transzgén(ek) és a transzformáció jellemzői 21
2.2.2.3. Az expressziós vektor általános jellemzése 22
2.2.2.4. A géntermék jellemzése 25
2.2.2.5. Géntermék toxicitásának vizsgálata 26
2.2.2.6. Allergén kockázat jellemzése 26
2.2.2.7. A GM növény jellemzése 29
2.3. Búza allergén fehérjéi **30**
2.4. WGA marker fehérje jellemzése **33**

3. CÉLKITŰZÉSEK **34**

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK **35**
4.1. Anyagok **35**
4.1.1. Búzaminták 35
4.1.2. Oldatok és reagensek DNS izoláláshoz 36
4.1.3. Oldatok és reagensek a polimeráz láncreakcióhoz és a termékanalízishez 36
4.1.4. Oldatok és reagensek ELISA-hoz 36
4.1.5. Oldatok és reagensek gélelektroforézishez 37
4.1.6. Oldatok és reagensek immunblotthoz 38
4.1.7. Egyéb anyagok, reagensek 39
4.2. Módszerek **40**
4.2.1. Transzgénikus búzaminták előállítása 40
4.2.2. Génmódosítás tényének igazolása PCR technikával 41
4.2.2.1. DNS kivonás és tisztítás 41
4.2.2.2. DNS sokszorozás 41
4.2.2.3. Termékanalízis 41
4.2.3. Beltartalmi paraméterek meghatározása 42
4.2.4. Aminosav összetétel meghatározása 42
4.2.5. Búzaminták oldhatóság szerinti frakcionálása 43
4.2.6. Elektroforetikus fehérje elválasztás 43
4.2.6.1. Fehérjék elválasztása SDS-PAGE-val 43
4.2.6.2. Fehérjék elválasztás Natív PAGE-val 43

4.2.6.3. Fehérjék elválasztása savas PAGE-val 43
4.2.6.4. α-amiláz-inhibitor vizsgálata natív gélelektroforézist követően 44
4.2.7. Ellenanyagra alapozott immunanalitikai módszerek 44
4.2.7.1. Antigén–specifikus poliklonális ellenanyag előállítása 44
4.2.7.2. Indirekt ELISA poliklonális ellenanyag munkahígításának megállapítására 45
4.2.7.3. Szendvics ELISA a PAT-fehérje kvantitatív meghatározására 45
4.2.7.4. Kompetitív ELISA WGA tartalom meghatározására 46
4.2.7.5. Kompetitív ELISA gliadin tartalom meghatározására 46
4.2.7.6. Immunblot analízis búza egyes allergén komponenseinek azonosítására 46
4.2.8. Amiláz aktivitás meghatározása 47
4.2.9. Marker fehérjék tápcsatorna rezisztencia vizsgálata 47
4.2.9.1. Membránon történő *in vitro* pepszines emésztés 47
4.2.9.2. Marker fehérjék tápcsatornában történő túlélésének vizsgálata akut patkánykísérletben 48
4.2.9.3. Biológiai minták előkészítése 49
4.2.9.4. A tápcsatornában túlélt WGA és PAT fehérje kvantitatív meghatározása 49
4.2.10. A búza fehérje biológiai értékének meghatározása 49
4.2.10.1. A fehérje tápértékének meghatározása *in vitro* módszerrel 49
4.2.10.2. Fehérje hasznosulás vizsgálata növekedésben lévő patkányok nitrogén-egyensúlyi kísérletében 50
4.2.11. Statisztikai kiértékelés 52

5. KUTATÁSI EREDMÉNYEK 54

5.1. A szülői búza és a genetikai módosítás jellemzése 54
5.1.1. A szülői búza genotípus kiválasztása 54
5.1.2. A transzformáció jellemzése 55
5.1.3. A *bar* gén kifejeződésének vizsgálata tenyészkerti körülmények között 55
5.1.4. A *bar* gén jelenlétének kimutatása PCR technikával 56
5.1.5. A herbicid toleráns búza terméshozamának vizsgálata a tenyészkerti kísérletben 57
5.1.6. A *bar* gén által expresszált fehérje jellemzése 58
5.2. Komponens összetétel vizsgálata 60
5.3. Marker fehérjékben bekövetkezett változások vizsgálata 62
5.3.1. A só- és vízoldható fehérjefrakciók vizsgálata 63
5.3.2. WGA tartalom vizsgálata 64
5.3.3. α-amiláz inhibitor aktivitása 66
5.3.4. Amiláz aktivitás 69
5.3.5. Szerpin 73
5.3.6. Gliadin 73
5.4. Marker fehérjék tápcsatorna rezisztenciájának vizsgálata 77
5.4.1. WGA *in vitro* pepszin rezisztencia vizsgálata immunblott technikával 78
5.4.2. PAT enzim és WGA túlélésének vizsgálata akut patkánykísérletben 79
5.5. A szülői és transzgénikus vonal fehérje hasznosulásának vizsgálata 81
5.5.1. A fehérje tápértékének meghatározása *in vitro* módszerrel 81
5.5.2. Fehérjehasznosulás vizsgálata nitrogén-egyensúlyi kísérletekben 83
5.6. Új tudományos eredmények 88

6. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK 90

7. ÖSSZEFOGLALÁS 92

8. SUMMARY 94

9. MELLÉKLETEK 96
M1. Irodalomjegyzék 96
M2. Szülői és transzgénikus vonalak beltartalmi adatai 109
M3. A fehérje tartalom statisztikai értékelése 110
M4. WGA tartalom eredményeinek statisztikai kiértékelése 114
M5. α-amiláz aktivitás eredményeinek statisztikai kiértékelése 118
M6. Összamiláz aktivitás eredményeinek statisztikai kiértékelése 122
M7. Gliadin tartalom eredményeinek statisztikai kiértékelése 126
M8. Szülői és transzgénikus vonalak aminosav összetételi adatai 130

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 132

JELÖLÉSEK ÉS RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Rövidítés, jelölés	**Angol név**	**Magyar név**
A-PAGE	Acid Polyacryalmide Gel Electrophoresis	Savas poliakrilamid gélelektroforézis
BSA	Bovine Serum Albumine	Borjú szérum albumin
BV	Biological Value	Biológiai Érték
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus	Karfiol mozaik vírus
CS	Chemical Score	*In vitro* Tápértékindex
DNS DNA	Deoxyribonucleic Acid	Dezoxiribonukleinsav
DNSA	Dinitro Salycilic Acid	Dinitro szalicilsav
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid	Etiléndiamin-tetraecetsav
EFSA	European Food Safety Authority	Európai Élelmiszer-biztonsági Hatóság
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	Enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálatok
FAO	Food and Agriculture Organization	Élelmezési és Mezőgazdasági Szervezet
FDA	Food and Drug Administration	Gyógyszer- és Élelmiszerellenőrző Hatóság
GC	Guanin:Cytosine	Guanin:Citozin
GM	Genetically Modified	Genetikailag módosított
GMO	Genetically Modified Organisms	Genetikailag módosított organizmus
HRPO	Horseradish Peroxidaase	Torma-peroxidáz
IgA, IgE, IgG	Immunoglobulin IgA, IgE, IgG	IgA, IgE, IgG ellenanyagok
MHC	Major Histocompatibility Complex	Fő hisztokompatibilitási génkomplex
NPR	Net Protein Ratio	Nettó fehérjearány
NPU	Net Protein Utilization	Nettó fehérjehasznosulás

Rövidítés, jelölés	**Angol név**	**Magyar név**
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development	Gazdasági Együttmükődési és Fejlesztési Szervezet
PAGE	Polyacryalmide Gel Electrophoresis	Poliakrilamid-gélelektroforézis
PAT	Phosphinotricin Acetyl Transferase	Foszfinotricin acetil transzferáz
PBS	Phosphate Buffered Saline	Foszfát pufferolt fiziológiás sóoldat
PCR	Polymerase Chain Reaction	Polimeráz láncreakció
PMSF	Phenyl Methyl Sulphonil Fluorid	Fenil-metil-szulfonil-fluorid
ppt	Phosphinothricin	Foszfinotricin
RNS/ RNA	Ribonucleic Acid	Ribonukleinsav
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate	Nátrium-dodecil-szulfát
TD	True Digestibility	Valódi emészthetőség
Tween-20	Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate	Polioxietilén-szorbitán-monolaurát
OPD	o-Phenylenediamine Dihydrochloride	o-fenilén-diamin dihidroklorid
WGA	Wheat Germ Agglutinin	Búzacsíra agglutinin
WHO	World Health Organization	Világ Egészségügyi Szervezet
Wizard		DNS izolálási kit

1. BEVEZETÉS

A géntechnológia egyre bővülő eszközrendszere lehetővé tette az emberiség számára, hogy átlépje a mikroorganizmusok, növények, állatok és akár az emberek közötti genetikai határokat, és a géntranszfer révén olyan növényeket, majd állatokat hozzon létre, amelyeket hagyományos nemesítési módszerekkel nem lehet előállítani. A cél minden esetben az emberiség számára valamilyen szempontból – növényvédelmi, élelmiszeripari, gyógyászati, stb. – hasznos szervezet előállítása. Az elért eredmények tárháza egyre szélesedik, különösen a növények esetében értek el igen jelentős gyakorlati eredményeket. Az abiotikus és biotikus stresszrezisztens első, és a táplálkozási célokat szolgáló második generációs genetikailag módosított (GM) növények után kifejlesztették a „bioreaktorként" használatos harmadik generációs GM növényeket. Miközben a tengerentúli országokban amellett, hogy egyre több GM növény kerül köztermesztésre, a GM növények termőterülete is évről évre rohamosan növekszik, addig az Európai Unió országai megosztottak a GM növények termesztése, valamint élelmiszerként és takarmányként történő felhasználását illetően.

Az EU engedélyezte a GM alapú élelmiszerek forgalmazását azzal a kikötéssel, hogy a 0,9%-nál magasabb GMO tartalom felett az élelmiszert jelölni kell (1830/2003 EK rendelet). A GM fajták termeszthetőségének helyzete azonban alapjaiban megváltozott 2004-ben, az Európai Tanács ugyanis feloldotta az évek óta tartó moratóriumot, amely megtiltotta a GM fajták termeszthetőségét az Unióban. A GMO-val kapcsolatos hazai szabályozás nagyrészt megfelel az EU jelenleg hatályos rendeleteinek és ajánlásainak (1829/2003 EK rendelet), azonban a termesztéssel kapcsolatosan lényegesen szigorúbb elveket vall. Hazánkban a GM növények termesztése tilos, kísérleti termesztése, vetőmagként, új takarmányként, takarmány adalékként, új élelmiszerként történő felhasználása pedig a géntechnológiai tevékenységről szóló 1998. évi XXVII. törvény szerint engedélyhez kötött.

A GM növények élelmiszerként történő biztonságos felhasználásával kapcsolatosan nem áll rendelkezésre tudományosan megalapozott információ, termesztése, felhasználása ugyanis felvetett néhány toxikológiai és allergológiai kérdést. Az EU kiemelten fontosnak tartja az ún. lényegi egyenértékűség (substantial equivalence) vizsgálatát, amelynek során a fogyasztási szempontból biztonságosnak tartott szülői növény és a GM növény közötti komponenseinek egyenértékűségét vagy az élelmiszer-biztonsági vagy táplálkozási szempontból kockázatot jelentő komponensekben történő különbséget keresik. Az élelmiszerek összetetségét figyelembe véve, azonban gazdaságtalan és megvalósíthatatlan célkitűzés lenne minden egyes alkotót megvizsgálni, amelyek többsége

biztonsággal fogyasztható, ezért az egyes növények, táplálkozási, antinutritív vagy toxikus hatás szempontjából kiválasztott összetevőit az OECD konszenzus dokumentumokban foglalja össze.

Témaválasztásomat az indokolja, hogy a genetikailag módosított növények élelmiszer-biztonsági megítélése nem egységes, erre vonatkozóan nem áll rendelkezésre elegendő tudományos eredmény. Mindemellett az is kérdés, hogy mennyi ideig tarthatja fenn hazánk azt az álláspontot, hogy megtiltja a GMO-k köztermesztésbe vonását.

Összehasonlító vizsgálatokat végeztem hat, totális herbiciddel szemben toleráns búzavonal és a nem-transzgénikus kontroll tavaszi búza lényegi egyenértékűségének meghatározására. Megvizsgáltam, hogy a GM technológia, az évjárat és a herbicid kezelések hatására történik-e változás az általam választott marker fehérjékben. Vizsgáltam az újonnan expresszált fehérje és egy potenciális allergénként azonosított, szelektált marker fehérje tápcsatorna rezisztenciáját, valamint rövidtávú patkány etetési modellben összehasonlító mérések történtek annak kimutatására, hogy a fehérjék szintjén bekövetkezett változások hatással vannak-e a fehérjehasznosulásra.

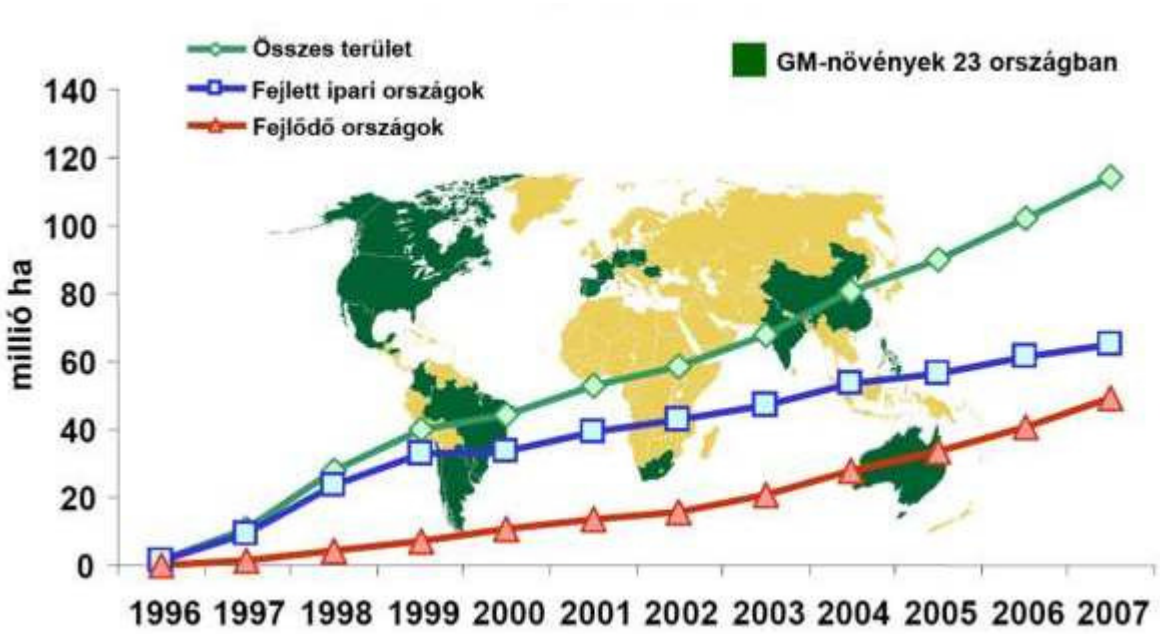
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Transzgénikus növények

A növények számos tulajdonságukban különbözhetnek egymástól. Még egy fajon belül sem létezik két teljesen azonos növény, így a fenotípusosan egyező növények esetében is sok esetben előfordul genetikai különbözőség. Ezek a fajon belül megfigyelhető különbözőségek adódhatnak a környezeti tényezők által létrehozott variabilitásból, illetve az öröklődő okok miatt bekövetkező változatosságból. A növényegyedek között környezeti tényezők hatására bekövetkező környezeti variációk általában méretben, alakban, színben, beltartalomban jelentkeznek. A növénynemesítés éppen ezt a fajta változatosságot használja ki, és különböző módszerekkel kiemeli, szelektálja a különböző tulajdonságokkal rendelkező növényegyedek közül a nemesítő számára legkedvezőbb tulajdonságokkal rendelkezőket. A genetikailag azonos növényfajtákban különböző környezeti stressz hatására létrejövő variációk azonban nem öröklődnek, és így szelekcióval nem izolálhatók. Az öröklődő variációkat genetikai jelenségek hozzák létre. Ilyen variációk jelentkezhetnek könnyen megfigyelhető tulajdonságokban (pl. szemszín, endospermium típus, toklász jelenléte vagy hiánya), és összetett jellegekben (érés, betegségrezisztencia) egyaránt. Ezek a variációk a vizsgált növények utódjai között is megfigyelhetők, de kifejeződésük mértéke a környezettől függően változhat. A környezeti és örökletes variációkat kiváltó tényezők legtöbbször együttesen hatnak a növényre. (HAJÓSNÉ-NOVÁK 1999).

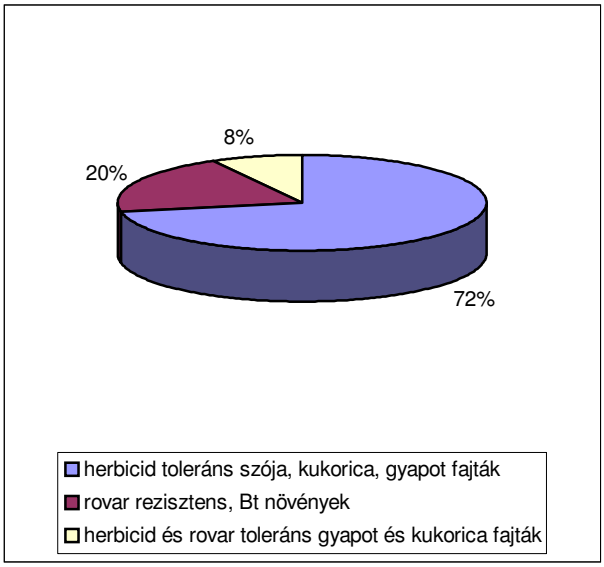
A gének természetes mutációja és rekombinációja során szerzett tapasztalatok képessé tették a termesztőket arra, hogy a legjobb termesztési tulajdonsággal és minőséggel rendelkező növényeket kiszelektálják. A hagyományos nemesítési módszerek, valamint a velük előállítható növénykombinációk, genetikai határa végesnek látszik. Forradalmi változást ezen a téren a géntechnológia jelentette, amely eszközrendszere lehetőséget teremtett a különböző fajok közötti horizontális rekombinációra, megsokszorozva ezáltal a létrehozható fajták számát (HESZKY & GALLI 2008). A transzgénikus növények (GM növények) előállításával lehetőség nyílt olyan növények előállítására, amely olyan plusz információval, tulajdonsággal rendelkezik, amellyel a kiindulási faj, fajta hagyományos nemesítési módszerek alkalmazása esetén nem rendelkezhetett volna. Amennyiben ez az információ olyan tulajdonságot eredményez a növénynek, amely az emberiség számára hasznos, akkor ennek az eredménynek óriási gyakorlati jelentősége van. A humán genom program párhuzamos kivitelezésével, a genomikai, proteomikai és metabolomikai kutatások megindulásával lehetővé vált az agronómiai viselkedés és a fenotípusos megjelenés jobb megértése. Az *in vitro* DNS technikák alkalmazása lehetővé tette egy adott gén transzformációját

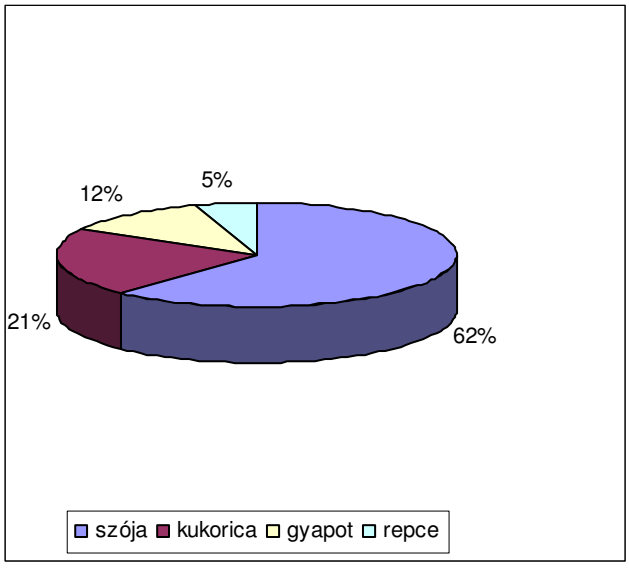
egy közeli vagy távoli fajból a másik fajba. Így, lehetővé vált a nemkívánatos fajták kontraszelekciója, illetve a nemkívánatos tulajdonság eliminációja (pl. allergének) (GIANESSI & CARPENTER 2001). Az első transzgénikus növényt, amely kanamicin (antibiotikum) rezisztenciával rendelkezett 1982-ben állították elő, melyet számos, gazdaságilag jelentős gént tartalmazó fajta (rovar- herbicid) követett (HERRERA-ESTRELLA et al. 1983, VAECK et al. 1987). Az első transzgénikus fajta a későn puhuló (Flavr-Savr) paradicsom volt, amely 1994-ben jelent meg az USA piacán (KRAMER & REDENBAUGH 1994). A különböző módszerekkel előállított és szántóföldi körülmények között vizsgált GM növények száma folyamatosan növekszik. A genetikai módosítással előállított növényeknek (GM növények) azonban csak egy kis hányada került köztermesztésbe és kereskedelmi forgalomba. A köztermesztésbe került GM növényfajták vetésterülete nagy gyorsasággal növekedett az elmúlt 12 évben és 2007-ben már elérte a 114 millió hektárt (1. ábra).



1. ábra: A köztermesztésben lévő transzgénikus növények termőterületi megoszlása 1996-2007 (ISAAA 2007)

A köztermesztésben lévő transzgénikus növények – elsősorban szója, kukorica, gyapot és repce - megoszlására jellemző (2. ábra), hogy legnagyobbrészt, több mint 70%-ban herbicidtoleráns fajták, mintegy 20%-ban rovarrezisztensek, valamint 8%-ban mindkét tulajdonságot hordozzák.





2. ábra: A köztermesztésben lévő transzgénikus növények megoszlása 2004-ben (JAMES 2004)

2.1.1. A transzgénikus növények csoportosítása

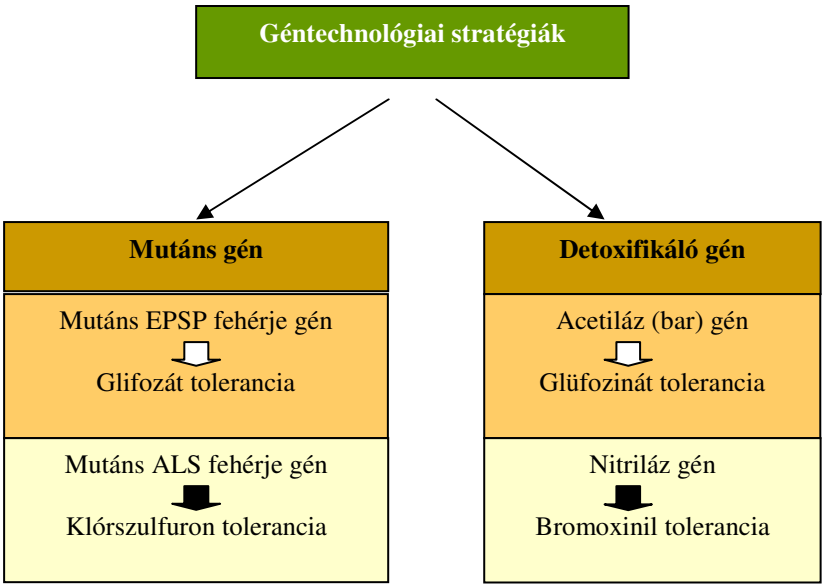
Genetikailag módosított növények azok, amelyeket a géntechnológia különböző módszereivel állítottak elő, és amelyek a módosítás eredményeként saját vagy más élőlényekből származó természetes vagy mesterséges (szintetizált) gént, géneket, valamint az ezek működéséhez szükséges szekvenciákat tartalmazzák. A világon előállított transzgénikus növényeket gazdasági szempontból három fő csoportba oszthatjuk:

1. Az elsőgenerációs transzgénikus növények közé a különböző abiotikus és biotikus stresszekkel szemben rezisztens transzgénikus növények tartoznak,
2. A második generációs növények csoportjába a növekedésben, fejlődésben valamint az anyagcserében módosított GM növényeket soroljuk,
3. A harmadik generációs növények előállításának célja pedig olyan „bioreaktor növények" létrehozása, amelyek speciális, különböző helyeken – gyógyszeriparban, élelmiszeriparban – felhasználható anyagokat (pl. antigének, fehérjék) termelnek. De ide tartoznak az ún. terminátor génnel transzformált növények is, amelyek esetében a transzgén expressziója specifikus promóterekkel szabályozott.

2.1.2. Az elsőgenerációs transzgénikus növények

Az első generációs GM növények előállítása főként agronómiai és környezetvédelmi célt szolgál (pl. növényvédőszer felhasználás csökkentése) és csak közvetetten képviselik a fogyasztók érdekeit. A genetikai módosítások célja a növényi kártevőknek ellenálló biotikus rezisztencia (gomba-, vírus-, baktérium- és rovar-rezisztencia), illetve a növényvédőszer-tolarencia kialakítása.

A totális gyomirtókkal szembeni tolerancia létrehozásának főbb stratégiái a mutáns vagy idegen eredetű génre alapozott, illetve a detoxifikáló génre alapozott stratégia (3. ábra).



3. ábra: A transzgénikus herbicid tolerancia kialakításának fontosabb géntechnológiai megközelítései (DUDITS & HESZKY 2003)

A herbicidtoleráns transzgénikus növények előállításának két gyakorlatban is alkalmazott módszere:

- ⇨ A károsított fehérje aminosav sorrendjének megváltoztatása (mutáns gén) révén a fehérje-hatóanyag kapcsolódásának megakadályozása,
- ⇨ A herbicid hatóanyagának kémiai módosításával (detoxifikáló gén) szintén megakadályozható a megfelelő fehérje és a hatóanyag közötti kapcsolat létrejöttét.

A mutáns génre alapozott stratégiát többek között a glifozát és klórszulfon típusú herbicidek esetén fejlesztettek ki. A herbicid hatóanyag által megtámadott enzim génjében olyan mutációkat alakítottak ki, amely a mutáns génről szintetizálódó enzim fehérjéiben aminosav cseréket eredményez, amelyeknek hatására a hatóanyag nem tud hozzákapcsolódni. A glifozát rezisztencia

létrehozása során mutáns EPSP (enolpiruvil-sikimin-3-foszfát) génnel történő transzformációt követően a növények 2-4-szeres Roundup (Monsanto) adaggal szemben is ellenállónak mutatkoztak (SHAH et al. 1986). A klórszulfuron rezisztencia kialakítását pedig a DuPont cég által szabadalmaztatott mutáns ALS gén bevitelével tudták elérni. A szulfonilurea típusú herbicidek ugyanis nem képesek kapcsolódni az acetolaktát-szintáz (ALS) enzimhez. Mutáns ALS gént hordozó növények akár 10-szeres vegyszerdózisnak is ellenálltak (HAUGHN et al. 1988.). Hátránya ennek a módszernek, hogy a toleranciát kiváltó mutációk a gyomokban is kialakulhatnak, így azok is rezisztenssé válthatnak.

A detoxifikáló génre alapozott stratégia - amelyet a glüfozinát (pl. foszfinotricin) és bromoxynil hatóanyagú herbicidekre dolgoztak ki – lényege, hogy a növényt olyan enzim génjével transzformálják, amely enzim képes hatástalanítani a herbicid hatóanyagát. A tolerancia mechanizmusa, hogy a permetezést követően a növény sejtjeibe jutó hatóanyagot ez az új enzim olyan formává alakítja, amely már nem tud a célfehérjéhez kapcsolódni, így a sejt anyagcseréje nem károsodik.

Az általunk is vizsgált foszfinotricin (*ppt*) rezisztencia esetében nem a kulcsenzim (glutamin-szintáz) megváltoztatása a cél, hanem egy bakteriális génnel (*bar*) történő transzformáció, amely a foszfinotricin-acetiltranszferáz (PAT) enzimet kódolja. Az enzim acetilálja és inaktiválja a foszfinotricint. A transzformáns növények így képesek elbontani a herbicid hatóanyagát (STALKER et al. 1988.).

2.1.2.1. Glifozát tolerancia

A totális herbicidek, mint pl. glifozáttal és parakvattal szembeni rezisztenciát hordozó gén a növényi populációban igen ritkán fordul elő, ezért a tolerancia kialakulása ebben az esetben hosszú időt vesz igénybe. Ennek ellenére a két herbicid közötti rotáció fenntartását javasolják. A herbicid technológia főleg akkor sikeres, ha a kultúrnövény késői magvetése lehetővé teszi a totális gyomirtószerek használatát, ha a megnövelt magvetés elnyomja a gyomok fejlődését, megfelelő a gyomtalanítás, a vetésforgó használata legalább kétévente lehetővé teszi a teljes gyomtalanítást. A kultúrnövény genetikai állományát úgy módosították, hogy az a totális herbiciddel szembeni rezisztenciagént hordozza, mint pl. Roundup, Liberty herbicidtoleráns repcéje esetében (POWLES 2000).

A mutáns génre alapozott technológiával állítják elő többek között a glifozát típusú herbicid rezisztens növényeket is. A glifozát (N-foszfonometil-glicin) totális gyomírtószer, amelynek hatóanyaga az aromás aminosavak bioszintézisét állítja le a kloroplasztiszban azáltal, hogy gátolja az EPSP - szintáz működését. Az enzim gátlásának következménye az aromás aminosavak

termelődésének hiánya, amely a sejtben a fehérjeszintézis leállásához, majd a növény elpusztulásához vezet. Az első glifozát transzgénikus növény Roundup Ready szója (Monsanto) volt, amely 1995-ben került köztermesztésbe az USA-ban.

2.1.2.2. Glüfozinát tolerancia

A glüfozinát ammónium (foszfinotricin-ppt) a glutamin szintáz kompetitív inhibitora a növényi sejtekben (DONN et al. 1984). Magyarországon több vegyszergyártó cég is forgalmaz ppt típusú gyomírtószert (FINALE 14 SL, BASTA). Ez a totális herbicid a gyomnövények széles spektrumánál hatékony. A zöld növényi szövettel érintkezésben fejti ki hatását, ún. 'post-emergence' típusú gyomirtószer. Irreverzibilisen gátolja a glutaminszintézist, a glutaminnak glutaminsavból és ammóniából történő képződését, amely a növény pusztulásához vezet, részben a fehérjeszintézishez szükséges glutaminsav csoportba tartozó aminosavak hiánya, részben a sejtben felhalmozódó ammónia mérgező hatása következtében. A glüfozinát toleráns növényekbe bevitt *bar* gén expressziós terméke a PAT (Phosphinotricin acetyl transpherase) enzim, amely a transzgénikus növényekben kifejezésre jut. A PAT enzim, melynek szubsztrátja a ppt, acetyl-CoA jelenlétében a ppt szabad amino-csoportjának acetilezésével a herbicid inaktiválását végzi. Az enzim által lebontott herbicid így nem gátolja a glutamin szintáz szabad működését a növényben, és a sejt életben marad. Az első glüfozinát ammónium toleráns fajta az AgrEvo (Aventis, Bayer) Libertylink repcéje volt, mely 1996-ban került köztermesztésbe az USA-ban. A herbicid toleranciát szántóföldi körülmények között tesztelve bebizonyosodott, hogy a GM növények a normál dózis többszörösét is elviselik károsodás nélkül. Gyakori, vagy nagy adagban történő permetezésnél glüfozináttal szembeni rezisztencia csökkenését észlelték (METZ et al. 1998).

Mivel a PAT-enzim, amely a glutamin szintézis útért felelős, az élő szervezetek többségében megtálalható, ezért a ppt sem a vízben, sem a növényben nem akkumulálódik. Kedvező toxikológiai profilja réven biztonságos a felhasználó szempontjából.

A PAT fehérje SDS-PAGE szeparálása során a *bar* gén termékeket 22-23 kDa-os molekulatömeggel jellemezték, míg gélszűréssel egy 43 kDa-os homodimert sikerült PAT fehérjével azonosítani. A PAT enzim expressziós szintje a növényi fehérjére vonatkoztatva rendkívül alacsony, alig éri el a 0,01%-ot. A minimális PAT expresszió szintje -ami még toleranciát vált ki- 0,001% az összfehérje százalékában (HESZKY et al. 2005). A PAT fehérje ugyanakkor nem ismert allergén fehérjeként (OECD 1999). Az adatbázisokban található, ismert allergénekre, toxinokra jellemző DNS szekvenciákkal a PAT enzimet kódoló *bar* gén nem mutat homológiát (HEROUET et al. 2005).

A *pat* gén által expresszált PAT-fehérje erős homológiát mutat a *bar* gén által expresszált PAT-fehérjével. A *bar* gént *Streptomyces hygroscopicus*-ból izolálták, míg a *pat* gént *Streptomyces viridochromogenes*-ből. WEHRMANN és munkatársai (1996) a két gén által expresszált PAT-fehérje aminosavszekvenciáját vizsgálva 85%-os azonosságot mutatott ki. HEROUET és munkatársai (2005) szintén erős homológiát találtak a két gén által termelt fehérjében. A *pat* gén által termelt PAT-fehérjére specifikus ellenanyagok ezért keresztreagálnak a *bar* gén által termelt PAT-fehérjével.

A PAT fehérje hőstabilitásának vizsgálatakor mindkét gén által termelt fehérje 90 °C-on, 1 órán keresztül tartó hőkezelés hatására is kimutatható volt, és nem mutatott fehérje degradációt SDS gélelektroforézist követően, ugyanakkor az anti-PAT ellenanyag ugyanolyan mértékben ismerte fel a hőkezelt és kezeletlen PAT fehérjét, bizonyítva, hogy a denaturáció okozta konformációs változások nem voltak hatással az epitopok hozzáférhetőségére. Más kutatók a PAT-fehérje aktivitását vizsgálták hőkezelés hatására. 40 °C-on, 15 percig tartó hőkezelés hatására aktivitás csökkenést tapasztaltak, míg 60 °C-on történő hőkezelés hatására a PAT enzim aktivitását teljesen elvesztette (WEHRMANN et al. 1996). A kutatási eredmények azt mutatták, hogy amíg hőkezelés hatására a denaturáció által okozott konformációs változások nem voltak hatással az epitopok hozzáférhetőségére, addig a PAT-fehérje aktivitását elvesztette. Ugyanezen szerzők beszámolnak arról, hogy a PAT-fehérjék a gyomrot reprezentáló *in vitro* gyomornedv (simulated gastric fluid - SGF pH 2) és bélfolyadék (simulated intestinal fluid – SIF pH 7,5) hatására egy percen belül elbomlanak.

A PAT enzim toxikológiai vizsgálatakor nem találtak kedvezőtlen hatást az egerekbe intravénásan 10 mg/kg testtömeg PAT fehérje bejuttatása után 2 hetes állatkísérletben vizsgálva (HEROUET et al. 2005).

A ppt-toleráns transzgénikus növények biológiai biztonságára irányuló állatetetési kísérletek eredményei nem mutattak jelentős eltérést a nem-transzgénikus kontroll növény etetésével kapott eredményektől. (AULRICH et al. 2002, AUMAITRE et al. 2002, BRAKE et al. 2003, FLACHOWSKY et al. 2000). A szerzők azonban figyelmeztetnek a herbiciddel kezelt növények fogyasztási biztonsági vizsgálatának szükségességére.

2.1.3. Második és harmadik generációs transzgénikus növények

Amíg az első generációs GM növények elsősorban agronómiai és környezetvédelmi célokat szolgálnak, addig a második generációs fejlesztések nagyrészt az élelmiszer-, kozmetikai- és egyéb iparágak (pl. transz-zsírsavakban dús szója- és repceolaj, A-provitaminban dús „aranyrizs", keményítőben módosított burgonya) igényeit igyekeznek kielégíteni (VISSER & JACOBSEN 1993, VOELKER 1996). A megváltoztatott tápértékű és érzékszervi tulajdonságokkal rendelkező gabonafélék és zöldségek már a fogyasztók számára is kínáltak előnyös tulajdonságokat. Kedvezőbb beltartalmi értékű, jobb ízű, nagyobb esszenciális zsírsavtartalmú vagy hosszabb eltarthatósági idejű termékek jelentek meg a piacon. Fontos fejlesztések történtek az elsődleges anyagcsere folyamatok, fehérje, szénhidrát és zsírsav bioszintézisben, illetve az érés folyamatainak befolyásolásában is.

A harmadik generációs GM növényeket elsősorban, mint bioreaktorokat használják fel a speciális molekulák előállítására, főleg a gyógyszeripar, műanyagipar számára. Gyógyszeripari alapanyagok termelésére (pl. humán-szérum albumin, interferon, hirudin), ipari enzimek termelésére (pl. fitáz, α-amiláz) és diagnosztikumok termelésére (pl. avidin, β-glükorodináz) is fejlesztettek ki GM növényeket. Egy másik felhasználási területe a harmadik generációs GM növényeknek az „ehető" vakcinák termeltetése (HESZKY et al. 2005). A GM növények ún. ehető vakcinákat termelnek, ami azt jelenti, hogy a GM növényt közvetlenül elfogyasztva, az emésztőrendszer nyálkahártyáján keresztül is képes a megfelelő immunválaszt kiváltani (MALIGA et al. 2003). Fejlesztések történtek a *Hepatitis* B vírus felületi antigénjének termeltetésére burgonyában, kukoricában, illetve bakteriális enterotoxinok termeltetésére burgonyában, paradicsomban, banánban és Anthrax elleni vakcina termeltetésére is növényi kloroplasztiszban.

2.1.4. Transzgénikus növények előállítása

A transzgénikus növényfajták előállításának első lépése a kívánt tulajdonságot hordozó gén(ek) azonosítása, kivágása a donor szervezet genomjából és klónozással olyan nagyságrendre történő felszaporítása, amely révén sikeresen elvégezhető a transzformáció. Ehhez az adott DNS szakaszt ún. vektorba (pl. plazmid, vírus) kell építeni, amely révén egy bakteriális gazdasejtben is képes replikálódni. Ezt követően a felszaporított gént olyan expressziós vektorba kell építeni, amely lehetővé teszi a recipiens növénybe történő integrálódás mellett azt is, hogy az működni és öröklődni is tudjon. Az expressziós vektornak feltétlenül tartalmaznia kell a gazdaságilag jelentős gén mellett annak működéséhez szükséges promotert és terminátor szekvenciákat is. A vektor emellett még tartalmazhat számos egyéb szekvenciát is, így a transzformált sejtek szelekcióját

lehetővé tevő markergén mellett a gén működéséről információt adó riporter gént is. Az újabb fejlesztésű GM növényekben gyakran alkalmaznak célbajuttató szekvenciákat, amelyek segítségével lehetővé válik, hogy a transzgén expressziója csak a kívánt szervben vagy szövetben következzék be. Emellett gyakran használnak intronokat, amellyek segítségével a növényekre jellemző GC-tartalmat beállítják, és megakadályozzák, hogy a transzgén a baktériumban is működjön.

A transzgénikus növények előállításának következő, igen fontos lépése a géntranszfer, amely során az expressziós vektort közvetlen (direkt) vagy közvetett (indirekt) módszerrel a recipiens növény sejtjébe juttatják. A napjainkban használatos transzformációs módszerek hátránya, hogy a gén belövés random, esetleg több kópiaszámban történő integrációra is lehet számítani, és előfordulhat a beépítendő DNS újrarendeződése, illetve kisebb DNS szakaszok beépülése egy másik pozícióba.

Idegen gének bejuttatására az egyszikűeknél hosszú ideig a protoplaszt technika ígérkezett a leghatékonyabb eljárásnak. Az első búza transzformációs irodalmi adatok a polietilén-glikollal (PEG) közvetített génbevitelről számoltak be (VASIL et al. 1991, MARSAN et al. 1993). A protoplasztok izolálásán és PEG kezelésén túl az eljárást az is nehezíti, hogy a protoplaszt eredetű kalluszokból a fertilis növényregenerálás alacsony gyakoriságú, ill. genotípushoz kötött (PAUK et al. 1994). A gének mesterséges bejuttatására módszertani szempontból nagy jelentőségű volt a Cornell Egyetemen kifejlesztett részecskebelövő berendezés (SANFORD 1988), népszerű nevén génpuska. Két különböző eredetű (*Streptomyces hygroscopicus* - bar, *Escherichia coli* - uidA) mikrobiális gént jutattak be búzába, amelyek jelenlétét és működését hitelesen bizonyították. A transzformációs eredményt VASIL et al. (1991), NEHRA et al. (1994) és BECKER et al. (1994) is sikeresen megismételték, kisebb módszertani fejlesztéseket közölve. Valamennyi idézett eredményben közös vonás, hogy *bar* herbicidrezisztenciát kódoló gént jutattak be búzába. Ezt a gént - mint marker gént - növénytranszformációkban ma már széles körben használják különböző foszfinotricin (*ppt*) hatóanyagú szelekciós rendszerekben.

A transzformációt követően a markergének segítségével válik lehetővé, hogy kiszelektálják a sikeresen transzformált sejteket a kezelt sejtpopulációból. Markergénként különösen az első GM növények esetében antibiotikus rezisztencia géneket használtak, amelyek segítségével az adott antibiotikumot tartalmazó táptalajon könnyen kiszelektálhatók az antibiotikum-rezisztencia gént tartalmazó GM fajták. Hátránya miatt –igen könnyen az adott növényt elfogyasztó emberi, állati szervezet is rezisztenssé vált az adott antibiotikummal szemben – azonban ezen növények termesztését, forgalomba hozatalát, valamint az antibiotikum-rezisztencia gént tartalmazó fajták előállítását betiltották.

A következő lépés a kiszelektált és sikerrel transzformált sejtekből történő növényregenerálás, kifejlett egyedek felnevelése, amely a transzgénikus fajta-előállítás egyik legnehezebb lépése. A

kallusz-tenyészetekben spontán mutációk expresszálódása eredményeként (szomaklonális variabilitás) felléphet genominstabilitás, az azonos szülői egyedek között kialakulhatnak mennyiségi és minőségi tulajdonságbeli különbségek.

A sejtek *in vitro* transzformációja akkor tekinthető sikeresnek, ha bizonyítani tudjuk, hogy a GM növényben a transzgén jelen van, expresszálódik és ivaros úton öröklődik is. A transzgén integráció bizonyítható DNS/RNS (pl. PCR, Southern-, illetve Northern-hibridizáció), illetve fehérje-módszerekkel (pl. ELISA, Western-hibridizáció).

Ezt követően történik klasszikus nemesítési módszerekkel a GM fajták előállítása.

2.2. GM termények élelmiszer-biztonsági kockázatainak ismertetése

2.2.1. Nemzetközi szervezetek szerepe a GM termények kockázatértékelési stratégiáiban

A géntechnológia alkalmazása számos élelmiszer-biztonsági kérdést felvet. Új törvényi szabályozás vált szükségessé, illetve olyan fejlesztési, vizsgálati módszertani útmutatók kidolgozása, amely a GMO felhasználásának várható előnyei mellett azok környezeti és élelmiszer-biztonsági kockázatát minimálissá teszik. A hagyományos kockázat-becslési stratégiák a lehetséges káros hatást kiváltó veszélyforrás azonosításán és a kockázat emberekre, valamint a környezetre vonatkozó lehetséges következményeinek jellemzésén alapulnak. Ez utóbbit dózisfüggő toxikológiai kísérletekben és epidemiológiai felmérésekben vizsgálják. Míg a toxikus komponens esetében várható terhelés 50-100-szoros szintje is beépíthető a dózisfüggő diétába, addig a GM növények vizsgálatánál ilyen dózisok a tápanyag egyensúly megbomlását eredményeznék. Alacsonyabb dózisterhelés mellett viszont a potenciális veszély mértéke nem mérhető biztonsággal. Felismerve ezt a tényt, a nemzetközi szervezetek (OECD 1998, FAO/WHO 2000) új, tudományos ismeretekre épülő módszer kiépítését szorgalmazták, amely az újonnan bevitt tulajdonság toxikus potenciáljára és a transzgén növény fogyasztási biztonsági vizsgálatára irányul. A lényegi egyenértékűség (substantial equivalence) vizsgálatával a fogyasztási szempontból biztonságosnak tartott szülői növény és a GM-növény közötti komponens egyenértékűségét vagy különbséget vizsgálják. Az élelmiszerek komplexitását figyelembe véve, azonban gazdaságtalan és megvalósíthatatlan célkitűzés lenne minden egyes alkotót megvizsgálni, amelyek többsége biztonsággal fogyasztható, ezért az egyes növények, táplálkozási, antinutritív vagy toxikus hatás szempontjából kiválasztott összetevőit az OECD konszenzus dokumentumokban foglalja össze (BÁNÁTI 2007). Többek között a búzára (*Triticum aestivum* L.) is jelent meg konszenzus dokumentum (OECD 2003). Bár a lényegi egyenértékűség fontos része lehet a GM termékek biztonságossági értékelésének, a kockázat elemzésnek legfeljebb a kiindulópontja. (OECD 2002). A FAO/WHO (2003) Codex Alimentarius

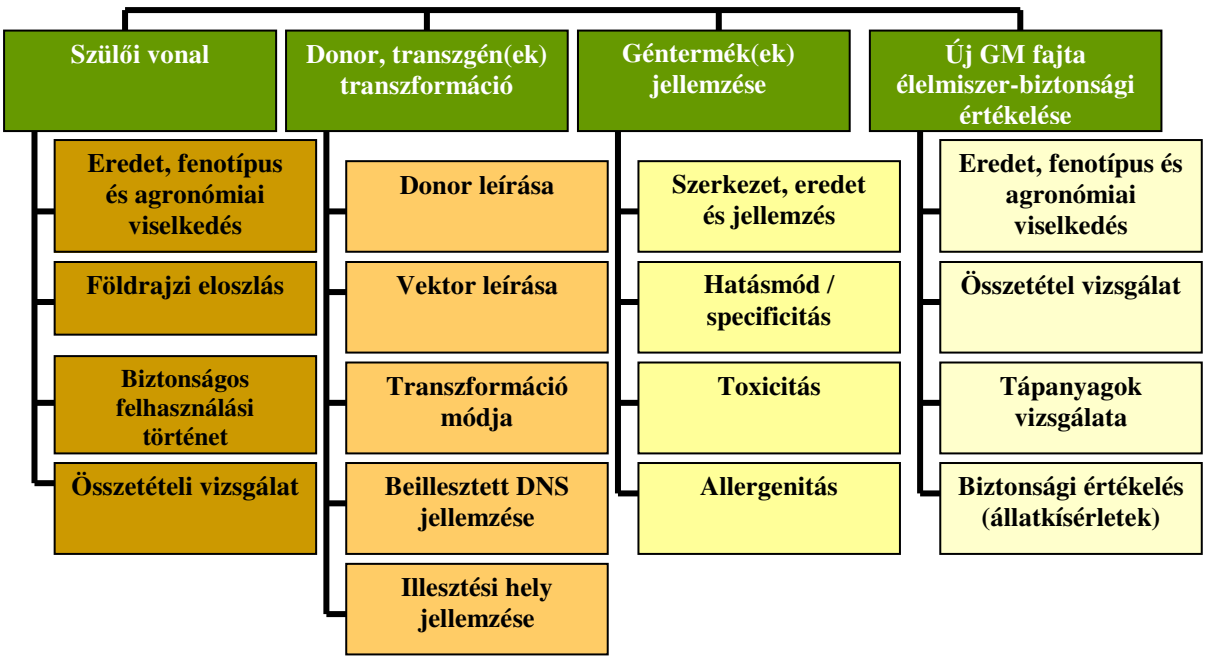
bizottsága átfogó, globális alapelveket határozott meg a rekombináns növényekből származó és a rekombináns DNS-t hordozó mikroorganizmusokkal előállított élelmiszerek biztonságosságának vizsgálatához.

Az Európai Élelmiszer-biztonsági Hivatal (EFSA 2006) GM szervezetekkel foglalkozó módszertani útmutatója is a Codex elvekre épül, mely véleményezi az engedélyezésre benyújtott GM-szervezetek (növények, állatok, mikroorganizmusok) környezetbe való kibocsátásának, illetve élelmiszer- és takarmánycélú hasznosításának környezetvédelmi, humán- és állategészségügyi kockázatát. Az útmutatót azzal a szándékkal tették közzé, hogy a GM-növények piacra jutásával várható előnyök mellett minimális kockázattal kelljen számolni. Az útmutató elvi kialakításában feltételezték, hogy a környezet, a fogyasztók és az állatok szempontjából a hagyományosan termesztett növényi élelmiszerek felhasználása biztonságos. A nem GM növények tehát alapul szolgálhatnak a GM növények környezeti, valamint élelmiszer- illetve takarmány-biztonsági értékeléséhez. Az élelmiszerek komplexitását tekintve azonban nem lehet cél az abszolút kockázat-mentesség biztosítása, csak annak igazolása, hogy a GM növény legalább annyira biztonságosan fogyasztható, mint annak szülői megfelelője (KUIPER et al. 2001). A vizsgálatoknál ezért a GM fajta és a szülői vonal közötti eltérések feltárására és a felismert különbségek elemzésére kell koncentrálni a lényegi egyenértékűség elvére épülő, összehasonlító élelmiszer-biztonsági értékelés alapján. Minden olyan bizonyítható hatást figyelembe kell venni, amelyet a molekuláris, agronómiai, összetételi, toxikológiai és táplálkozási, illetve környezeti jellemzés tár fel.

2.2.2. Genetikailag módosított fajták kockázat-becslésének integrált megközelítése

A géntranszferrel kapcsolatban mérlegelni kell, hogy milyen céllal történik a módosítás és milyen új, előnyös tulajdonságokat hordoz majd a gazdaságilag jelentős gént tartalmazó új fajta (COCKBURN 2002). A GM fajta integrált kockázat-becslésének megközelítésében pedig az alábbi kulcs elemeknek kell szerepelni (4. ábra) (GELENCSÉR & BÁNÁTI, 2007):

- ⇨ a szülői vonal jellemzői;
- ⇨ a donor és a transzgén beillesztés módja, a génmódosítási esemény molekuláris jellemzői;
- ⇨ a géntermékek jellemzése;
- ⇨ az új GM fajta élelmiszer-biztonsági jellemzése;
- ⇨ a környezeti kockázat becslése;
- ⇨ a környezeti hatás folyamatos figyelemmel kísérése és felügyelete.



4. ábra: GM fajta veszélyelemzésének integrált megközelítése (KUIPER et al. 2004)

2.2.2.1. A szülői vonal jellemzése

A biztonságos felhasználás megismerése szempontjából fontos vizsgálni, hogy milyen növénybe (vagy recipiens szervezet) történik az új információ beültetése és milyen új élelmiszert/takarmányt kívánnak abból előállítani. Első lépés tehát a szülői vonal minél szélesebb körű megismerése genotípus, fenotípus, agronómiai viselkedés és változékonyság, földrajzi megoszlás és a rendelkezésre álló élelmiszer-biztonsági információk szempontjából. A lényegi egyenértékűség vizsgálatához szükség van továbbá az összetevők és a nem tápanyaghordozó, biológiailag aktív (antinutritív, toxikus, allergén) komponensek átlagos összetételét tartalmazó, standartizált adatbázisokra. Szükségesek továbbá a teljes élelmiszerek biztonságos fogyasztására vonatkozó laboratóriumi vagy haszonállatokkal végzett kísérleti eredmények.

2.2.2.2. A donor, a transzgén(ek) és a transzformáció jellemzői

Az új információ átvitelére alkalmazható módszerek szempontjából fontos lépés a géndonor (pl. vírus, baktérium, növény) és az expressziós vektor vizsgálata. A géntranszfer során alkalmazott módszerek ugyanis hatással lehetnek a génfunkcióra és arra, hogy milyen genetikai anyag jut be a befogadó szervezetbe. Mivel a géndonor (pl. vírus, baktérium, növény) új genetikai elemmel járul hozzá a transzformációhoz, ezért vizsgálni kell az idegen gén(ek) és géntermék(ek) toxikus vagy

allergén szekvencia homológiáját (FAO/WHO 2001a), melyhez a nyilvánosan hozzáférhető szekvencia információs adatbázisok (pl.: Genbank: DNS szekvenciák gyűjteménye) és számos bioinformatikai kutatás szolgál útmutatásul. Ha a géndonor toxikus vagy allergén komponens átírását eredményezi, gondoskodni kell arról, hogy ez a szakasz ne kerüljön az expressziós vektorba.

2.2.2.3. Az expressziós vektor általános jellemzése

A génexpresszió a szabályozó szekvenciáktól függően lehet konstitutív, induktív, szerv- és szövetspecifikus. A vektor sejtbe juttatásához a leggyakrabban két transzformációs módszert alkalmaznak, génbelövéses vagy biolisztikus, illetve az Agrobaktériumos fertőzéses megoldást. Az Agrobaktériumos transzformációban tumor-induktív határszekvenciákat is beépítenek. Mindkét esetben random, esetleg több kópiaszámban történő integrációra is lehet számítani, és előfordulhat a beépítendő DNS újrarendeződése, illetve kisebb DNS szakaszok beépülése egy másik pozícióba. Ezért a DNS komponensek molekuláris vizsgálatát célszerű elvégezni a transzformáció előtt a konstrukción belül. A várható kockázatok mérlegelésére ismerni kell többek között (GELENCSÉR & BÁNÁTI 2007):

- ⇨ az idegen gén bevitelére használt módszert,
- ⇨ a növény módosítására használt DNS szakaszt hordozó (pl. plazmid) vektorban lévő genetikai elemek eredetét (pl. növényi, mikrobiológiai, vírus eredetű vagy szintetikus gén), illetve szerepüket az expressziós vektorban (pl. az átírást szabályozó vagy átírást lezáró gén) és a növényben várható funkciójukat (pl. az átírást szabályozó gén, vagy a transzformált növények szelekcióját lehetővé tevő jelölő, ún. marker gén);
- ⇨ alkalmaznak-e intermedier befogadó szervezetet (pl. baktériumot), amely a növénybe történő transzformációra alkalmas formában termeli, vagy alakítja át a DNS-t;
- ⇨ azonosítható-e a beépített gén mérete, identitása és pontos helye szerint a vektorban, illetve ismert-e funkciója.

Tisztázatlan kérdés, hogy a befogadó génbe történő beavatkozás milyen előre nem tervezett génexpressziót von maga után, mely hatással lehet a termésátlagra, az új növény esetleg „szubsztanciálisan” nem lesz „ekvivalens” az eredeti, ún. szülői növénnyel főkomponenseiben és/vagy másodlagos metabolit termékeiben (pl. antinutritív komponensek). Előfordulhat, hogy új fehérjék szintézise indul meg, amelyek funkciójukban új vagy erősebb allergének, aktív immunitást, immunológiai válaszképtelenséget vagy esetleg autoimmunitást kiváltó, új auto-antigének. Ezért, molekuláris biológiai és biokémiai módszerekkel (pl. endogén géneken vagy a gént szabályozó régión belüli potenciális beépülés szekvencia analízisével) vizsgálni kell (CHASSY 2002):

- ⇨ az idegen DNS növényi genomba történő illesztéseinek helyét;
- ⇨ a beépülő gén kópiaszámát;
- ⇨ a génkonstrukciót és ezen belül a szabályozó régiót a növényi genom viszonylatában, beleértve az idegen gén és a környező régiók szekvencia információt is, illetve minden olyan potenciális expressziós terméket (várt expresszió) vagy bármilyen más, előre nem tervezett új géntermékét (nem várt génexpresszió), melyek az új termékbe kerülhetnek;
- ⇨ a gén expressziós termékek (fehérje, nem expresszálódott RNS, metabolitok) kifejeződését a növényben és ennek szintjét, valamint a növény elfogyasztáskor várható arányát egy étkezési adagban;
- ⇨ a genetikai módosításra használt expressziós vektor stabilitását vagy esetleges átrendeződését az integráció során.

Mindezeken túl szükséges bizonyítani (CELLINI et al. 2004):

- ⇨ az integráció stabil és a beépítés során szignifikáns genetikai átrendeződés nem következett be;
- ⇨ az átírás során az aminosavak szekvenciájában nem történt olyan változás, amely az expresszált fehérje térszerkezetét úgy módosítja, hogy az a biológiai aktivitás szempontjából kritikus változást eredményezne;
- ⇨ az új tulajdonságot hordozó gén generációkon keresztül stabil, amit az idegen DNS vagy a megfelelő RNS jelenléte igazol, amennyiben a fenotípusos jegyek ezt közvetlenül nem mutatnák;
- ⇨ igen fontos, hogy az új tulajdonság csak a szabályozó funkciónak megfelelő szövetféleségben fejeződjön ki az elvárható mértékben, ezért az utóbbi években célbajuttató szekvenciákat is beépítenek az expessziós vektorba;
- ⇨ a transzformációs folyamat nem okoz olyan elváltozást a befogadó szervezet genetikai állományában, ami egy nem tervezett fúziós fehérje expresszióját eredményezné.

A transzformációs vektorban a szükséges új információt kódoló génen kívül jelenlevő, ún. marker gén segítségével válik lehetővé az expressziós vektort hordozó GM növény szelekciója. A vektorokban gyakran használnak növényi vírus promótert. A virális eredetű promóterek, mint a karfiol mozaikvírus 35S promótere (CaMV 35S) potenciálisan több biológiai veszélyt hordoznak. A CaMV 35S promóter homológjai erős konstitutív promóterek, amelyek a kívánt tulajdonságot kódoló génszakasz átírását és génexpresszióját segítik a transzformált növényben (ODELL et al. 1985). A virális promóterekkel szemben felmerült az a gyanú is, hogy egyes gének túlműködését eredményezik a transzformált növényben és így közvetve a rák kialakulásában van szerepük, illetve

új rekombináns vírusok kifejlődéséhez vezethetnek. A vírus promóter alatti gének expressziója növelheti a horizontális géntranszfer veszélyét (HO et al.1999).

A vírusköpenyt nem expresszáló és a tápcsatornában könnyen lebomló fehérje mellett esetleg túlélő, transzformált gén vagy géntermék fiziológiai hatásának, fogyasztási biztonsági vizsgálata még megoldásra váró kérdés, megítélése rendkívül ellentmondásos (METZ et al. 1998, EWEN & PUSZTAI 1999, HULL et al. 2000). A humán genom programban feltárt információk szerint nem bukkantak sem bakteriális, sem növényi eredetű géntranszfer nyomára, ezért az élelmiszerek fogyasztását ebből a szempontból biztonságosnak ítélték (FAO/WHO 1991, US FDA 1992, US EPA 2000).

Takarmányozási és humán-egészségügyi szempontból szintén kétségeket ébreszt a sikeres géntermék szelekciójára használt és a növényeknek antibiotikum (ampicillin, kanamycin) rezisztenciát kölcsönző marker génekkel állatba és emberbe, esetleg talaj mikroorganizmusokba átvihető antibiotikum rezisztencia (BARBOSA et al. 1999). Ismert azonban, hogy a növényi DNS mikrobiális vagy humán sejtbe történő transzformációjához bizonyos feltételek teljesítése szükséges. Ilyen feltétel, hogy:

- az adott gén lineáris formában váljon rendelkezésre;
- élje túl a növényi és a tápcsatorna eredetű nukleázokat;
- lépjen sikeres kompetícióba a diétában lévő DNS-ekkel;
- a befogadó mikrobiális vagy emlős sejtek legyenek kompetensek a transzformációra és az adott gén élje túl a befogadó restrikciós enzimek aktivitását;
- az adott gén a befogadó genomba úgy épüljön be, hogy ott csak elvétve forduljon elő génhiba javítás vagy rekombináció.

Transzformált szójalevél etetését követően – bár a transzformált DNS még 121 óra múlva is túlélte a tápcsatornát és megtalálható volt a lépben és a májban – nem találtak még tudományos bizonyítékot arra, hogy a gén stabilizálódott és emlős sejtekben expresszálódott volna (SCHUBBERT et al. 1994). A kanamycin rezisztenciáért felelős *nptll* génnel kapcsolatosan rendelkezésre álló információk alapján, a 2001/18/EC irányelv alapján eddig engedélyezett GM-növények esetében ki kell zárni a klinikumban használt antibiotikumokkal szemben rezisztenciát hordozó marker gének alkalmazását, illetve alternatív megoldásokat kell kezdeményezni.

2.2.2.4. A géntermék jellemzése

Élelmiszer-biztonsági célú kockázat-becslés szempontjából fontos, hogy az újonnan beillesztett gén expressziójának milyen direkt toxikológiai következménye lehet. Fontos ismerni, hogy a beillesztett gén biztonságosan fogyasztható fehérjét vagy azzal homológ terméket, illetve egy „lecsendesített" géntermék eredményez-e. Továbbá, ha a géntermék ilyen szempontból még nem vizsgálták, eredményezhet-e esetleg ismeretlen biztonságú terméket. Amennyiben a beillesztett gén olyan gén túltermelését indítja el, amelynek terméke toxikus vagy allergén tulajdonságot hordozhat, okozhat-e ez utóbbi a növényben a táplálkozási összetevők részarányában bármilyen változást, mely módosítja az anyagcserét és másodlagos metabolitok szintézisét indíthatja el. Esetleg okoz-e olyan változást a táplálkozási összetevők részarányában, amely a táplálkozási értéket vagy az élelmiszer-biztonsági jellemzőket károsan befolyásolná. Számításba kell venni, hogy a feldolgozott GM élelmiszerek fogyasztásával várható-e a napi tápanyagbevitel potenciális változása, illetve egy hosszantartó fogyasztással összefüggésbe hozható táplálkozási betegség kialakulása.

A géntermékek tápanyaghordozók (fehérjék), illetve másodlagos metabolit termékek is lehetnek, amelyek egy újonnan expresszált enzim által katalizált reakció termékeként szintetizálódnak a növényben. Az expressziós vektor (várt hatás) random beillesztés esetén azonban nem várt génexpressziót is eredményezhet. A gén túlműködés vagy csendesítés, illetve kópiaszám növekedés miatt nagyobb vagy kisebb specifikus fehérje expresszió, míg gén szétesés miatt módosult fehérje expresszió jöhet létre. Ezért a szülői és a transzformált vonalak egymás melletti tesztelése szükséges.

A kockázat-becslésnek ki kell terjednie a géntermékét hordozó növény kémiai összetételére, az összetevők funkcionális aktivitására és a táplálkozás során egy dózissal bevihető átlagos koncentráció meghatározására. Ily módon a marker élelmiszerek fogyasztási adatainak fényében megállapítható, hogy a populációban vagy az egyes lakosság-csoportokban mekkora a potenciális terhelés kockázata.

A fehérjetermék toxicitásának vizsgálatát az ismert adatbázisokban (pl. SWISS-PROT Fehérje Szekvencia Adatbank; FARRP Allergén Adatbázis) található szekvencia-homológia alapján szükséges elvégezni. Homológia esetén vizsgálni szükséges a fehérjék hőstabilitását és tápcsatorna rezisztenciáját egy gyomor és vékonybelet reprezentáló modellrendszerben. Etetéses toxikológiai vizsgálatokra csak abban az esetben van szükség, ha az új fehérje biztonságos fogyasztásával kapcsolatban még nem áll rendelkezésre kellő információ.

2.2.2.5. Géntermék toxicitásának vizsgálata

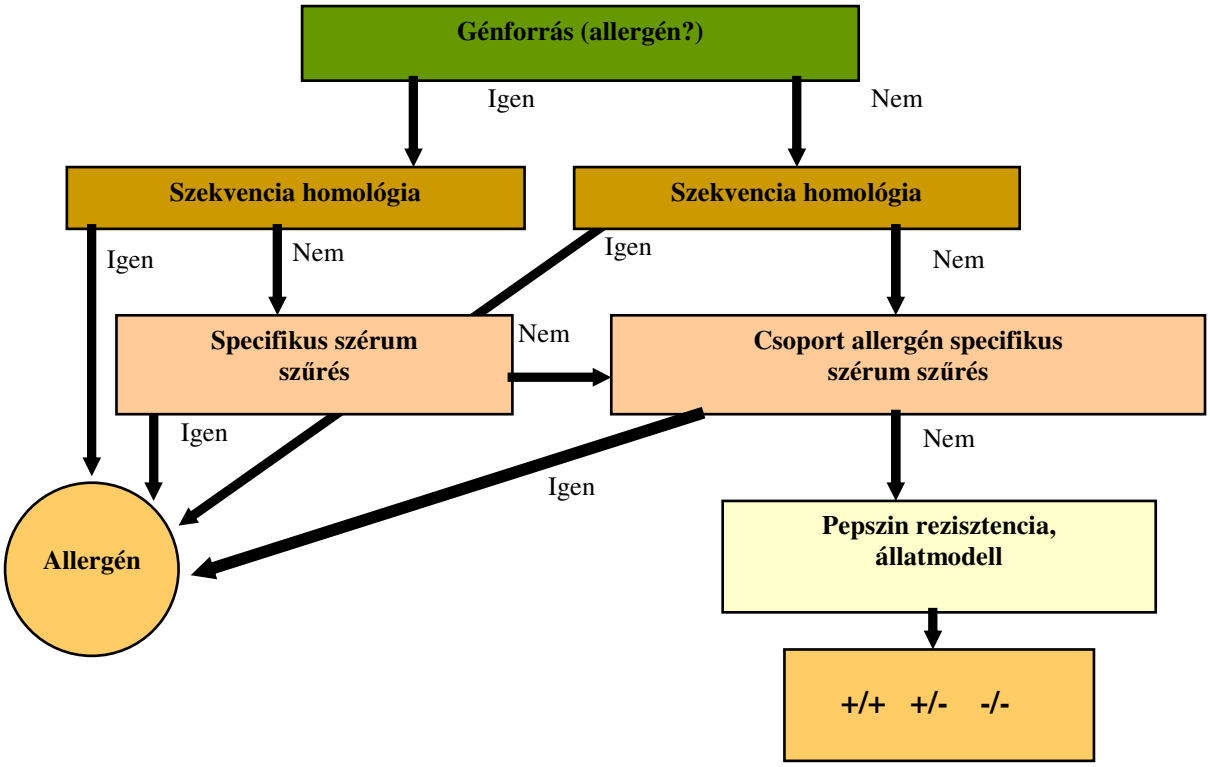
Azokat a fehérje, illetve nem fehérje természetű komponenseket, amelyek biztonságos fogyasztásával kapcsolatban nem áll rendelkezésre megnyugtató információ, esetről-esetre szükséges azonosítani, továbbá tisztázni kell biológiai szerepüket a növényben. A kutatásokat ki kell terjeszteni a metabolizmus tanulmányozására és a rövid, illetve a hosszú távú toxikológiai hatás (karcinogenitás, mutagenitás, teratogenitás) megismerésére. Amennyiben e vizsgálatok elvégzéséhez szükség van az egyes komponensek izolálására, vagy alternatív úton történő előállítására, akkor elengedhetetlen kritérium, hogy szerkezetükben és biokémiai funkciójukban is azonosak legyenek a gazdaságilag jelentős gént hordozó növényben található komponenssel (PARISA & JOHNSON 2001).

2.2.2.6. Allergén kockázat jellemzése

A GM növényekbe transzformált új gén expressziós terméke általában fehérje, ezért szükséges a fehérje allergiát kiváltó hatás akut vizsgálata (*in silico, in vitro* vagy *in vivo*) is (KIMBER & DEARMAN 2002).

A táplálék allergén fehérjék többsége glükoprotein, amelyek általában védőfehérjék (pl. konglutininek, kitinázok, glükanázok) vagy tartalékfehérjék (globulinok, glükozilált vicillinek, leguminok, prolaminok). Ritkábban a táplálék allergének metabolitikus vagy szerkezeti fehérjék, melyek biológiai aktivitása valamilyen konzervált szerkezettel azonosítható. Nincs kimutatható kapcsolat a fehérjék szerkezete, biológiai aktivitása és allergén aktivitása között. A fehérje expressziós szintre vonatkozóan még nincs jóváhagyott határérték, amely még nem válthat ki allergiát az arra érzékeny betegcsoportokban (AALBERSE 2000).

Mivel napjainkig nincs elfogadott modell a potenciális allergenitás vizsgálatára, a FAO/WHO (2001a) egy ún. „döntési fa” sémát dolgozott ki (5. ábra). Amennyiben az újonnan expresszált fehérje – a 2003/89/EK irányelvben meghatározott – potenciálisan allergén fehérjét kódoló forrásból származik, meg kell vizsgálni, hogy a gazdaságilag jelentős gént tartalmazó növény nem vált-e ki allergén tüneteket az arra érzékeny betegcsoportokban. Glutén érzékenység esetén például búzából és a vele immunológiailag keresztreagáló gabonafélékből (pl. árpa, rozs, zab, tritikalé) származó géntermékeket szükséges ilyen módon tesztelni.



5. ábra: GM-növények allergenitás vizsgálatának döntési fája (FAO/WHO 2001a)

Első lépésként vizsgálni kell, hogy fennáll-e bármilyen homológia az ismert fehérje allergénekkel. Lineáris epitópok esetén a donor géntermék aminosav szekvencia analízisét nyolc vagy több folyamatos aminosav esetén szükséges összehasonlítani standartizált adatbázisokban (FASTA, BLAST, PIR, SwissProt, TrEBL) található ismert allergén szekvenciákkal. Szekvencia homológia áll fenn, ha az expresszált fehérjéből származó peptid 35%-a (80 > aminosav alapján) szerkezeti azonosságot mutat (pl. PR-fehérjék, LTP, 2S albuminok, parvalbuminok, proteáz/amiláz inhibitorok, lektinek stb.). Nem folyamatos, ún. konformációs epitópok esetében a fehérjék harmadlagos szerkezetének ismerete is szükséges lenne (METCALFE et al. 1996). Funkcionális homológia bizonyítható, ha minimum 6 folyamatos aminosav szerkezeti azonossága esetén humán vagy állati eredetű szérumokkal keresztaktivitás tapasztalható. Amennyiben az újonnan bevezetett fehérje ismert allergén forrásból származik, vagy homológ szekvenciát tartalmaz ismert allergénekkel, akkor az IgE-specifikus immunreaktivitást humán hiperimmun szérumok segítségével szükséges megvizsgálni.

Fontos továbbá a növénybe expresszált fehérje szintjének ismerete. A fő allergének általában a teljes fehérjének több mint 1%-ában vannak jelen (YUNGINGER 1990). Más paraméterek, mint a fehérje funkcionális aktivitása, molekulatömege (10-40 kDa) és a glükozilációs fok megismerése

szintén célravezető a vizsgálat szempontjából. Mivel a különböző befogadó szervezetekben expresszált fehérje glükozilációs foka eltérő lehet – amely hatással van a fehérje hidrolízisre és az antigén feldarabolásra – a vizsgálatba vont fehérje szerkezet nem térhet el a GM növényben expresszált fehérjétől. A glükozilálás megváltoztathatja a fehérje felszínén lévő epitóp szerkezetet és erősen keresztreagáló glükán epitópok is keletkezhetnek. Ezért egy bizonyított szekvencia homológia esetén alkalmazott specifikus szérum szűrésnél különbséget kell tenni az IgE-specifikus és a nem-specifikus glükán epitópok keresztreakciója között.

Ha a szekvencia homológia (> 5 IU szérum IgE) nem bizonyítható, akkor csoport specifikus random szérumszűrést kell alkalmazni az alábbiak szerint:

- ⇨ ha az idegen gén egyszikű növényből származik – egyszikű növényre specifikus IgE ellenanyag tartalmú szérumokkal (fűfélék, rizs);
- ⇨ ha kétszikű növényekből származik – kétszikű növényekre specifikus IgE ellenanyagokkal (fa pollenek, gyom pollenek, zeller, mogyoró, diófélék és latex);
- ⇨ ha gombából származik – gombákra, élesztőkre specifikus IgE ellenanyagokkal;
- ⇨ ha nem emlős állatból származik – nem emlős állatra specifikus IgE ellenanyagokkal (atka, rákfélék);
- ⇨ ha emlős állatból származik – emlős állatra specifikus IgE ellenanyagokkal (labor állatok, tehéntej, hal, tojásfehérje és sárgája, szérum fehérjék);
- ⇨ ha baktériumból származik – nincs csoport specifikus szérum.

Mivel a géntermék általában fehérje, fontos ismerni a gyomor- és a bélnedvekkel szembeni relatív rezisztenciáját. Az allergén fehérjék többsége rezisztens a gyomor- és bélnedvekben található proteázokkal (pl. pepszin) szemben, viszont a növényi fehérjék többsége nem rezisztens (ASTWOOD et al. 1996). A hőlabilis allergének hőkezelést követő fogyasztása kevesebb aggodalmat vált ki a hőstabil allergénekkel szemben. A fizikai stabilitás egyértelműen megnöveli a túlélő fehérje felszívódási veszélyével együtt járó szisztémás hatás, mint a toxicitás vagy az allergia kialakulásának veszélyét. Igazolható funkcionális homológia esetén tehát meg kell vizsgálni a rekombináns fehérje pepszin rezisztenciáját. A natív fehérje-koncentrátum pepszines emésztését kell összevetni egy nem allergén fehérje (pl. szója lipoxigenáz, burgonya savas foszfatáz) és egy ismert allergén (pl. béta-laktoglobulin, szója tripszin inhibitor) lebomlási képességével, amelyet a fehérje tartalom változásával és a 0, 15, 30 mp és 1, 2, 4, 8, 15, 60 perces, pepszinnel emésztett fehérje oldat elektroforetikus analízisével követnek nyomon. Az intakt fragmensek (> 3.5 kDa) potenciális allergének, amit allergén-specifikus poliklonális ellenanyagokkal való reakcióképességük alapján immunoblottal igazolnak.

Fehérjét nem expresszáló, lecsendesített gének esetében, illetve a potenciális allergén fragmenseknél az immunogenitást és a potenciális allergén aktivitást állatmodellekben tesztelhetik. Az állatmodellekből nyert hiperimmun szérumok IgE humán relevanciája azonban kétséges.

Ilyen modellek lehetnek (PENNINKS & KNIPPELS 2001, KIMBER & DEARMAN 2001) pl.:

- ⇨ orális úton érzékenyített Barna Norvég patkány modell;
- ⇨ intraperitonealis úton érzékenyített egér modell;
- ⇨ a potenciális allergénre adott immunválaszban a Th1/Th2 izotípusú ellenanyagok profilanalízise.

2.2.2.7. A GM növény jellemzése

A GM és a kontroll növény egy metabolitikus út szempontjából fontos komponensének összehasonlító vizsgálatára azonos helyen és azonos feltételek mellett termesztett és logisztikai úton kezelt növények alkalmasak. A vizsgálatok alapján profil analízis (transzkriptomika, proteomika, metabolomika) és a befogadó növény, illetve rokon fajok alap adatait feldolgozó adatok segítségével célszerű elvégezni. A természetes variációkat is figyelembe véve ismerni kellene a kapott eredmények biológiai szignifikanciáját. Ha nincs mód izogenikus vonalakat vizsgálni, akkor a genetikailag legközelebb álló fajtát célszerű választani. A kísérleteket annyi generáción keresztül szükséges lefolytatni, hogy a kitettségi vizsgálatokhoz kellően megbízható adatokkal rendelkezzünk. A környezeti hatások és a genotípusos eltérések okozta variációk megismerése céljából minden kísérletet legalább kétszer meg kell ismételni (KUIPER et al. 2001). A mintavételhez megfelelő számú növényt és a vizsgálatokhoz kellően érzékeny és specifikus analitikai módszereket kell alkalmazni. Előfordulhat, hogy a GM-növényben olyan változások következnek be a génmódosítás hatására, amelyek az élelmiszerben megváltozott összetételt eredményezhetnek. Amennyiben a tápanyagprofilban bármilyen változás tapasztalható, úgy a tisztított komponensekből hagyományos kémiai kockázat-becslést is szükséges elvégezni (KOSHATZKY & MAßFELLER 1994).

Az endogén toxikus anyagok hőstabilitását és a fontos tápanyaghordozók biológiai hasznosulását, az élelmiszer-feldolgozás hatásait – beleértve az otthoni elkészítés műveleteit is – figyelembe véve kell vizsgálni. Ezért a piaci engedélyezéshez minden feldolgozással kapcsolatos technológiai információt (pl. olajfinomítás extrakciós lépéseinél mért adatok) mérlegelni szükséges.

Összességében tehát vizsgálni szükséges a GM fajta és a szülői növény fenotípusának és agronómiai viselkedésének egyenértékűségét, a tápanyaghordozók és egyéb fizológiailag aktív komponensek egyenértékűségét, az élelmiszer-biztonsági kockázat egyenértékűségét, a táplálkozási

és tápanyag-hasznosulási mutatók egyenértékűségét (KÖNIG 2003). Egyenértékűség hiányában célvizsgálatok szükségesek. Új törvényi szabályozás, illetve olyan fejlesztési, vizsgálati módszertani útmutatók kidolgozása vált szükségessé, amelyek a GM növények felhasználásának várható előnyei mellett minimális környezeti és élelmiszer-biztonsági kockázati terhelés elérését biztosítja.

2.3. Búza allergén fehérjéi

Az utóbbi évek allergia kutatásai ráirányították a figyelmet arra, hogy a biokémiai funkciót hordozó fehérjék (hidrolítikus és nem hidrolítikus enzimek, enzim inhibitorok, transzport fehérjék, szabályozó fehérjék, tartalék fehérjék a magban, védelmi fehérjék) gyakran allergének. Molekulatömegük 10-70 kD közötti. Gyakran glükoproteidek, savas izo-elektromos ponttal rendelkeznek, hőstabilak, ellenállnak az emésztésnek és minimálisan két IgE-kötő hellyel rendelkeznek.

A gabonafehérjék IgE-mediált allergiás reakciót, valamint T-sejt-mediált cöliákiás reakciót egyaránt kiválthatnak. A gabonafehérjék által kiváltható reakció az érzékenyítés útja alapján lehet táplálékallergia (gabonaallergia, cöliákia), vagy légúti allergia (pékasztma). Az előbbinél az érzékenyítés gasztrointesztinális úton -, az utóbbinál légzőrendszeren keresztül történik.

A búza allergiát okozó fehérjék oldhatóságuk szerint csoportosítva, vízben/sóban oldhatatlan gliadin és gluteninfehérjék, illetve vízben/sóban oldható albumin/globulin búzafehérjék is lehetnek (1. táblázat).

1. táblázat: A búza fehérjefrakcióinak eloszlása a fehérjében (%) (LÁSZTITY 1999)

Frakciók	Simmonds (1978)	Lásztity (1999)	Belitz és Grosch (1987)	Konarev (1980)
Albumin	5-10	6,63-12,10	14,7	7-10
Globulin	5-10	4,25-7,15	7,0	4-6
Gliadin	40-50	30,62-56,30	32,6	40-45
Glutenin és a maradék	30-40	28,88-56,34	45,3	40-55

A gliadin fehérjéket molekulatömegűk és elektroforetikus mobilitásuk alapján tovább csoportosíthatjuk α-, β-, γ-,ω- gliadinokra (2. táblázat). Az α-, β-, γ- gliadin kisebb molekulatömegű kéntartalmú aminosavakban gazdag, az intramolekuláris diszulfid kötések jelenléte miatt hőstabil fehérjék, ellentétben az ω-gliadinnal, amely nagyobb molekulatömegű kénsavtartalmú aminosavakban szegény fehérje.

2. táblázat: A gliadin fehérjék összehasonlítása (LOOKHART & BEAN 1995)

	α-gliadin	**β-gliadin**	**γ-gliadin**	**ω-gliadin**
Aminosav összetétel	Hasonló aminosav összetétel S- tart. aminosavakat tartalmaz			S-tart.amino-savakban szegény
Acid PAGE mobilitás (Rm)	73-85	47-70	43-47	12-40
Relatív molekula-tömeg (kDa)	35-38	37-43	37-46	48-63
HPLC elválasztás [min]	38-48	22-38	48-56	6-22

A főbb búza allergéneket, belefoglalva a kísérleteim során vizsgált allergén tuladonságú marker fehérjéket a 3. táblázatban foglaltam össze. A búza allergének azonosítására és jellemzésére az elektroforetikus módszerekkel kombinált IgE immunblott (1D, 2D) alkalmazása terjedt el. Ezzel a módszerrel az allergiás betegek szérumában az allergén fehérjére megemelkedett IgE ellenanyagok *in vitro* fehérjékhez való reaktivitását használják.

3. táblázat: Főbb allergénként azonosított búzafehérje

Allergének	MW	Azonosítása
Tri a 12- profilin	14 kDa	VAN REE et al. 1992 WEICHEL et al. 2006
Tri a 14- nsLTP	9 kDa	CAPOCCHI et al. 2006 PALACIN et al. 2007
Tri a 18- agglutinin izolektin 1	17 kDa	WEICHEL et al. 2006
Tri a 19 – ω.5 gliadin	65 kDa	PALOSUO et al. 2003 MATSUO et al. 2008
Tri a 25- thioredoxin	13 kDa	BRANT 2007 WEICHEL et al. 2006
α-gliadin	31 kDa	SANDIFORD et al. 1997
α-amiláz inhibitor 0.53	14 kDa	JAMES et al. 1997
WTAI-CM16 (α-amiláz inhibitor)	16 kDa	YAMASHITA et al. 2001 KIMOTO et al. 1998
peroxidáz	60 kDa	WATANABE et al. 2001
β-amiláz	54 kDa	SOTKOVSKY et al. 2008
Szerpin	40 kDa	AKAGAWA et al. 2007

A cöliákia az egész életen át fennálló glutén szenzitív enteropathia. A betegség kialakulására a legkülönbözőbb elméletek születtek, azonban a tényleges kiváltó ok egyértelműen még nem igazolódott. Az viszont egyértelműen bizonyítottá vált, hogy a gabonafélékben lévő fehérjének, a gluténnek a fogyasztása provokálja a betegség megjelenését, ami súlyos bélboly károsodáshoz vezet. Igazolódott, hogy a glutén eliminálása az étrendből a vékonybél nyálkahártya regenerálódását eredményezi, ami a beteg teljes tünetmentességéhez vezet. Ugyanakkor a glutén tartalmú étrend ismételt bevezetése – akárcsak a diéta megszegése következtében is – ismételt panaszokat okoz, és a vékonybél nyálkahártya boholy struktúrája ismételten károsodik (POLGÁR et al. 1998). A glutént nem toleráló egyének vérszérumában gluténterhelésre a gliadin frakcióval specifikusan reagáló ellenanyagok (IgA, IgG) szintje tehát megemelkedik. Ezekből a hiperimmun szérumokból pullozott szérumban jelenlevő poliklonális ellenanyagok *in vitro* képesek felismerni az élelmiszerfehérjében jelenlevő potenciális allergéneket.

2.4. WGA marker fehérje jellemzése

A búzacsíra agglutinin (Wheat Germ Agglutin, WGA) amellett, hogy a pékasztmában ismert inhalációs allergén, táplálékallergén fehérje, egy mitogén tulajdonságú lektin, amely a búza albumin frakciójában található. Ellenáll a gyomor- és bélemésztésnek és specifikus cukorkötő (N-acetil glükózamin) képessége miatt a bélfalhoz képes kitapadni és lokális, illetve szisztémás toxikus vagy allergén hatást kiváltani (CHEN et al. 1996, VAN DAMME et al. 1998). A bélhám kefeszegélyére kötődött WGA egy kisebb hányada átjut a bélhámon, felszívódik. Ezután megint csak talál receptorokat, és megkötődhet szérumfehérjéken, a bél ereinek endotheliumán, a vörösvértesteken és fehérvérsejteken, de sokféle szövet sejtjein is megtapadhat. Vörösvérsejtekhez való kitapadásuk következtében képes az eritrocitákat kicsapni, agglutinálni, mely képességét *in vitro* kimutatására is használják. Kimutatták, hogy rosszindulatú sejteket gyorsabban képes kicsapni, mint normál sejteket. Antitumorális aktivitással rendelkezik és hatékony immunmodulátor (GANGULY & DAS 1994).

A lektinek fontos antinutritív komponensek (PUSZTAI 1991). PUSZTAI és munkatársai (1993) állatetetési kísérletekben vizsgálták a WGA antinutritív hatását. A diétába bekevert 7 g/kg tisztított WGA lektint tartalmazó táp 10 napos etetése csökkentette a fehérjehasznosulási mutatókat, hasnyálmirigy és vékonybél nagyobbodást, csecsemőmirigy sorvadást és testtömeg csökkenést idézett elő a kísérleti patkányokon. A WGA kitapadt a bélhámra, és az utolsó etetést követően 2 óra elteltével 60% WGA túlélőnek bizonyult a vékonybél folyadékban.

A búza csíra agglutinin müzlivel natív formában, vagy hőkezelésnek kitéve kenyér formájában kerülhet be táplálkozásunkba. 100 °C-os hőkezelésnek kitéve a feloldott WGA sejtekhez való kötődése 1 óra után 10%-ra, 2 óra után 0,1%-ra csökkent. Szilárd állapotban vizsgálva a hőkezelésnek ellenállóbb volt, ebben az esetben 1 óra hőkezelést követően 87%-ra 2 óra elteltével 83%-ra csökkent a sejtekhez való kötődési képessége (GABOR et al. 2003).

Több kutató is vizsgálta a WGA szerepét, mint stresszjelző faktor. A búza különböző szöveteiben vizsgálva a WGA felhalmozódását, növekedést tapasztaltak különböző stressz hatására (KOMAROVA et al. 2003, BHAGLAL et al. 1999, CAMMUE et al. 1989). SINGH és munkatársai (1999) vizsgálataiban az ozmotikus, hő és só stressz hatása WGA növekedést váltott ki csírázó búza embriókban. ANTONYUK és EVSEEVA (2006) kutatásaikban a WGA-t fontos jelző faktorként jellemezték a növények és mikrobák közötti kölcsönhatások, és a növények stresszhez való alkalmazkodása szerepében. Ugyanakkor felhívják a figyelmet, hogy a WGA komplexitása, összetett működése és nagyfokú variabilitása miatt a jelenlegi tudásunkkal, még nem alkalmas a gyakorlati biotechnológiában való használata.

3. CÉLKITŰZÉSEK

1. A totális herbiciddel szemben toleráns búzavonalak és a nem-transzgénikus kontroll tavaszi búza lényegi egyenértékűségének összehasonlító vizsgálata azzal a céllal, hogy tapasztalható-e érdemi eltérés a tápanyaghordozókban a GM-technológia, az évjárat és a herbicid kezelések hatására.

2. A totális herbiciddel szemben toleráns búzavonalak és a nem-transzgénikus kontroll tavaszi búza allergén fehérjéinek összehasonlító vizsgálata azzal a céllal, hogy a GM-technológia, az évjárat és a herbicid kezelések hatására történt-e olyan várt vagy nem várt változás a vizsgált fehérjék szintjén, mely megnövelheti az allergén kockázat veszélyét.

3. Az újonnan expresszált géntermék és potenciális allergénként azonosított, szelektált marker fehérjék tápcsatorna rezisztencia vizsgálata azzal a céllal, hogy a tápcsatornában rezisztens fehérjék szervezetbe kerülésének kockázatát feltárjam.

4. A totális herbiciddel szemben toleráns búzavonalakból élelmiszer-biztonság szempontjai szerint szelektált, kezeletlen natív és hőkezelt transzgénikus vonal és a nem-transzgénikus kontroll tavaszi búza rövidtávú etetésének patkánymodellben történő összehasonlító vizsgálata azzal a céllal, hogy feltárjam annak a veszélyét, hogy a fehérjék szintjén bekövetkezett változások hatással vannak-e a fehérjehasznosulásra.

5. Kísérleti tapasztalatok alapján javaslatok készítése a GM növények élelmiszerbiztonsági kockázat-becslésére javasolt módszertani útmutató gyakorlatban történő alkalmazásának elősegítésére.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Anyagok

4.1.1. Búzaminták

A vizsgálatokhoz a Gabonakutató Nonprofit Kft. (Dr. Pauk János) által rendelkezésre bocsátott 1. (2001) és 2. (2002) évi tenyészkerti eredetű *Triticum aestivum* L. szülői búzatörzs (CY-45) szemtermése szolgáltatta a kontrollt. A tenyészkerti kihelyezés Szeged tájkörzetben, egymás melletti parcellákon történt. A szülői búzatörzs bázisán előállított, totális herbiciddel szemben ellenálló transzgénikus búza hat vonalból származó szemtermés bázisán, tenyészkertben termelt 1. és 2. évi transzgénikus búzák szemtermését használtam fel tesztanyagként. Vizsgálataimat a tenyészkerti kihelyezést követően, totális gyomirtó szerrel (Finale 14 SL), illetve búzára regisztrált hagyományos gyomirtó szerrel (Granstar) kezelt, illetve nem kezelt (gyomlált) mintákra is kiterjesztettem (4. táblázat). A kétféle herbicid kezelésből a Finale 14SL totális gyomirtószer alkalmazását a bejuttatott *bar* gén indokolta, hiszen a transzgénikus vonalak erre nézve hordoznak rezisztenciát. Szántóföldi kezelésre a gyártó által gyomtalanításra ajánlott dózist alkalmazták (10 ml/10 l víz). A Granstar a legáltalánosabb, ún. hagyományos búza gyomirtószer Magyarországon, ezért a kísérletben ezt, mint herbicides kontrollt használtam. A búzaszem mintákat Retsch GRINDOMIX GM200 típusú őrlőberendezéssel őröltem meg (3x20 mp, 8000 rpm) a további vizsgálatokhoz.

4. táblázat: Búzaminták jelölése

1. és 2. évi tenyészkerti búzaminták		
kezeletlen	*Finale kezelt*	*Granstar kezelt*
CY-45 Ø	*	CY-45 G
T-106 Ø	T-106 F	T-106 G
T-116 Ø	T-116 F	T-116 G
T-117 Ø	T-117 F	T-117 G
T-124 Ø	T-124 F	T-124 G
T-128 Ø	T-128 F	T-128 G
T-129 Ø	T-129 F	T-129 G

***** a Finale kezelt szülői búza, a rezisztencia hiányában, a kezelést követően elpusztult

4.1.2. Oldatok és reagensek DNS izoláláshoz

- Wizard puffer: 10 mM TRIS-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 1% SDS
- 5 M Guanidin-hidroklorid oldat
- 20 mg/ml proteináz-K enzimoldat
- Izopropil-alkohol

4.1.3. Oldatok és reagensek a polimeráz láncreakcióhoz és a termékanalízishez

A polimeráz láncreakció reagensei:

- Primer pár: Bar1 5'- CGA GGA ACC GCA GGA GTG GA -3'
  Bar2 5'- AGC CCG ATG ACA GCG ACC AC -3'
- Master mix (Sigma): 1,5 U Taq DNS polimeráz, 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP és dTTP, 1,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0,001% zselatin, 10 mM TRIS-HCl pufferben
- Steril desztillált víz

Termékanalízis reagensei

- Mintaoldó puffer: 20% szacharóz, 0,1 M Na_2EDTA (pH 8,0), 1% Na-dodecil szulfát, 0,25% brómfenolkék
- Generuler 50 bp DNS bázisbár standard (Fermentas)
- TRIS-Bórsav-EDTA puffer (TBE puffer), (pH 8,0) 10x-es törzsoldat (108 g TRIS, 55 g bórsav, 40 ml 0,5 M Na_2EDTA)
- 2%-os és 4%-os agarózgél oldat TBE pufferben
- Gélfestő oldat: 0,5 µg/ml etidium-bromid oldat

4.1.4. Oldatok és reagensek ELISA-hoz

- Foszfát-puffer (PBS, 0,15 M, pH 7,4): 0,14 M NaCl, 0,0027 M KCl, 0,01645 M $Na_2HPO_4*2H_2O$, 0,002 M KH_2PO_4
- Kötőpuffer (karbonát-bikarbonát puffer, 0,05 M, pH 9,6): 0,032 M $NaHCO_3$, 0,018 M Na_2CO_3
- Mosópuffer (0,15 M, pH 7,4): 0,1% Tween-20 0,15 M foszfát-pufferben
- Fedőpuffer (0,15 M, pH 7,4): 0,5% zselatin 0,15 M foszfát-pufferben

- Szubsztrát-oldat (H_2O_2/OPD, pH 5,0): 1 db OPD-tabletta (Sigma) 20 ml desztillált vízben
- Inhibitor-oldat: 2 M H_2SO_4-oldat

4.1.5. Oldatok és reagensek gélelektroforézishez

15%-os gélen történő elektroforézis reagensei:

- Low Range molekulastandard (BioRad): foszforiláz 100 kDa, marha szérum albumin 97 kDa, ovalbumin 54 kDa, karbonsav anhidráz 37 kDa, szójabab tripszin inhibitor 29 kDa, α-laktalbumin 20 kDa
- Mintaoldó-puffer (pH 6,8): 62 mM TRIS; 0,07 M SDS, 87% glicerin, 10% β-merkapto-etanol
- Akrilamid oldat: 0,22 M akrilamid, 0,0032 M N,N-bisz-akrilamid
- 15%-os gél: 4 ml akrilamid oldat, 1,8 ml 2 M TRIS (Trisz-(hidroxi-metil)-amino-metán) puffer (pH 8,8), 2,06 ml desztillált víz, 50 µl 10%-os SDS (nátrium-dodecil-szulfát) oldat, 6 µl TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin), 50 µl 10%-os ammónium-perszulfát
- 6%-os gyűjtőgél: 2 ml akrilamid oldat, 1,32 ml 0,5 M TRIS puffer (pH 6,8), 6,46 ml desztillált víz, 110 µl 10%-os SDS oldat, 12 µl TEMED, 100 µl 10%-os ammónium-perszulfát
- Futtató puffer: 0,025 M TRIS, 0,0035 M SDS, 0,193 M glicin
- Fixáló oldat: 20% triklór-ecetsav
- Mosóoldat: 50 ml ecetsav, 100 ml etanol, 850 ml desztillált víz
- Festékoldat: 0,2% Coomassie Brillant Blue R-250 festék (Reanal), 9% ecetsav, 45% etil-alkohol
- Festékmosó oldat: 10% ecetsav

10 %-os natív gélelektroforézis reagensei:

- Futtató puffer: 0,025 M TRIS, 0,193 M glicin
- Mintaoldó puffer: 0,585 M szacharóz futtatópufferben
- 10%-os gél: 2,65 ml akrilamid oldat, 1,8 ml 2 M TRIS puffer (pH 8,8), 3,4 ml desztillált víz, 6 µl TEMED, 50 µl 10%-os ammónium-perszulfát oldat

7 %-os savas gélelektroforézis reagensei:

- Extraháló-oldat: 1,5 M dimetil-formamid (DMF)
- Mintaoldó puffer: 20%-os szacharóz-oldat, 10 mg metil-zöld
- Főgél (7%-os): 5 ml akrilamid oldat (4 M akrilamid, 0,08 M bisz-akrilamid), 0,4 ml 0,6 M KOH, 0,2 ml 0,1 M ezüst-nitrát, 10 ml 0,03 M ammónium-perszulfát oldat, 4,4 ml desztillált víz
- Gyűjtőgél: 2,5 ml akrilamid oldat (2,5 ml: 17% akrilamid oldat, 0,6 M KOH, 0,1 M ezüst-nitrát, 0,001 M L(+)-aszkorbinsav, 0,9 mM vas(II)-szulfát, 7,5 µl 0,2% hidrogén-peroxid
- Futtatópuffer I.: 0,6 M KOH, 21,25% tejsav (50x)
- Futtatópuffer II. (pH 3,1): 0,58 M alumínium-laktát, 8,5% tejsav

4.1.6. Oldatok és reagensek immunblotthoz

- Foszfát-puffer (PBS, 0,15 M, pH 7,4)
- Anód I.-puffer (pH 10,4): 0,3 M TRIS, 10% metanol
- Anód II.-puffer (pH 10,4): 25 mM TRIS, 10% metanol
- Katód-puffer (pH 9,4): 25 mM TRIS, 40 mM glicin, 10% metanol
- Fedő-puffer: 1% BSA, 0,05% Tween-20 foszfát-pufferben
- 4-kloro-naftol/H_2O_2 szubsztrát-oldat: 0,4% H_2O_2-oldat (30%-os) foszfát pufferben, 1 db. 4-kloro-naftol tabletta (Sigma) 10 ml etil-alkoholban
- Szérumok:
  - anti-szerpin nyúl IgG (1:500)
  - anti-WGA nyúl IgG (1:500)
  - IgE pozitív humán szérum (1:20) (szérumok szűrését a Fővárosi Önkormányzat Madarász u. Gyermekkórház Gasztroenterológiai Központjában végezték)
  - IgA-hiányos cöliákiás betegek széruma (1:20) (szérumok szűrését a Fővárosi Önkormányzat Madarász u. Gyermekkórház Gasztroenterológiai Központjában végezték)
- Ellenanyag konjugátumok:
  - anti-nyúl IgG-kecske IgG, HRPO konjugátum (1:500) (Sigma)
  - anti-humán IgA, HRPO konjugátum (1:500) (Sigma)
  - anti-humán IgE, HRPO konjugátum (1:50) (Sigma)

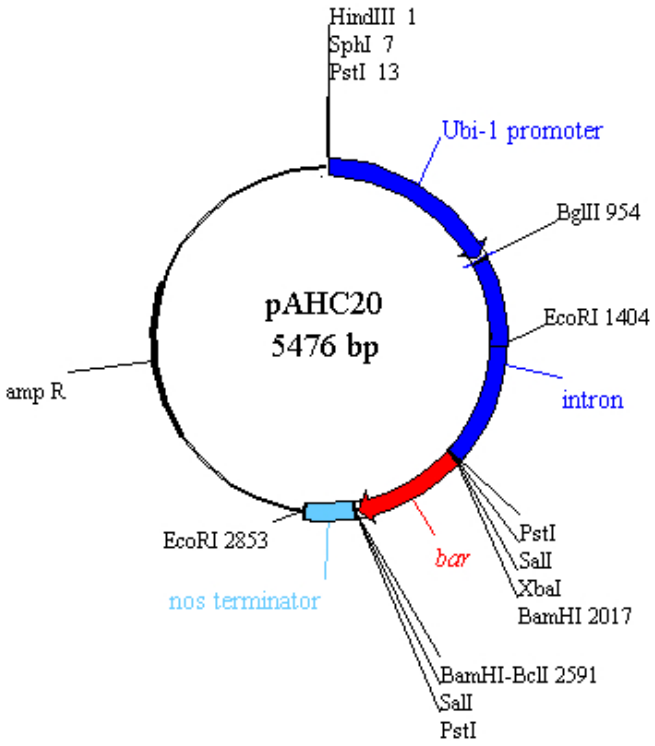
4.1.7. Egyéb anyagok, reagensek

- α-amiláz (Sigma)
- Dinitroszalicilsav
- Trim-W (Nutricepts)
- Gliadin (Sigma)
- Freund komplett, illetve inkomplett adjuváns (Sigma)
- WGA (Sigma)

4.2. Módszerek

4.2.1. Transzgénikus búzaminták előállítása

A vizsgálatokhoz felhasznált herbicid toleráns transzgénikus búzát a szegedi Gabonakutató Nonprofit Kft. kutatói Dr. Pauk János vezetésével PDS-1000/He részecske belövő berendezéssel hozták létre (PAUK et al. 1998). A transzformációhoz pAHC20 plazmid molekulát használtak (6. ábra). A szülői tulajdonságokat hordozó kontroll búza bázisán a hat független transzgénikus vonalat öt üvegházi ciklusban (generációban) szaporították fel. A többéves szelekció és szaporítás után meggyőződtek róla, hogy a vonalaik a bejuttatott génre nézve homozigóták, a transzgén stabilan öröklődik. A herbicid rezisztenciáért felelős gént (*bar*), mely kukorica ubiquitin promóter alatt működik, *Streptomyces hygroscopicus* baktériumból izolálták. Ez a gén azon túl, hogy a búzának Finale rezisztenciát kölcsönöz, a marker gén szerepét is betölti, mely lehetővé teszi a növény identifikálását és a (PAT^{+}) szelekcióját.



6. ábra: A pAHC 20 búza transzformációban használt plazmid (5476 bp) térképe a hasító helyekkel és enzimekkel (PAUK 2003)

4.2.2. Génmódosítás tényének igazolása PCR technikával

4.2.2.1. DNS kivonás és tisztítás

A DNS kinyeréséhez 200 mg búzamintához 860 µl DNS extrakciós puffert, 100 µl guanidin-hidrokloridot és 40 µl proteináz-K enzim oldatot adtam. A kapott kétfázisú rendszert Vortex segítségével összekevertem, és rázatás mellett 3 órán keresztül 55 °C-on inkubáltam. Az inkubálási idő leteltével a minták centrifugálása (10 perc, 12400 rpm) után, 450 µl felülúszóhoz 1 ml Wizard gyanta hozzáadása következett. Keverés után a kapott oldatot injekciós tű segítségével felszívtam és egy speciális Wizard-szűrőn átnyomtam (ZIMMERMANN et al. 1998). A szűrő átmosása 2 ml 80%-os izopropil alkohollal történt, majd lecentrifugáltam (2 perc, 12400 rpm) a maradék alkohol eltávolításához. A szűrőkre 50 µl előmelegített TRIS puffert mértem, majd egy perces várakozás után újabb centrifugálás következett (1 perc, 12400 rpm). A DNS oldat koncentrációját és a tisztaságára jellemző R értéket spektrofotometriás analízissel határoztam meg a 260 nm és 280 nm-en mért elnyelés hányadosa alapján. Amennyiben az R érték 1,7-2 között található, akkor megfelelő volt a tisztítás és kevés szennyeződés található a DNS-ben.

4.2.2.2. DNS sokszorozás

Bar gén specifikus PCR (EHLERS et al. 1994) reakció paraméterei 35 ciklusszám mellett:

- Hot start: 95 °C/3 perc, denaturáció: 95 °C/30 sec
- Primer kapcsolódás: 60 °C/30 sec
- Komplementer szál szintézise: 72 °C/30 sec
- Végső extenziós lépés: 72 °C/10 min

4.2.2.3. Termékanalízis

A termékanalízis 4%-os agaróz gélben történt (MANIATIS et al. 1989), 100 V állandó feszültség mellett 1 órán keresztül, LKB Midget Electrophoresis Unit készülékkel. A futtatás után a gélt az üveglapról leválasztva 15 percig etidium-bromiddal festettem, majd 15 percig desztillált vízzel differenciáltam. A gélt UV transzilluminátor alatt vizsgálva, megfelelő szűrőfeltét alkalmazása mellett KODAK EDAS 290 géldokumentációs rendszerrel fotóztam.

4.2.3. Beltartalmi paraméterek meghatározása

A nyersfehérje tartalmmat Kjeldahl analízissel Kjel-Foss Automatic 16210 berendezéssel határoztam meg (N x 5,70). A nedvesség tartalom súlyállandóságig történő szárítással (105 ºC, 3 h), a nyersrost tartalom Wende analízissel, a nyerszsír tartalmat Soxtec extrakcióval, a nyershamu tartalom pedig hamvasztással (600 ºC, 6 h) történt (A.O.A.C. 2000).

4.2.4. Aminosav összetétel meghatározása

A búzalisztek 10 mg-ját 10 ml-es injekciós ampullába mértem, majd 4 ml 3 mol/l koncentrációjú 0,2% triptamin tartalmú p-toluol-szulfonsav oldatot adtam hozzá. N_2-nel való átbuborékoltatás után (30 mp) az ampullát leforrasztottam. A hidrolízis 110 ºC-on, 24 órán át laboratóriumi szárítószekrényben történt. A hidrolízis idő lejárta és a minta szobahőmérsékletre hűtése után 4 ml 2 mol/l NaOH hozzáadását követően a térfogatot desztillált vízzel 10 ml-re egészítettem ki. Az oldatot centrifugálást (10 000 rpm, 15 perc) követően, 0,2 μm pórusméretű membránszűrőn (Millipore) átszűrtem és felhasználásig fagyasztva tároltam. Az aminosav összetétel meghatározása Biotronik LC 3000 aminosav analizátorral (Biotronik, Frankfurt, Németország) történt (PETRÓ-TURZA 1989). A kromatográfiás körülményeket az 5. táblázat foglalja össze. Az aminosavak kvantitatív értékelését standard aminosav elegy (2,5 μmol aminosav/ml) kromatogramjával történő összehasonlítás alapján végeztem.

5. táblázat: A kromatográfiás körülmények

Minta	p-toluol-szulfonsavval (3 mol/l) hidrolizált búza-őrlemény
Injektált minta mennyisége	20 μl
Eluáló puffer rendszer	Na-acetát
Áramlási sebesség	0.2 ml/perc
Elválasztó oszlop, gyanta	10 cm gyantaágy, kationcserélő, BTC 2410
Származékképzés	ninhidrin, poszt-kolonnás
Detektálás	570 és 440 nm
Nyomás	60 bar

4.2.5. Búzaminták oldhatóság szerinti frakcionálása

A búza fehérjefrakcióit OSBORNE (1907) szerint frakcionáltam, azzal a módosítással, hogy a só- és víz-oldható frakciót (albumin-globulin) együttesen nyertem ki.

4.2.6. Elektroforetikus fehérje elválasztás

4.2.6.1. Fehérjék elválasztása SDS-PAGE-val

A fehérjék molekulatömeg szerinti elválasztása akrilamid és biszakrilamid tartalmú 15%/6%-os elválasztó-/gyűjtőgélben, TRIS-SDS-glicin tartalmú futtatópufferrel történt Mini-PROTEAN 3 Cell készülékkel, beállított paraméterek (U= 200 V konstans, I=100 mA, P=20 W, t=75 perc) mellett. A mintákat TRIS-SDS-glicerin-β-merkapto-etanol tartalmú mintaoldó-pufferben oldottam, majd 5 percen keresztül forraltam a mintafelvitel előtt. A gél zsebeibe a minták felvitele előtt futtató-pufferben oldott brómfenolkék jelzőfestéket pipettáztam. Az elektroforézis befejezése után a gél 20 percre fixáló oldatba került. A maradék TCA eltávolításához a géleket háromszor 10 percig rázattam mosó oldatban. Ezután következett a gél 10 perces rázatása Coomassie Brilliant Blue R-250 festékoldatban, majd a fölösleges festék eltávolítása 7%-os ecetsav oldattal.

4.2.6.2. Fehérjék elválasztás Natív PAGE-val

A fehérjék elválasztása akrilamid és biszakrilamid tartalmú 10%-os gélben, TRIS-glicin tartalmú futtató-pufferrel történt Mini-PROTEAN 3 Cell készüléket alkalmazva, beállított paraméterek (U= 200 V konstans, I=47 mA, P=9 W, t=65 perc) mellett. A mintákat TRIS-glicerin-szacharóz tartalmú mintaoldó-pufferben oldottam. A gél zsebeibe a minták felvitele előtt futtató-pufferben oldott brómfenolkék jelzőfestéket pipettáztam. A futtatás után a gél fixálása és előhívása a 4.2.6.1.-ben leírtak szerint történt.

4.2.6.3. Fehérjék elválasztása savas PAGE-val

A fehérjék elválasztása akrilamid és biszakrilamid tartalmú 7%-os gélben Mini-PROTEAN 3 Cell készüléket alkalmazva, beállított paraméterek (U= 200 V konstans, I=400 mA) mellett történt.
A minták 0,01 ml dimetil-formamid oldattal történő extrahálását követően, a szuszpenzió centrifugálása után (10 perc, 10 000 rpm) a felülúszót 1:1 arányban mintaoldó pufferben hígítottam. A gél 20 perces ún. „előfuttatása” kálium-hidroxid/tejsav tartalmú futtató-puffer I. használata mellett történt. Az „előfuttatás” után a gyűjtőgélt is a főgél fölé öntöttem. A gél zsebeibe a minták

felvitele előtt futtató-pufferben oldott metil-zöld jelzőfestéket pipettáztam. A fehérjék anód felől katód felé való vándorlásának biztosításához, a futtatás során (t=80 perc) a kád katód (+) pólusába a negatív pólusú vezetéket kellett helyezni. Az elektroforézis befejezése után a szeparált fehérjék 20% triklór-ecetsav (TCA) oldatban történő fixálása (t=20 perc) következett. A TCA eltávolításához háromszor 10 percig rázattam a géleket PAGE-mosó oldatban. Ezután következett a gél 10 perces rázatása Coomassie Brilliant Blue R-250 festékoldatban, majd a felesleges festék eltávolítása 10% ecetsav-oldattal.

4.2.6.4. α-amiláz-inhibitor vizsgálata natív gélelektroforézist követően

A minták só és víz oldható frakciójának (4.2.5.) 10%-os natív gélen történő elválasztása után (4.2.6.1.) a géleket α-amiláz inhibitorra megfestettem (HENSON & STONE 1988). Az α-amiláz inhibitor festéshez a géleket, megfelelően higított alfa-amiláz standard oldatban (40 mM TRIS, 1 mM $CaCl_2$, pH 8) inkubáltam (20 perc, szobahőmérséklet). Ezt követte a gélek áztatása 1%-os keményítő oldatban (40 mM TRIS, 1 mM $CaCl_2$, pH 8). Alapos desztillált vizes öblítés után a gélek festése káliumjodidos jód oldattal (1 mM jód, 0,5 M kálium-jodid) történt.

4.2.7. Ellenanyagra alapozott immunanalitikai módszerek

4.2.7.1. Antigén–specifikus poliklonális ellenanyag előállítása

A poliklonális ellenanyagok termeltetése kb. 3 kg induló súlyú magyar vadas nyulakban történt. Először az antigén (WGA, gliadin) és komplett Freund adjuváns 1:1 elegyével, mely az antigént 25 µg/kg testtömeg koncentrációban tartalmazta, *subcutan* immunizáltam az állatokat (HARBOE & INGLID 1973). Az 1. immunizálást követő 14., 28., és a 42. napon inkomplett Freund adjuváns használatával megismételtem az immunizálást. Az utolsó oltást követő 8. napon a nyulak marginális vénájából vért vettem, és indirekt ELISA segítségével ellenőriztem a poliklonális ellenanyag megfelelő termelődését. A megfelelő titer esetén a nyulakból kinyert vért szobahőmérsékleten történő megalvadása után lecentrifugáltam (10 perc, 5000 rpm). Az IgG frakció tisztítása a felülúszóhoz 1:1 arányban állandó kevertetés mellett csepegtetett 70%-os telített ammónium-szulfát oldat (pH 7,4) hozzáadásával történt. A szuszpenzió lecentrifugálása (20 perc, 5000 rpm) után, a kapott csapadékot a nyers savó eredeti térfogatának fele-mennyiségében 0,15 M PBS-pufferben (pH 7,4) feloldva, megismételtem az ammónium-szulfátos kicsapást. A visszaoldott csapadék sómentesítése PBS-pufferrel szemben 24 órán keresztül, a PBS többszöri cserélése mellett dialízissel történt. A kapott ellenanyagot -20 ^{o}C-on tároltam.

4.2.7.2. Indirekt ELISA poliklonális ellenanyag munkahígításának megállapítására

5 μg/ml antigén kötőpufferben hígított 100 μl-s oldatát lekötöttem az ELISA lemez (Analyzer) mérőhelyeire, majd 1 éjszakán át 4 ºC-on inkubáltam. A lemez mérőhelyeit 3x250 μl/lyuk mosópufferrel (pH 7,4) mostam, majd a szabad kötőhelyeket 200 μl/lyuk fedőpufferrel (pH 7,4) blokkoltam, ezt követően inkubáltam (37 ^{o}C, 1 h). Ismételt mosást követően az antigén specifikus elsődleges ellenanyag PBS-ben (pH 7,4) felvett tovafutó hígításait (100 μl/lyuk) két ismétlésben, a lemez mérőhelyeire mértem és a lemezt inkubáltam (37 ºC, 1 h). Ismételt mosást követően az immunkomplexet a másodlagos enzimmel jelölt ellenanyag (anti-nyúl IgG kecske IgG, HRPO ellenanynag konjugátum) PBS-oldatban felvett hígításaival (100 μl/lyuk) inkubáltam (37 ºC, 1h). Ezt követte a lemezeket ismételt mosása, majd 100 μl OPD/H_2O_2 (pH 5,0) szubsztrát-oldattal való inkubálása (5 perc). A reakciót 50 μl/lyuk inhibitor-oldattal (3 M H_2SO_4) leállítottam és a kialakult szín abszorbanciáját PBS pufferrel készített vak-oldattal szemben, λ=492 nm-en, 630 nm referenciaszűrő mellett ELISA spektrofotométerrel mértem. A hígítási sor eredményeiből kapott titer görbe alapján meghatározhatóak az ellenanyag megfelelő hígításai a további vizsgálatokhoz.

4.2.7.3. Szendvics ELISA a PAT-fehérje kvantitatív meghatározására

A PAT-enzim mennyiségének meghatározására az AgrEvo GmbH (Frankfurt am Main, FRG) által kifejlesztett, kvantitatív PAT-ELISA (Art. No. 24016E07.FW, Steffens Biotechnische Analysen GmbH, Germany) kitet használtam. A teszt egy szendvics ELISA-ra alapozott gyors (3x30 perces inkubációs idő) és rendkívül érzékeny (detektálási határ: 0,4 ng PAT/ml) standard mikrotiter lemez rendszerű módszer. 100 mg mintát 500 μl extrakciós pufferben (az ELISA kit tartalmazta) 30 percig rázattam, majd 5 percig 5000 rpm-en centrifugáltam. Az előkészített minták felülúszójából 100-100 μl-t a PAT-fehérjére specifikus ellenanyaggal fedett mikrotiter lemez mérőhelyeire mértem. 30 perces, szobahőmérsékleten végzett inkubálás után, a mérőhelyekre 5x250 μl mosó pufferrel történő mosást követően, 100 μl munkahígításra elkészített, peroxidáz enzimmel jelölt PAT-fehérjére specifikus ellenanyag-konjugátumot mértem. A lemezt ismét 30 percig, szobahőmérsékleten rázatva inkubáltam és megismételtem a mosási lépést. Az enzimes reakciót 100 μl szubsztrát oldat hozzáadásával indítottam el, majd 30 perces inkubálás után a színkialakulást 100 μl inhibitor oldattal állítottam le. A kialakult abszorbanciát 650 nm-en mértem, automatikus rendszerű berendezésen (Dynatech MR 7000). A kvantifikáláshoz standard görbét (0,4-8,0 ng PAT/ml) használtam. Az eredményeket féllogaritmusos regressziós illesztés alapján számítottam és ng PAT/g mintára fejeztem ki.

4.2.7.4. Kompetitív ELISA WGA tartalom meghatározására

A minták WGA tartalmának meghatározására kompetitív indirekt ELISA-t fejlesztettem ki. A WGA meghatározásához 100 mg búzaőrleményt 500 µl 0,1 M N-acetil-glükóz tartalmú 0,15 M PBS (pH 7,4) pufferben extraháltam. A felülúszók 50 µl aliquot részét használtam a vizsgálatokhoz. 5 µg/ml gliadin, illetve WGA kötőpufferben hígított 100 µl-s oldatát 1 éjszakán át 4 ºC-on lekötöttem az ELISA lemez mérőhelyeire. A szabad kötőhelyeket 200 µl 0,5% zselatint tartalmazó fedő pufferrel blokkoltam (37 ºC, 1 h). WGA-ra specifikus nyúl IgG munkahígításának (1:4000) 50µl-ét és az ismeretlen WGA tartalmú minta tovafutó hígításainak (1:50, 1:100, 1:1000), vagy a standard görbe felvételéhez a WGA (Sigma, 10^{-3}-10^{3} µg/ml) hígításainak 50 µl-ét mértem fel a lemezre (37 ºC, 1 h) az immunkomplex kialakításához. A komplex kimutatására 100 µl peroxidáz enzimmel jelzett anti-nyúl IgG kecske IgG konjugátum (1:20 000) hozzáadása következett (37 ºC, 1 h). A színreakciót 100 µl szubsztrát oldattal szobahőmérsékleten alakítottam ki (5 perc). Az enzimreakciót 50 µl, 2 M H_2SO_4 oldattal állítottam le. A kialakult szín abszorbanciáját 0,01 M PBS (pH 7,4) pufferrel szemben, λ=492 nm-en, 630 nm referenciaszűrő mellett ELISA fotométerrel (Dynatech MR 7000) mértem. A hígításokat minden esetben 0,01 M PBS (pH 7,4) pufferrel végeztem. Minden inkubációs lépést megelőzően a reagens felesleget 0,1% Tween 20 tartalmú 0,01 M PBS (pH 7,4) pufferes mosással (3x250 µl) távolítottam el. A kvantifikáláshoz standard görbét használtam, amiből az eredményeket féllogaritmusos regressziós illesztés alapján számítottam ki.

4.2.7.5. Kompetitív ELISA gliadin tartalom meghatározására

A gliadin tartalom meghatározásához kompetitív indirekt ELISA módszert használtam a 4.2.7.4. fejezetben leírtaknak megfelelően. A minták előkészítéséhez 100 mg búzamintát 1 ml 70%-os etanollal 30 percig rázattam (IKA-SCÜTTLER MTS 4), majd lecentrifugáltam (10 perc, 5000 rpm). A meghatározáshoz nyúlban termelt (4.2.7.1.) gliadinra specifikus poliklonális IgG 1:400 hígítását használtam. A standard oldathoz gliadin (Sigma) 10^{-3}-10^{3} µg/ml hígításait alkalmaztam.

4.2.7.6. Immunblot analízis búza egyes allergén komponenseinek azonosítására

A fehérjék molekulatömegük szerinti szétválasztása után a fehérje alegységek 0,45 µm pórusméretű PVDF membránra (Millipore) transzfer pufferrel történő elektroforetikus átblottolása BIO-RAD Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell félszáraz rendszerű készülékkel történt. A megfutatott gélt (4.2.6.1.) katód pufferben áztattam (15 perc), majd a blottolás előtt a membránt 10 másodpercig etanolban, 2 percig desztillált vízben, majd 5 percig anód II. pufferben nedvesítettem át. A blottolás

a következő paraméterek mellett történt: U=0,25 V, I=0,08 mA/cm^2, t=1 h. A blottolás után a membránt 1 óráig 1%-os BSA fedőpufferben blokkoltam rázatás közben. A fehérjék blokkolása után a membránt háromszor, 10 percig PBS-oldattal mostam. Mosás után a membrán inkubálása PBS-oldatban megfelelően hígított elsődleges antitest-oldatban történt 1 éjszakán át, szobahőmérsékleten. Másnap háromszor 10 percig mostam a membránt PBS-oldattal. Mosást követően a membránt PBS-oldatban megfelelően hígított konjugátummal rázattam 1,5 órán keresztül. Az inkubáció után a membránt háromszor 10 percig PBS-pufferrel mostam, majd a 4-kloro-naftol szubsztrát-oldat hozzáadásával előhívtam az immunreaktív fehérjesávokat. Ezt követően a membránt desztillált vízzel mostam. A vizsgálatokhoz használt szérumok és ellenanyag konjugátumok és ezek munkahígításait a 4.1.6. fejezetben foglaltam össze.

4.2.8. Amiláz aktivitás meghatározása

A minták együttes α- és β-amiláz aktivitását dinitroszalicilsav (DNSA) reagens alkalmazásával, fotometriásan határoztam meg (DECKER 1977). A módszer az amiláz hatására felszabaduló redukáló csoportok mennyiségi mérésen alapszik, amely arányos a DNSA redukciójával. Mintaelőkészítéshez 5 g búza mintát 50 ml 0,1 M NaCl oldatban rázattam (90 perc, 175 rpm), majd lecentrifugáltam (15 perc, 5000 rpm) és a felülúszót használtam a további vizsgálatokhoz. Az α-amiláz aktivitásának méréséhez, a hőérzékeny β-amilázt 70 °C-on 15 percig inaktiváltam.

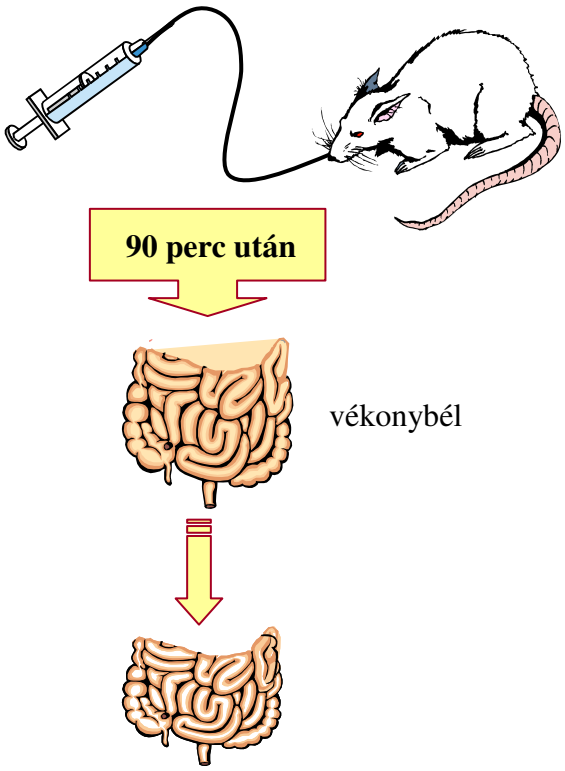
4.2.9. Marker fehérjék tápcsatorna rezisztencia vizsgálata

4.2.9.1. Membránon történő *in vitro* pepszines emésztés

Az *in vitro* emészthetőség meghatározására membránon történő pepszines emésztést követő immunblott módszert fejlesztettem ki. A só- és vízoldható frakcióit először SDS-poliakrilamid gélen megfuttattam (4.2.6.1.), majd a gélről a fehérjéket PVDF membránra átblottoltam (4.2.7.6.) Ezt követően a membránt 1 óráig 1%-os BSA fedőpufferben blokkoltam rázatás közben. A fehérjék blokkolása után a membrán mosása következett 3x10 percig PBS-pufferrel (pH 7,4). Mosás után a membránt 0,32%-os pepszin-oldatban rázatva inkubáltam (37 ^{o}C) 0, 60 és 90 percig. Ezt követően a membránt mostam, majd a 4.2.7.6. fejezetben leírtak alapján az elsődleges ellenanyaggal való rázatást követően folytattam a blottolás további lépéseit.

4.2.9.2. Marker fehérjék tápcsatornában történő túlélésének vizsgálata akut patkánykísérletben

PAT és WGA tápcsatornában történő túlélésének meghatározására HAJÓS és munkatársai (1995) módszerének módosításával módszert fejlesztettem ki. Az állatkísérletek a Budapest Fővárosi Állategészségügyi és Élelmiszer Ellenőrző Állomáshoz benyújtott „Állatkísérlet végzésére szóló állategészségügyi hatósági engedély iránti kérelem"-nek (ny.sz.65/2001) megfelelően történtek. A tenyészkerti kísérletekből nyert kezeletlen minták albumin-globulin frakcióját használtam fel a patkány-intubációs kísérlethez (7. ábra). A kifejlett immunrendszerű hím Wistar patkányokat (TOXI-COOP Kft.) négy napon keresztül *ad libitum* 16%-os fehérjetartalmú (tojásfehérje 16%, kukoricaolaj 10%, ásványi anyag és vitaminpremix 5%, kukoricakeményítő ad 100%) táp és víz *ad libitum* fogyasztása mellett csoportos anyagcsere ketrecben tartottam. A kísérleti napon nyolc órás tápmegvonást követően, 0,2 ml fiziológiás sóoldatban feloldott 40 mg víz- és sóoldható búzafehérje frakciót (4.2.5.) hajlékony gyomorszondán keresztül jutattam be az állatokba (5 állat/tesztcsoport). 90 perc elteltével az állatok öntudatvesztést okozó kábítása (cervicalis diszlokáció) mellett, életük kioltása azonnal halált okozó módszerrel (dekapitálás) történt. A vért vizsgálati célból felfogtam és a teljes kivérzést követően feltártam a hasüreget és eltávolítottam a gyomrot és a beleket.



Só és vízoldható frakció (4.2.5.) bevitele gyomorszondán keresztül (4.2.9.2.)

Vékonybél mosása a béllumenben túlélő marker fehérjék meghatározásához (4.2.9.3.)

Vékonybél extrakciója a falhoz kötődött marker fehérjék kinyeréséhez (4.2.9.3.)

7. ábra: WGA tápcsatornában történő túlélésének vizsgálatának lépései

4.2.9.3. Biológiai minták előkészítése

Gyomor és béllumen tartalom kinyerése: A gyomor, illetve a vékonybél tartalmának 1%-os proteináz inhibitor, aprotinin (4 TIU/mg) tartalmú fiziológiás sóoldattal (2 ml, illetve 5 ml) történő kimosását követően a kapott oldatot lecentrifugáltam 10 perc, 2400 rpm, 4 °C) (KJERRULF et al. 1997). A felülúszóhoz 10 µl/ml 100 nM PMSF tartalmú PBS oldatot adtam. Az oldat ismételt lecentrifugálása után (20 perc, 21 000 rpm, 4 °C) a felülúszóhoz 10 µl/ml 100 nM PMSF tartalmú PBS oldatot és 10 µl/ml 1% nátrium azid oldatot adtam. 15 perc szobahőmérsékleten történő inkubálást követően 50 µl/ml BSA oldat hozzáadása után az oldat ismételt centrifugálása következett (20 perc, 21 000 rpm, 4 °C). A felülúszót -20 °C-on tároltam a további vizsgálatokhoz.
A bélfalhoz kötődött WGA kinyerése: A luminális folyadék kinyerése után a vékonybelet 5 ml 0,1 M N-acetil-glükóz-amin-tartalmú 0,15 M PBS oldattal extraháltam a bélfalhoz kötött WGA tartalom meghatározásához, majd lecentrifugáltam (20 perc, 21 000 rpm, 4 °C). A felülúszót -20 °C-on tároltam a további vizsgálatokhoz.

4.2.9.4. A tápcsatornában túlélt WGA és PAT fehérje kvantitatív meghatározása

A luminális folyadék mintákból, a gyomor tartalmakból a 4.2.7.3. fejezetnek megfelelően a túlélő PAT tartalmat szendvics ELISA módszerrel határoztam meg. A luminális folyadékban és gyomor tartalomban túlélő, illetve a bélfalhoz kötődött WGA mennyiségét pedig kompetitív ELISA módszer segítségével, a 4.2.7.4. fejezetben leírtak szerint határoztam meg.

4.2.10. A búza fehérje biológiai értékének meghatározása

4.2.10.1. A fehérje tápértékének meghatározása *in vitro* módszerrel

Az alapanyagok *in vitro* tápértékét a vizsgált fehérje aminosav tartalmának a FAO/WHO/UNU (1985) által elfogadott referencia fehérjére adott esszenciális aminosav tartalmára vonatkoztatott minimális százalékos hányadával, azaz a Chemical Score (CS)-értékkel és a hozzá tartozó limitáló aminosavval jellemeztem. Az aminosavak analízisét a 4.2.4. fejezetben leírtak szerint végeztem.

$$CS = (\frac{a_{i,j}}{a_{i,r}})_{\min} x100$$

$a_{i,j}$= a minta i-edik esszenciális aminosavának mennyisége (g/16 gN)

$a_{i,r}$= a referenciafehérje i-edik esszenciális aminosavának mennyisége

4.2.10.2. Fehérje hasznosulás vizsgálata növekedésben lévő patkányok nitrogén-egyensúlyi kísérletében

A tenyészkerti kísérletekből nyert kezeletlen szülői búza (CY-45Ø) és transzformált (T-128Ø) vonal fehérje hasznosulását vizsgáltam. A vizsgálatokat hőkezelt (100 ºC, 20 perc) mintákra (H) is kiterjesztettem. Az állatok izo-energetikus és izo-protein tartalmú tápot fogyasztottak a tesztcsoportban (fehérje 10%, kukoricaolaj 10%, ásványi anyag és vitaminpremix 5%, kukoricakeményitő ad 100%). Az 1. évi tenyészkerti minták etetési kísérletei alapján, a kizárólag búzából származó 10%-os fehérje bevitel csupán az endogén veszteségek pótlására volt elegendő és lényeges testtömegnövekedés nem történt. Ezért a 2. évi tenyészkerti teszttápoknál a 10%-os fehérjetartalmú diéta fehérjéjének 50%-át a jól hasznosuló tojásfehérjével helyettesítettem. A teszttápok a patkány igényszintjének megfelelően tápanyag- és ásványi anyag premix kiegészítést kaptak. A kísérletbe 10% tojásfehérjét (TOFE) fogyasztó kontroll csoportot is beállítottam. Az endogén nitrogén veszteségek tesztelésére pedig fehérjementes (4% tojásfehérje) kontroll csoportot (FMK) indítottam. A teszttápok összetételét a 6. táblázat tartalmazza.

6. táblázat: A teszttápok összetétele (g/100 g)

Tápok	**FMK**	**TOFE**	**CY-45Ø**	**CY-45H**	**T-128Ø**	**T-128H**
Búza	---	---	35,2	35,2	33,8	33,8
Tojásfehérje	4,6	11,7	5,8	5,8	5,8	5,8
Kukoricaolaj	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Vitamin premix	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
NaCl	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
ÁP-17	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Kukorica keményítő	79,4	62,3	43	43	44,4	44,4

A fehérje hasznosulást növekedésben lévő 21 napos, hím, választási (Wistar) patkányok N-egyensúlyi kísérletében vizsgáltam. Az állatok a TOXI-COOP Kft. tenyészetéből származtak. A tápadaptációs periódust követően az állatokat válogatott testtömeggel (79-80 g) csoportokba (5 állat/csoport) osztottam és *random* elhelyezésű, egyedi anyagcsere ketrecbe (8. ábra) különítettem el. Az előkísérleti (3 nap) és a kísérleti (5 nap) szakaszban az állatok táp és víz fogyasztása *ad libitum* történt. Az első három nap a megfigyelési szakasz része volt, a N-egyensúlyra vonatkozó adatgyűjtés a következő 5 napban történt. A kísérlet során mértem az állatok testtömeg változásának mértékét, majd az egységnyi fehérje-bevitelre jutó testtömeg növekedés mértékével jellemeztem a nettó fehérje arányt (NPR). A diétával bevitt N-mennyiségének meghatározásához a tápbemérés és tápvisszamérés az etetőből naponta, illetve a vizelettel és széklettel ürülő N-mennyiségének meghatározásához a vizelet- és székletgyűjtés a gyűjtőtartályokból szintén naponta történt. A különböző minták fehérjetartalmát Kjel-Foss félautomata fehérje-meghatározó berendezésen három párhuzamos méréssel végeztem. Az eredményeket az egységnyi fehérje bevitelre jutó fehérje beépítés mértékével jellemeztem, azaz a nettó fehérjehasznosulás mértékével (NPU). A széklettel ürülő N-veszteség adatokból kiszámítottam a diéta valódi emészthetőségét (TD). Az NPU értékeket korrigálva a tápfehérje emészthetőségével végül megkaptam a vizsgált fehérje biológiai értékét (BV). A kísérlet során vizsgált paramétereket az alábbiakban ismertetett egyenletek alapján számíthatók ki (PELLET & YOUNG 1980).

Nettó fehérjearány (NPR-Net Protein Ratio)

$$\frac{(M_{t8}-M_{t3}) - (M_{k8}-M_{k3})}{I} = NPR \quad (g/gN)$$

Valódi emészthetőség (TD-True Digestibility)

$$\frac{I - (F - F_k) \bullet 100}{I} = TD \quad (\%)$$

Biológiai érték (BV-Biological Value)

$$\frac{NPU}{TD} \bullet 100 = BV\ (\%)$$

Nettó fehérjehasznosulás (NPU) számítása:

$$\frac{I - (F - F_k) - (U - U_k) \bullet 100}{\bar{I}} = NPU\ (\%)$$

M_{t8}-M_{t3}= a kísérleti állat testtömeg változása (g)

M_{k8}-M_{k3}= a kontrollcsoport átlagos testtömeg változása (g)

I (Intake nitrogen) = a kísérleti állat által elfogyasztott nitrogén mennyisége (g)

F (Faecal nitrogen) = a kísérleti állat légszáraz székletének nitrogén-tartalma (g)

F_k= a kontrollcsoport légszáraz székletének átlagos nitrogén-tartalma (g)

U (Urinary nitrogen) = a kísérleti állat vizeletének nitrogén tartalma (g)

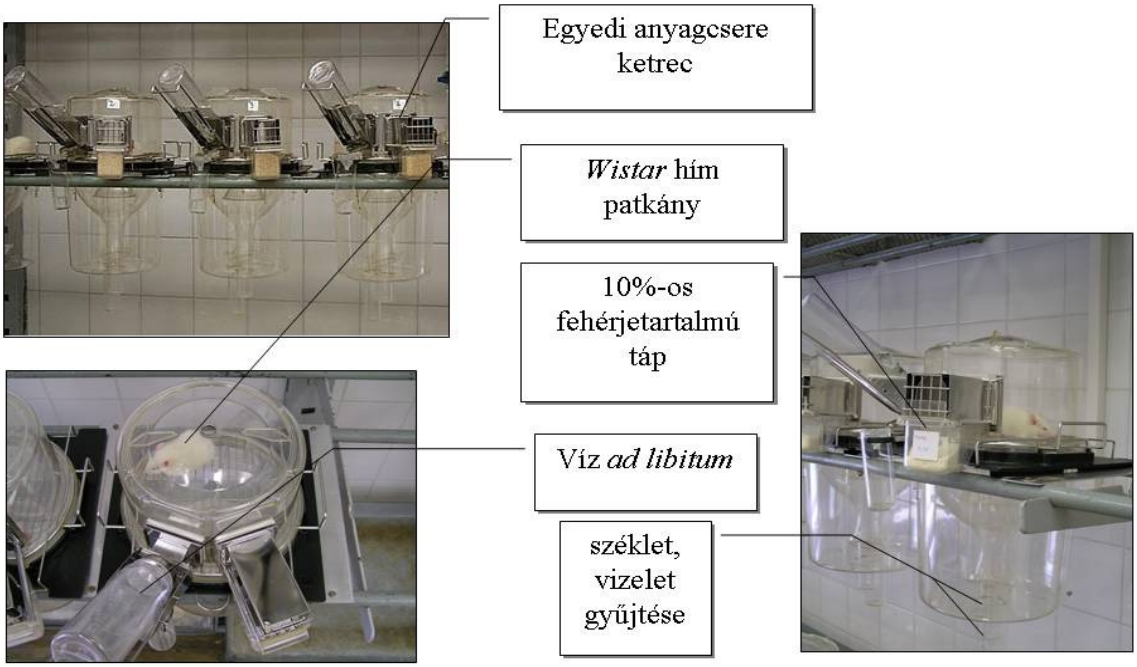
U_k = a kontrollcsoport vizeletének nitrogén tartalma (g)

TD = valódi emészthetőség (%)

BV = biológiai érték (%)

NPR = az átlagos nettó fehérjearány (g/g N vagy g/16 g N)

NPU= Nettó fehérjehasznosítás (%)



8. ábra: Egyedi anyagcsere ketrec felépítése

4.2.11. Statisztikai kiértékelés

Az eredmények statisztikai kiértékeléséhez SPSS 11.0 statisztikai programot használtam. A szülői és a 6 transzformált búzavonal közötti összehasonlítást variancianalízissel (ANOVA) vizsgáltam KEMÉNY és DEÁK (2000) útmutatásai szerint. A szórásnégyzetek azonosságának vizsgálata, amely a varianciaanalízis alapfeltétele, Levene-próbával történt. Ezt követően F-próbával

megnézzük, hogy van-e különbség a csoportok várható értéke között. Ha az eltérés 95%-os valószínűséggel szignifikánsnak tekinthető, akkor a tervezett összehasonlításokat Fisher-féle LSD módszerrel, amikor az összes várható érték egyenlőségére végzett F-próba nem adott szignifikáns eredményt, az összehasonlításokat Bonferroni módszerrel végeztem.

A genetikai módosítás hatására bekövetkező változásokat kontroll csoporttal való összehasonlítással vizsgáltam (ismétlések száma: n=3, mintaelemszám: N=21). A kezeletlen minták esetében kontroll csoportként a szülői kezeletlen búzatörzset (CY-45Ø), a herbicid kezelt mintáknál pedig a Granstarral kezelt szülői búza törzset (CY-45G) alkalmaztam.

A két tenyészkerti év összehasonlítását két mintás t-próbával (n=3, N=120), a herbicid kezelés hatására bekövetkezett változásokat pedig varianciaanalízissel értékeltem ki (n=3, N=60).

5. KUTATÁSI EREDMÉNYEK

5.1. A szülői búza és a genetikai módosítás jellemzése

5.1.1. A szülői búza genotípus kiválasztása

A genetikailag módosított növények biztonságos felhasználása szempontjából fontos vizsgálni, hogy milyen növénybe történik az új információ bevitele, azaz mi a befogadó szervezet. PAUK és munkatársai (2003) a génbelövéshez jól kalluszosodó búza genotípusok éretlen embrióit izolálták, hogy a transzformációs munkához fiatal, differenciálatlan sejtek álljanak rendelkezésre. Négy búza genotípus közül három őszi búzát (GK Délibáb, GK Góbé, GK Kunság) és egy tavaszi CY-45 genotípust hasonlítottak össze három fontos szövettenyésztési tulajdonság (izolálás után kihajtott embriók száma, kalluszosodási százalék, növényregenerálás) szemszögéből (7. táblázat). A kísérleti szempontból minél alacsonyabb kihajtási százalék, és minél magasabb kalluszosodási százalék a megfelelő, amely paraméterekben a CY-45 genotípus adta a legjobb értékeket. A kalluszokat hat cikluson keresztül passzálták, és ezt követően végezték el a növényregenerálási kísérletet. Félévig tartó havonkénti passzálással modellezték a génbelövést követő szelekciós szakaszt és a transzgénikus növényregenerálást, amely tulajdonságban szintén a CY-45 tavaszi *Triticum aestivum* búzatörzs mutatkozott a legjobbnak, ezért a transzformációs kísérletekhez ezt a genotípust választották ki.

7. táblázat: Búza genotípusok kiválasztása génbelövéshez: izolált éretlen embriók csírázási-, kalluszosodási- és a kalluszok növényregenerálási százalékának eredménye (PAUK 2003)

Fajta	**Kihajtott embriók (%)**	**Kalluszosodás %**	**Növényt regeneráló kalluszok (%)**
GK Délibáb	18	78	39
GK Góbé	8	85	50
CY-45	2	97	72
GK Kunság	11	88	49

5.1.2. A transzformáció jellemzése

PAUK és munkatársai elsőként hoztak létre totális herbiciddel szemben toleráns búzát (PAUK 1998). A transzgénikus búza kukorica ubiquitin promóter működtetése mellett, baktérium eredetű *bar* gént hordozó plazmidot tartalmaz (4.2.1.). A géntechnológia számos élelmiszerbiztonsági kérdést felvet. A transzformációhoz a veszélyforrás csökkentése érdekében jelen esetünkben második generációs növényi eredetű kukorica ubiquitin promótert használtak, a potenciálisan több biológiai veszélyt hordozó virális eredetű promóterek helyett. A transzformációhoz használt *bar* gén amellett hogy herbicid rezisztenciát kölcsönöz a búzának, a marker gén szerepét is betölti. A transzformációhoz használt génkazetta tehát nem tartalmaz antibiotikum rezisztenciát kölcsönző marker gént, amely takarmányozási és humán-egészségügyi szempontból szintén kétségeket ébreszt az állatba és emberbe, esetleg talaj mikroorganizmusokba átvihető antibiotikum rezisztencia miatt (BARBOSA et al. 1999). A transzgénikus vonalak transzformációjához részecske génbelövéses módszert használtak (PAUK 2003). A random beépülés következtében attól függően, hogy a transzgén hova épül be az endogén genomba, előfordulhatnak nem várt hatások, pl. ha a transzgén egy genomban található gén közelébe épül be, kikapcsolhatja annak működését, vagy éppen túlműködést eredményezhet (PUSZTAI & BARDÓCZ 2006).

5.1.3. A *bar* gén kifejeződésének vizsgálata tenyészkerti körülmények között

A tenyészkerti kihelyezést követően a *bar* génre nézve már homozigóta vonalakkal rendelkeztek a T_5 generációban. A tenyészkertbe kihelyezett herbicid toleráns és a szülői tulajdonságokat hordozó vonalak egy-egy csoportját totális herbiciddel (Finale 14SL), melyre a transzgénikus vonalak rezisztenciát hordoznak, illetve a búzafajtákra regisztrált, hagyományos (Granstar) gyomirtószerrel kezelték. A hat transzgénikus vonal és a kontroll búza első évi tenyészkerti kihelyezését követően látható (9. ábra), hogy a Finale 14SL permetezést követő második hét végére a nem-transzgénikus szülői CY-45 búza teljesen elszáradt, míg a *bar* gént hordozó transzgénikus vonalak a permetezést minden károsodás nélkül túlélték (PAUK 2003).

9. ábra: A tenyészkertbe kibocsátott hat totális herbiciddel szemben ellenálló búza vonal és a szülői kontroll törzs a herbicid kezelést követően az első évi tenyészkerti kihelyezéskor

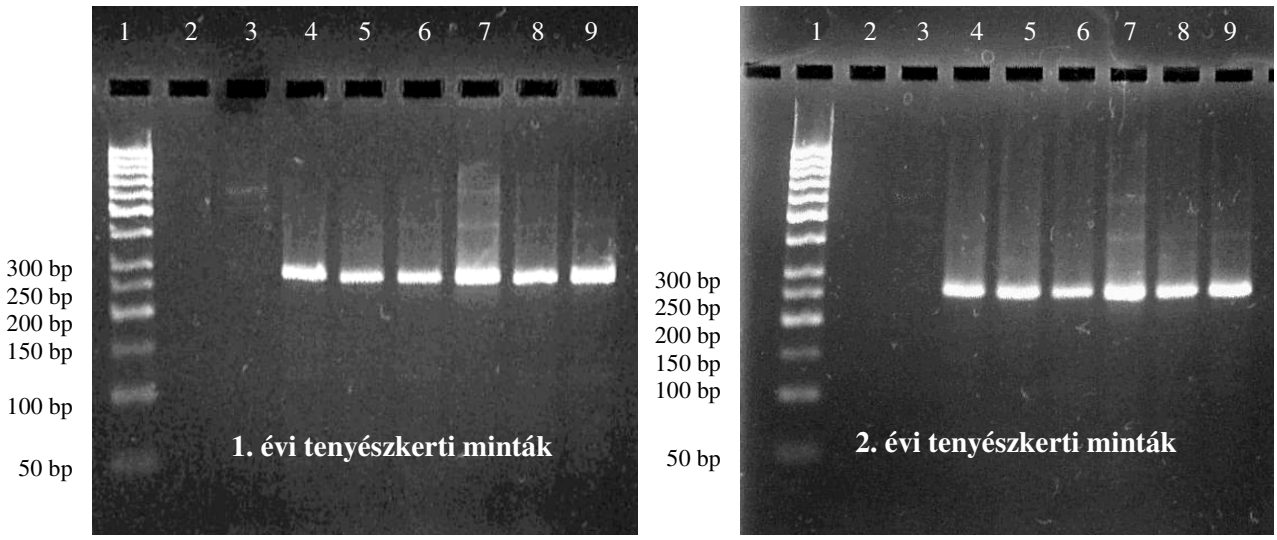
5.1.4. A *bar* gén jelenlétének kimutatása PCR technikával

A *bar* gén jelenlétének igazolására *bar* gén specifikus PCR technikát alkalmaztam (4.2.2.) a tenyészkerti búzaminták esetében. A kimutatás első lépése a megfelelő minőségű és mennyiségű DNS izolálása. A DNS kinyerése és tisztítása a búzamintákból Wizard módszerrel történt (4.2.2.1.). A búzamintákból kinyert DNS oldatok tisztaságát jellemző (R) átlagértékei (8. táblázat) minden esetben elérték az 1,7 értéket, tehát megfelelő tisztaságúak voltak a további vizsgálatokhoz.

8. táblázat: A tenyészkerti kezeletlen búzamintákból származó DNS oldatok összesítő adatai

Minták	R érték		Koncentráció	
	Átlag	Szórás ±	µg DNS/ 50µl minta	Szórás ±
1. évi tenyészkerti minták	1,80	0,04	49,40	8,90
2. évi tenyészkerti minták	1,72	0,05	45,93	5,86

A tenyészkerti szülői kontroll (CY-45Ø), valamint a transzformált búzavonalakból származó *bar* gén specifikus PCR termékek detektálásának elektroforézises képei a 10. ábrán láthatóak. A felhasznált *bar* gén specifikus primer segítségével sokszorozott PCR termék 264 bp hosszúságú. 0,5 µl primer és 100 ng DNS minta felhasználásával a *bar* gén specifikus terméksáv minden esetben jól detektálható volt a transzgénikus vonalakban. A szülői búza esetében nem jelent meg detektálható terméksáv.



10. ábra: A tenyészkerti kezeletlen búzamintákból származó bar gén specifikus PCR termékek elektroforetogramja (1. bázispár standard; 2. negatív kontroll; 3. CY-45Ø; 4. T-106Ø; 5. T-116Ø; 6. T-117Ø; 7. T-124 Ø; 8. T-128 Ø; 9.T-129 Ø)

5.1.5. A herbicid toleráns búza terméshozamának vizsgálata a tenyészkerti kísérletben

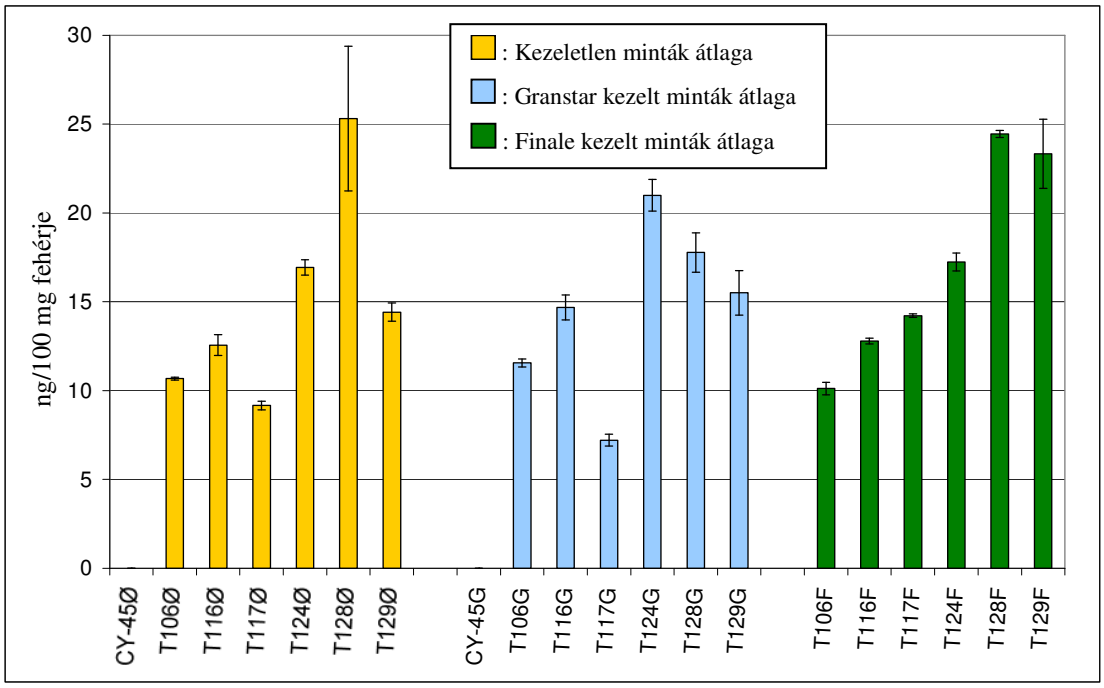
A szülői és transzformált vonalak agronómiai szempontból való összehasonlítása érdekében PAUK és munkatársai tenyészkerti körülmények között vizsgálták, hogy a genetikai transzformáció befolyásolja-e a tavaszi búza termőképességét (PAUK 2003). A kísérleti körülmények az 1. évi tenyészkerti kísérletben megfelelőek, ideálisak voltak. A szülői genotípus (CY-45) termése mind a Granstarral kezelt, mind a kezeletlen parcellákon magasabb volt, mint bármely transzformált vonal termése. Az egy sorozat miatt, a kísérlet statisztikailag nem értékelhető, de a tendencia szembetűnő. A 2. évi tenyészkerti évben a jelentős szárazságra készülve, a kísérleti területet már április hónapban esőztető öntöző berendezéssel telepítették be és a tenyészidő során háromszori alkalommal 40 mm öntözővizet jutattak ki a kísérleti területre. Ennek köszönhetően a tavaszi búza vonalak ideálisan fejlődtek a nagy hőség és szárazság ellenére. Az 1. évi tenyészkerti tendencia jellegű megállapítás, hogy a genetikai transzformáció a terméseredményben depressziót okozott a nem-transzgénikus szülőhöz képest, a 2. tenyészkerti eredmények alapján csak a kezeletlen és

Granstar-ral kezelt kísérleti mintákra volt igaz. A Finale-val kezelt kísérleti blokkban a parcellák átlagtermése magasabb volt, mint a másik két blokkban. Itt a recipiens fajtára (CY-45) nagy szükség lett volna a korrekt elemzéshez, de a kísérlet jellegéből adódóan kipusztult. PAUK és munkatársai (2003) a 3. évi tenyészkerti kihelyezést követően is vizsgálták a szülői és transzformált vonalak temőképességét. A szülői genotípust letakarással védték a totális herbicid elleni pusztitástól, annak érdekében, hogy a terméseredményét össze tudják hasonlítani statisztikailag a kezelt transzgénikus parcellák eredményével. A 3. tenyészkerti kísérletben az extra hosszú telet forró és aszállyal sújtott tavasz és nyár követte. A szokottnál melegebb tavaszi időjárás és az aszály a tavaszi búza tenyészidejét három-négy héttel lecsökkentette. A stresszes időjárást esőztető öntözéssel próbálták ellensúlyozni, de az aszály kártételét csak kis mértékben tudták csökkenteni. A szülői és a transzgénikus törzsek termőképességét összehasonlítva, a transzgénikus vonalak statisztikailag igazolhatóan nem különböznek a szülői genotípustól. Egyedül a Granstarral kezelt minták két transzgénikus vonala (T-116G és T129G) mutatott szignifikánsan jobb termőképességet, mint a szülői törzs. Ugyanakkor a kezeletlen búzaminták kísérleti átlaga szignifikánsan jobb volt, mint bármelyik herbicides kezelés kísérlet átlaga, ami azzal magyarázható, hogy a herbicidkezelések a nagy melegben fokozott stresszként hatottak a növényekre, ami terméscsökkenésben mutatkozott meg.

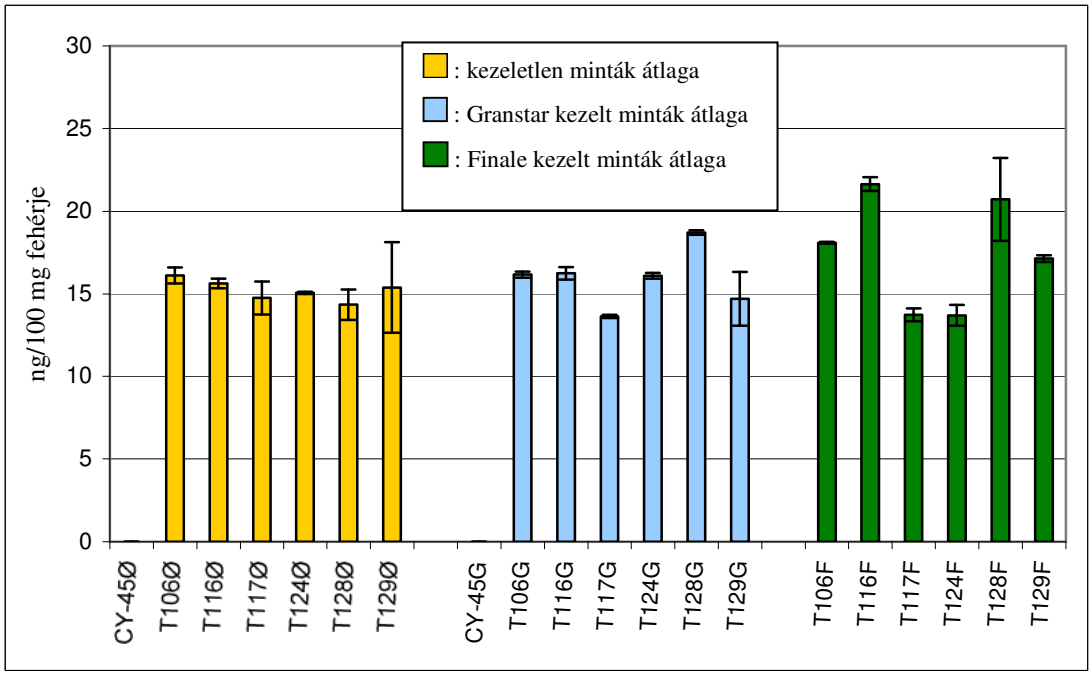
5.1.6. A *bar* gén által expresszált fehérje jellemzése

A *bar* gén által expresszált fehérje a PAT (Phosphinotricin acetyl transpherase) enzim, mely acetyl-CoA jelenlétében az L-ppt (foszfinotricin) szabad amino-csoportjának acetilezésével a herbicid inaktiválását végzi. Az enzim által lebontott herbicid így nem gátolja az L-glutamináz szabad működését a növényben, mely az L-glutamin és ammónia felhasználásával történő fehérje szintézisért felelős. A kutatások azt mutatták, hogy a keletkező metabolit nem toxikus és az enzim szubsztrát specificitása igen nagy (HEROUET et al. 2005). Így, a PAT enzim nem acetilezi az L-ppt analógokat, mint az L-glutaminsav, D-ppt, vagy más fehérjét és szabad aminosavat. A *bar* gén sikeres működésének igazolására a gén expressziós termékeként megjelenő PAT enzim szintjének meghatározására az Agrevo által kifejlesztett kvantitatív szendvics-ELISA módszert (4.2.7.3.) alkalmaztam. A tesztet a *pat* gén által kódolt PAT fehérje meghatározására fejlesztették, amely erős homológiát, 85%-os aminosavszekvencia azonosságot mutat a *bar* gén által expresszált PAT fehérjével (WEHRMANN et al. 1996). A búzákban mért PAT fehérje tartalmat a 11. és 12. ábrán mutatom be. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a módszer 0,4-1,8 ng PAT/ml méréstartományban lineáris volt (r^2=0,9822).

A szülői tulajdonságokat hordozó kontroll (CY-45Ø, CY-45G) búzáminták a méréshatár alatti abszorbancia értéket mutattak, azaz a PAT fehérje a kontroll mintákban nem volt kimutatható. Az összes transzgénikus vonalban mindkét tenyészkerti évben vizsgálva sikerült kimutatnom detektálható PAT fehérje tartalmat.



11. ábra: Az 1. évi tenyészkerti búzaminták PAT fehérje tartalmának (ng/100 mg fehérje) szendvics ELISA eredményei



12. ábra: A 2. évi tenyészkerti búzaminták PAT fehérje tartalmának (ng/100 mg fehérje) szendvics ELISA eredményei

Összefoglalásképpen megállapítható, hogy vizsgált transzformált vonalak mindegyikében kimutattam a *bar* gén jelenlétét (5.1.4.), és a *bar* gén által expresszált PAT fehérje kifejeződését.

5.2. Komponens összetétel vizsgálata

A szülői búza (CY-45) és a transzgénikus vonalak fő összetevőit (nyersfehérje, nyerszsír, nyersrost számított szénhidrát és nyershamu tartalom) azzal a céllal hasonlítottam össze, hogy a fő tápanyag- és energiahordozókban történt-e lényeges változás a transzformáció vagy a gyomirtószeres kezelések hatására. A szülői kontroll búza és transzgénikus vonalak kezeletlen és herbicid kezelt mintáit 2 tenyészkerti év távlatában vizsgáltam.

A búzaminták nyersfehérje tartalmának szárazanyagra vonatkoztatott adatai a 13. és 14. ábrán láthatóak, míg a nyerszsír, nyersrost, szénhidrát, hamu, nedvesség tartalom összefoglaló táblázata a 2. mellékletben található (M2).

A vizsgált búzaminták szárazanyagra vonatkoztatott fehérje tartalmának statisztikai kiértékelését a 3. melléklet foglalja össze (M3).

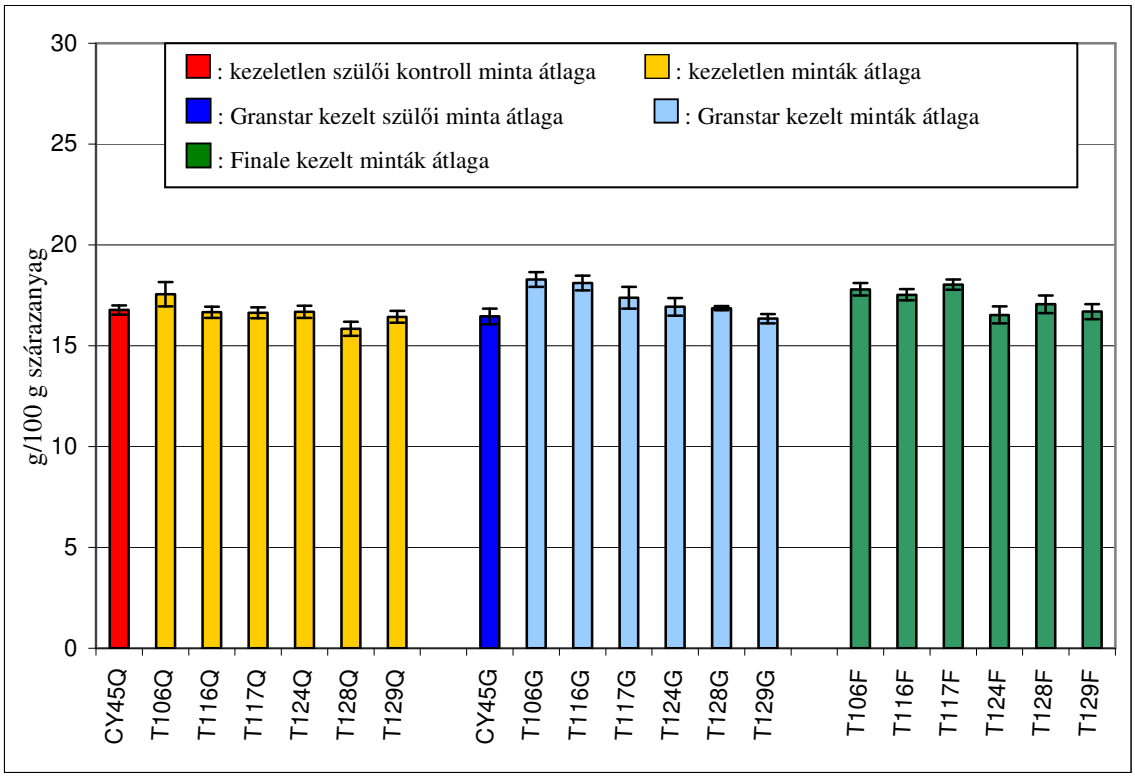
Géntechnológia hatása (M3/1-6. ábra): A búzáminták szárazanyagra vonatkoztatott fehérje tartalmának vizsgálatánál megállapítható, hogy egyes transzgénikus vonalak (T-116Ø, T-117Ø, T-124Ø) fehérjetartalma szignifikánsan megnő a szülői búzához képest (CY-45Ø) a 2. évi kezeletlen mintáknál. A herbicid kezelt minták esetében mindkét évjáratban több vonalnál (2001: T106G-F, T116G-F, T117G-F; 2002: T116F, T117F, T124F, T129F) szignifikáns növekedés volt tapasztalható fehérjetartalmuk vizsgálatánál a szülői herbicid kezelt (CY-45G) mintához hasonlítva. Ugyanakkor a transzgénikus vonalak fehérjetartalmát nagyfokú variabilitás jellemezte az egymás közötti összehasonlításban. A T-116-os és T-117-es vonalnál megfigyelhető, hogy amíg az 1. évi kezeletlen minták esetében nem különböznek szignifikánsan a szülői búzavonaltól, a 2. évben, amikor a fehérjetartalom átlagosan lecsökken, mindkét herbicid kezelés hatására szignifikáns növekedést eredményeztek.

Évjárat hatása (M3/7. ábra): A búzaminták fehérjetartalmát az évek függvényében vizsgálva megállapítható, hogy a 2. évi tenyészkerti mintáknál a fehérjetartalom szignifikáns csökkenést mutatott, az 1. évi tenyészkerti mintákhoz képest. A 2. tenyészkert évében (2002), melyet a csapadékhiány és légköri aszály jellemzett az Országos Mezőgazdasági Minősítő Intézet vizsgálata szerint a Magyarországon vizsgált búza minták átlagos fehérje tartalma magasabb értékeket adott, a 2001-es évi búzamintákhoz képest (FVM 2001, FVM 2002). Ugyanakkor a Csongrád megyei - ahol a kísérleti búzaminták tenyészkerti kísérlete történt - búzaminták átlagos fehérjetartalma 2001-ben az országos átlagtól nagyobb, a 2002 évben az átlagtól kisebb fehérjetartalommal jellemezhető.

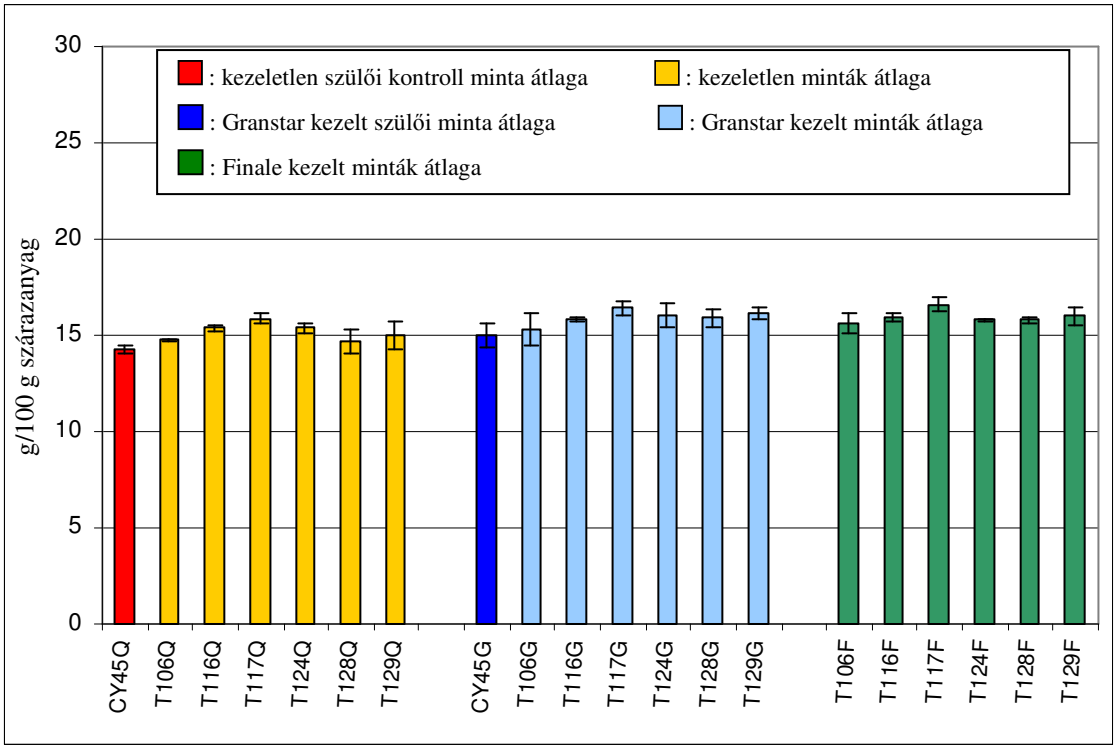
Ebből adódóan az általam vizsgált évjáratok közti fehérjetartalom különbség a tenyészkert helyi adottságával is magyarázható.

Herbicid kezelés hatása (M3/8. ábra): A Granstar és a Finale herbicid kezelés viszont szignifikáns növekedést eredményezett mindkét tenyészkerti évben vizsgálva a kezeletlen gyomlált minták fehérjetartalmához hasonlítva. A két herbicid kezelés között azonban nem volt tapasztalható szignifikáns különbség a fehérjetartalom összehasonlításakor.

A búzaminták szárazanyagtartalomra vonatkoztatott nyersrost, nyerszsír és hamu tartalmában sem a géntechnológia, sem a herbicid kezelés nem okozott lényeges változást. A búzaminták szénhidráttartalmának eredményeiből megállapítható, hogy a 2. évi fehérjetartalomban történő csökkenés a szénhidráttartalomban való növekedéssel járt együtt (M2).



13. ábra: Az első évi tenyészkerti búzaminták fehérje tartalma (g/100g szárazanyag)



14. ábra: A 2. évi tenyészkerti búzaminták fehérje tartalma (g/100g szárazanyag)

Összességében megállapítható, hogy a szülői és transzformált vonalak több esetben is eltértek fehérjetartalmukban, az eredményekre hatással volt az évjárat és a herbicid kezelés is.

5.3. Marker fehérjékben bekövetkezett változások vizsgálata

A génpuskával történő génbeillesztés nem szabályozott folyamat, amelynek eredménye random génbeillesztés, kópiaszámbeli különbség, amely nem várt génexpressziót eredményezhet, ezért nagyobb vagy kisebb specifikus fehérje expresszió, míg gén szétesés miatt módosult fehérje expresszió jöhet létre. A genetikai módosítás nem várt hatásai, valamint a biotikus és abiotikus stresszhatások, és a herbicid kezelés hatásának vizsgálatára különböző marker fehérjéket választottam. Ennek megfelelően vizsgáltam a só- és víz oldható frakcióban található fontos gabona allergén fehérjéket, mint a WGA, az α-amiláz inhibitor, a szerpin és az amilázok. Ez utóbbiak vizsgálata technológiai szempontból is fontos lehet. Az alkohol oldható gabonaallergia és a lisztérzékenység szempontjából is fontos szerepet játszó gliadinokat is monitoroztam.

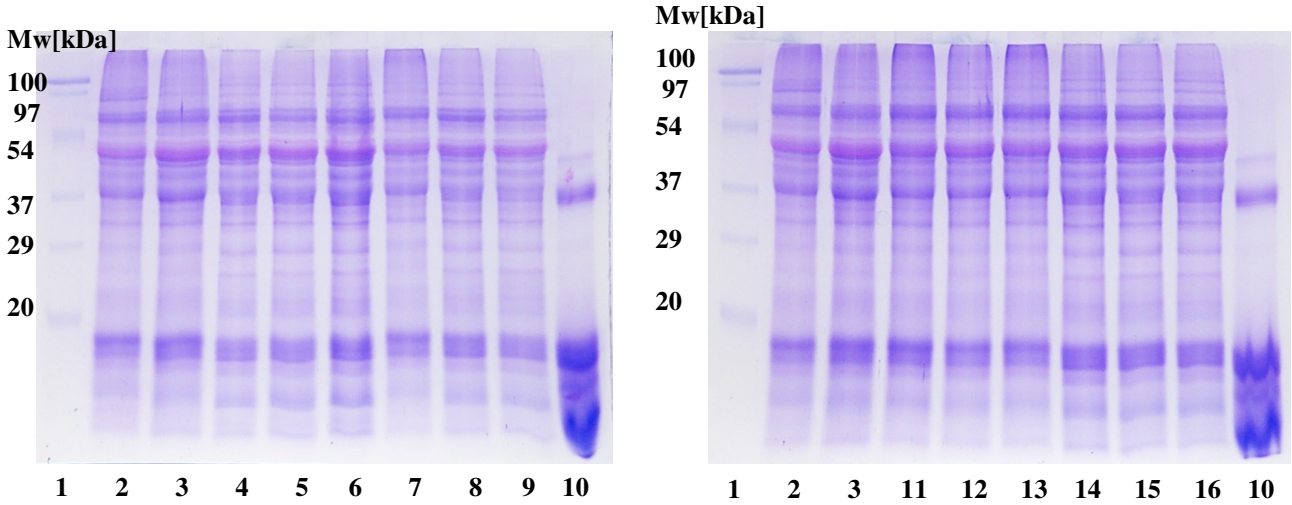
A gabona allergének kvantitatív jellemzésére a WGA-t választottam, amelyre WGA-specifikus ELISA-tesztet fejlesztettem ki. A cöliákia szempontjából fontos allergének kvantitatív meghatározására a KÉKI Biológiai Osztályán kifejlesztett gliadin-specifikus ELISA-t adaptáltam. A fehérjefrakciókban bekövetkezett változások nyomon követése SDS-PAGE módszerrel történt. A

potenciális allergének felismeréséhez gabona allergia, illetve cöliákia klinikai tüneteire igazolt humán hiperimmunszérumokat használtam fel. Az amiláz inhibitorok azonosítása natív PAGE-val történt, melyet fehérje szeparálást követően enzimfestéses méréssel végeztem. Megfelelő standardok alkalmazásával módom volt ez utóbbiak félkvantitatív meghatározására is. Az amilázok meghatározását enzimaktivitás alapján fotométeresen végeztem.

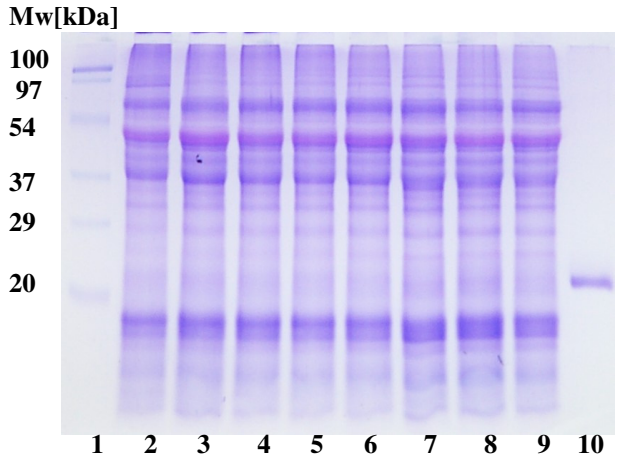
5.3.1. A só- és vízoldható fehérjefrakciók vizsgálata

A búzaminták só- és vízoldható frakcióinak kinyerését követően (4.2.5.) SDS-PAGE-val vizsgáltam a főbb fehérje frakciók megoszlását (4.2.6.1.). Az 1. évi tenyészkerti szülői és transzformált búzavonalak molekulatömeg szerinti elválasztási képét a 15. és 16. ábra mutatja be. Az ábrán látható, hogy frakciók elválasztási képe hasonló fehérjemintázatot mutatott, azonos molekulatömeg tartományokban kapott sávokkal jellemezve.

Érdemi különbség a kontroll és a transzgénikus búzavonalak között nem mutatható ki ezzel a technikával, legfeljebb a sáverősségben jelentkezett gyenge eltérés. A só- és vízoldható frakcióban található marker fehérjékben bekövetkezett esetleges változásokat további vizsgálatokra terjesztettem ki. A 2. évi minták vizsgálata hasonló eredményekhez vezetett, ezért ezeket az eredményeket külön nem mutatom be.



15. ábra: Az 1. évi tenyészkerti búzaminták só és vízoldható frakciójának SDS-PAGE elválasztási képe (1. LMW, 2. CY-45Ø, 3. CY-45G, 4. T-106Ø, 5. T-106G, 6. T-106F, 7. T- 116 Ø, 8. T- 116G, 9. T-116F, 10. α-amiláz inhibitor és szerpin tartalmú TRIM-W, 11.T-117Ø, 12. T-117G, 13. T-117F, 14. T-124Ø, 15. T-124G, 16. T-124F)



16. ábra: Az 1. évi tenyészkerti búzaminták só és vízoldható frakciójának SDS-PAGE elválasztási képe (1. LMW, 2. CY-45Ø, 3. CY-45G, 4. T-128Ø, 5. T-128G, 6. T-128F, 7. T- 129Ø, 8. T- 129G, 9. T-129F, 10. WGA)

5.3.2. WGA tartalom vizsgálata

A WGA a búza só- és vízoldható frakciójában található ismert allergén, keresztallergén és mitogén tulajdonságú lektin. Az 1. évi és 2. évi tenyészkerti szülői és transzgénikus búzaminták WGA tartalmát kompetitív indirekt ELISA-val határoztam meg (4.2.7.4.). Az eredmények a 17. és 18. ábrán, az adatok statisztikai kiértékelése a 4. mellékletben található (M4).

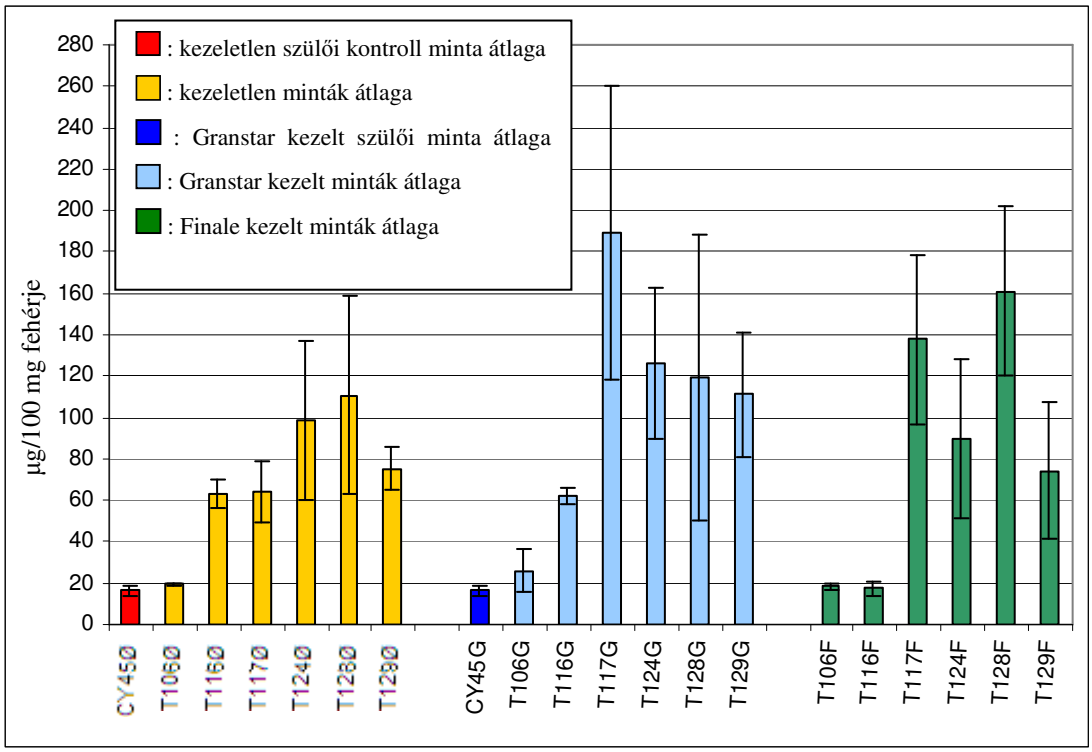
Géntechnológia hatása (M4/1-6. ábra): Az 1. évi kezeletlen tenyészkerti mintáknál szignifikáns növekedés tapasztalható a transzgénikus vonalakban a szülői kontroll (CY-45Ø) búzához képest. A többi transzgénikus vonaltól eltérően a T-106-os vonalat, a szülői kontroll búzára jellemző alacsony WGA tartalom jellemezte, mind a kezeletlen, mind a herbicid kezelt mintáknál. Mindkét herbicid (Finale, Granstar) kezelést követően a transzgénikus vonalaknál megmaradt ez a szignifikáns növekedés a herbicid kezelt szülői búzához (CY-45 G) képest. Ugyanakkor a transzformált vonalak WGA tartalmát nagyfokú variabilitás jellemezte.

A 2. évi tenyészkerti kezeletlen minták WGA tartalmában nem jelentkezett szignifikáns különbség sem a kontroll és a transzgén vonalak, sem a transzgén vonalak között. A herbicid kezelt mintáknál viszont, habár több transzgénikus búzavonalnál is szignifikáns növekedést tapasztaltam, (T-106G, T-117G, T-128G, T-129G, T-117F, T-129F) a vonalakat jellemző nagy variabilitás miatt két esetben (T-106F, T-124F) szignifikáns csökkenést mutattam ki a Granstar kezelt szülői búza WGA tartalmához képest.

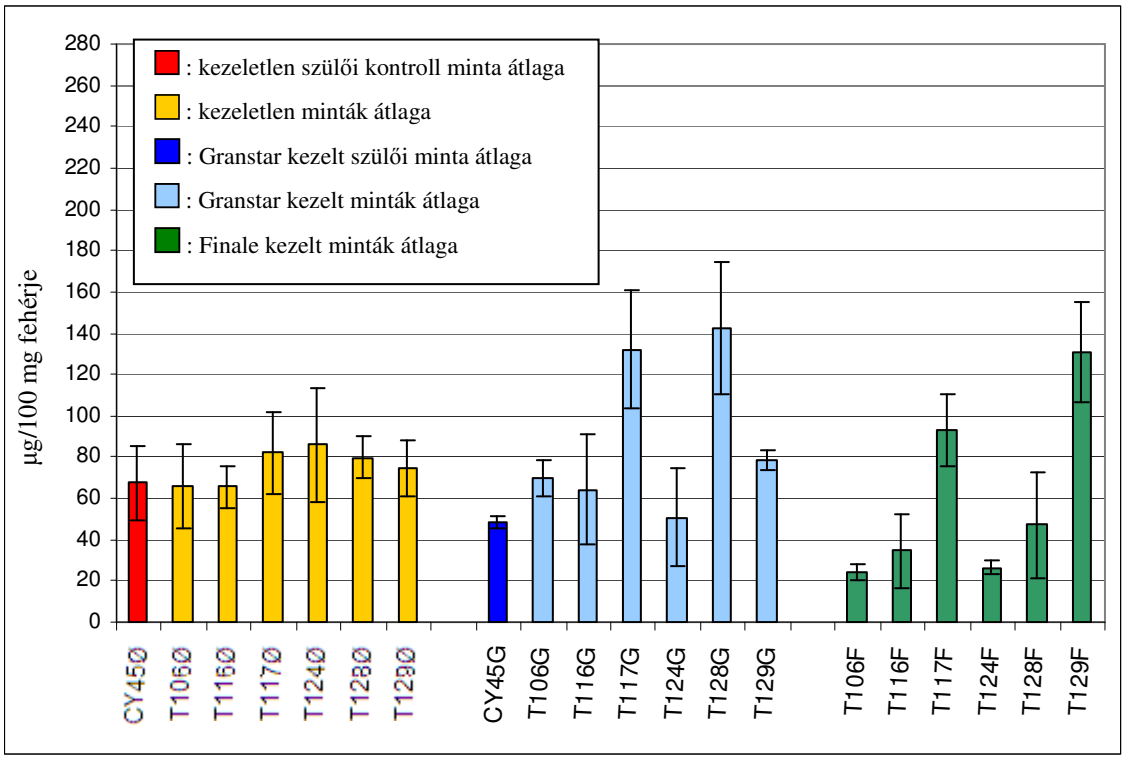
HALÁSZ és munkatársai (2007) a 3. évi tenyészkerti szülői és T-128 kezeletlen vonal WGA immunreaktivitását 2D gélelektroforézist követő immunblott technikával vizsgálták. Immunreaktív monomer izolektin A1-t (WGA1- 21 kDa, pI 8,7) és a monomer izolektin A2-t (WGA2- 21 kDa pI 7,7) identifikáltak anti-WGA ellenanyaggal, amely a transzformált vonalnál erősebb intenzitással jelentkezett. A WGA, mint stresszjelző faktort több kutató is jellemezte. A búza különböző szöveteiben vizsgálva a WGA felhalmozódását, növekedését tapasztalták különböző stressz hatására (KOMAROVA et al. 2003, BHAGLAL et al. 1999, CAMMUE et al. 1989).

Évjárat hatása (M4/7): Az 1. és 2. évi tenyészkerti minták WGA tartalmának összehasonlításakor, a vonalaknál tapasztalt nagy változatosság miatt is, nem mutattam ki szignifikáns különbséget.

Herbicid kezelés hatása (M4/8): A kezeletlen és a két herbicid kezelés hatásának összehasonlításakor sem tapasztaltam jelentős különbséget.



17. ábra: Az 1. évi tenyészkerti búzaminták WGA fehérje tartalma (µg/100 mg fehérje) kompetitív indirekt ELISA-val meghatározva



18. ábra: A 2. évi tenyészkerti búzaminták WGA fehérje tartalma (µg/100 mg fehérje) kompetitív indirekt ELISA-val meghatározva

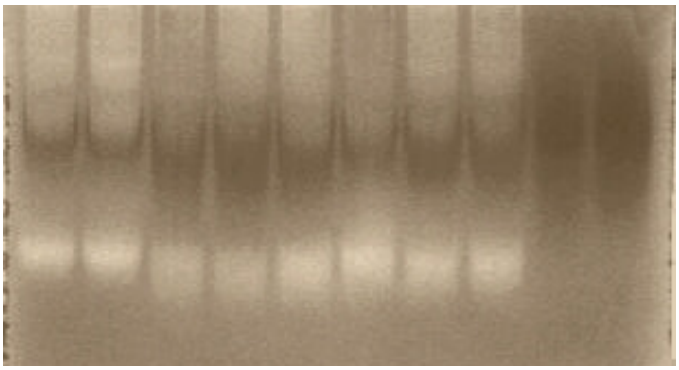
Az eredmények alapján elmondható, hogy több transzgén vonal esetében is a WGA tartalom jelentősen nagyobb volt. Ez a tény a rezisztencia nemesítés szempontjából kedvező is lehet, de élelmiszer-biztonsági szempontból kockázati tényezőként kell figyelembe venni. Ugyanakkor a WGA tartalom a fehérjében jelentéktelen nagyságrendű, amely táplálkozási szempontból nem valószínű, hogy kimutatható változásokat eredményezhet. Allergia szempontjából ugyanakkor továbbra is fennállhat a kockázat.

5.3.3. α-amiláz inhibitor aktivitása

A búza allergénként is ismert α-amiláz inhibitor védőfehérje, amely a patogénekben lévő amilázok működését gátolva fejti ki hatását. Az amiláz inhibitorok kimutatásának és aktivitásának meghatározására natív poliakrilamid-gélelektroforézist követő negatív enzimfestést alkalmaztam (4.2.6.4.). A szülői búza és a T-128, illetve T-129-es transzformált búzavonal mindkét évi tenyészkerti kezeletlen és herbicid kezelt mintájának α-amiláz inhibitor aktivitásra specifikusan festett elektroforetogramja a 19. és 20. ábrán látható. A gélképek videodenzitométeres kiértékelését a 9. táblázat tartalmazza.

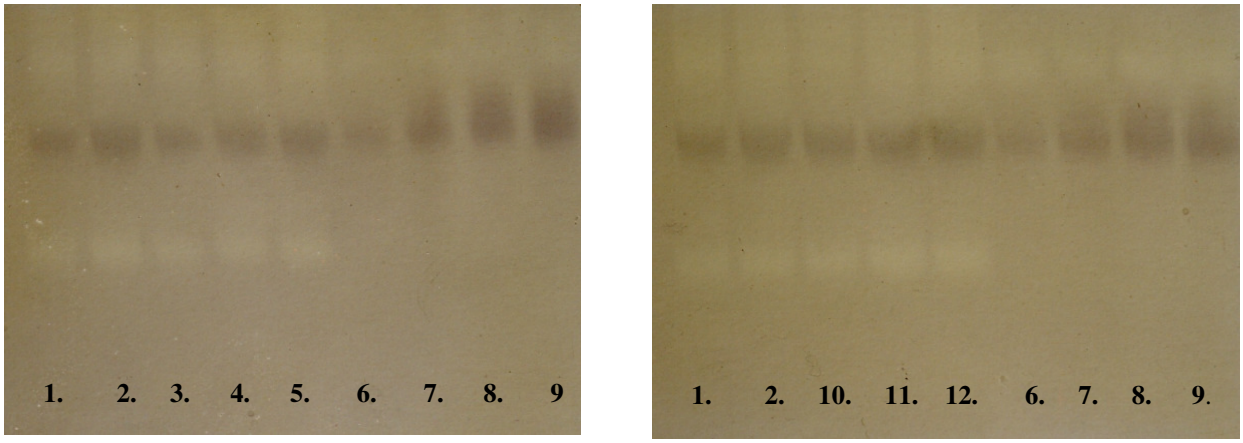
Mindkét évben megfigyelhető volt, hogy a szülői kezeletlen vonalhoz képest mind a T 128-as mind a T 129-es vonal intenzívebb -amiláz inhibitor festődést mutatott. HORVÁTH-SZANICS és munkatársai (2005) az általam is vizsgált szülői és transzformált vonalakat üvegházi kísérletben szárazság stressznek tették ki, azaz a növényt optimális fejlődéséhez elegendő vízmennyiségének egyharmadával látták el, majd 2 dimenziós elektroforézist követő MALDI-MS technikával vizsgálták fehérje összetételüket. A szárazság-stressznek kitett szülői és transzgénikus búza vonalak fehérje-térképében eltérést mutattak ki az alacsonyabb molekulatömegű fehérjék tartományában. A transzgénikus vonalakban megjelenő α-amiláz/tripszin inhibitor CM1 prekurzort, egy 0,19 dimer α-amiláz inhibitort, egy endogén α-amiláz/szubtilizin inhibitort és egy 27K proteint mutattak ki, azt a következtetést levonva, hogy a vizsgált transzgénikus búza vonalak érzékenyebbek a szárazság-stresszre.

A herbiciddel kezelt mintákban a szülői kontroll búzánál és a kezeletlen transzgénikus vonalaknál is tovább erősödött az α-amiláz inhibitorra specifikusan festett sávok intenzitása (9. táblázat).



1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10.

19. ábra: A natív SDS PAGE-t követő α-amiláz inhibitor festés (1. évi tenyészkerti minták) gélképe (1. CY 45Ø , 2. CY 45G, 3.T128Ø , 4. T128G, 5. T128F, 6.T129Ø , 7. T129G, 8. T129F 9. 0,1 mg AAI, 10. 0,16 mg AAI)



20. ábra: A natív SDS PAGE-t követő α-amiláz inhibitor festés (2. évi tenyészkerti minták) gélképe. (1. CY 45Ø , 2. CY 45G, 3.T128Ø , 4. T128G, 5. T128F, 6. 0,1 mg AAI, 7. 0,13 mg AAI, 8. 0,16 mg AAI, 9. 0,19 mg AAI, 10.T129Ø , 11. T129G, 12. T129F)

9. táblázat: A natív SDS PAGE-t követő α-amiláz inhibitor festés (2. évi tenyészkerti minták) gélképén kapott sávok videodenzitométeres kiértékelése

	2001		**2002**	
Minták	terület (pixel)	%	terület (pixel)	%
CY45Ø	850	100	1160	100
CY45G	990	116	2060	177
T128Ø	1050	123	1460	126
T128G	1170	138	1590	137
T128F	1430	168	2300	198
T129Ø	1030	121	1670	143
T129G	1410	165	1830	157
T129F	1600	188	1910	164

Összefoglalva megállapítható, hogy a vizsgált transzgénikus vonalakban az α-amiláz inhibitor tartalommal arányos enzimaktivitás nagyobb volt. Ez a tény a rezisztencia nemesítés szempontjából, a patogének elleni védekezésben kedvező tényező lehet. Ugyanakkor élelmiszer-biztonsági szempontból ez is hordozhat bizonyos kockázatot, mivel a funkcionálisan aktív amiláz inhibitorok a tápcsatornában gátolhatják a szénhidrát hasznosítását. Így, alacsonyabb energia felhasználás mellett kedvezőtlenebb fehérjehasznosulásra lehet számítani. Ugyanakkor ez függ az inhibitor hőstabilitásától és a diétával bejutó dózisterheléstől is. Jelentéktelen fehérje arány mellett csak kismértékű hatással számolhatunk. Allergia szempontjából itt is fennállhat a kockázat.

5.3.4. Amiláz aktivitás

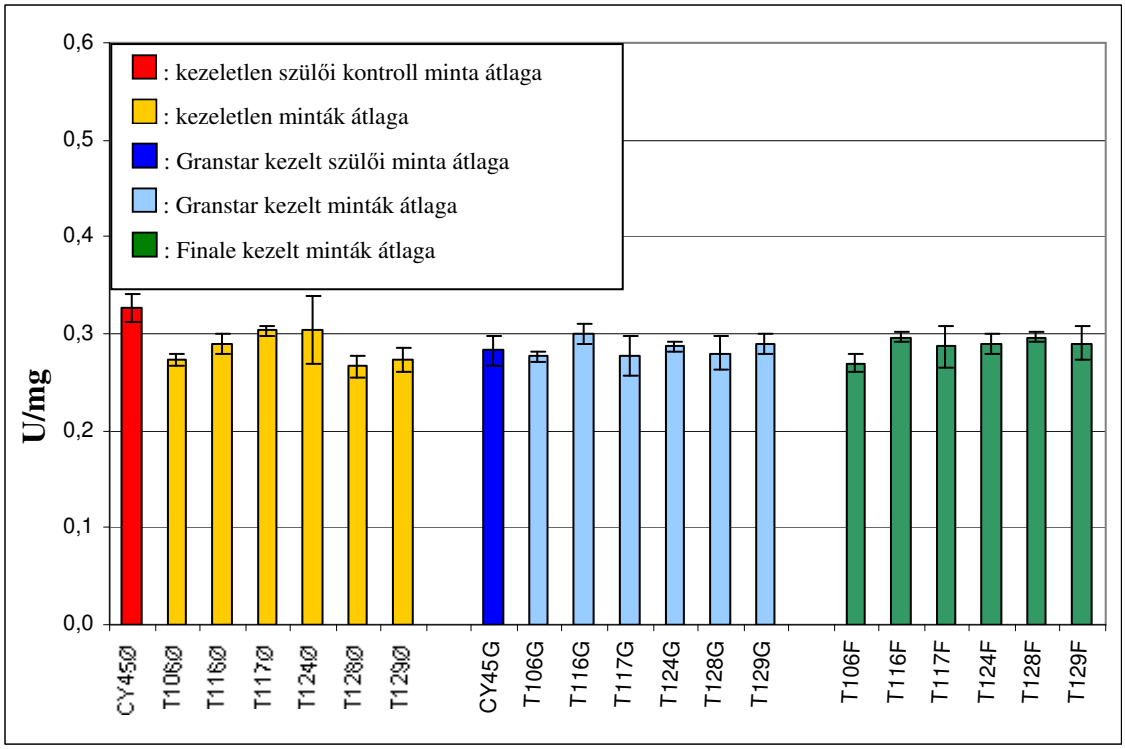
A kísérletek kiterjedtek az amilázok vizsgálatára is, amelyek közül a β-amilázok búza allergénként felismert fehérjék, illetve a keményítőbontásban szerepet játszó, technológia szempontból legfontosabb enzimek. A tenyészkerti búzavonalak só- és vízoldható fehérjéinek α-amiláz és össz-amiláz aktivitását fotométeres enzimaktivitás méréssel határoztam meg (4.2.8.). Az eredményeket a 21-22. ábrákon foglaltam össze. A statisztikai számítások eredményeit az 5. melléklet tartalmazza.

Géntechnológia hatása (M5/1-6. ábra). Az egészséges, nyugvó magvakban megfelelően alacsony α-amiláz aktivitást mértem. A szülői és a transzformált vonalak α-amiláz aktivitását összehasonlítva csak az 1. évi kezeletlen mintáknál mutatkozott szignifikáns különbség a búzavonalak között. Ebben az esetben a szülői búzához képest négy vonal (T-106Ø, T-116Ø, T-128Ø, T-129Ø) esetében az aktivitás szignifikáns csökkent. Ugyanakkor az 1. évi herbicid kezelt mintáknál és a 2. évi kezeletlen és herbicid kezelt minták esetében sem mutatható ki szignifikáns különbség a szülői és transzformált vonalak között.

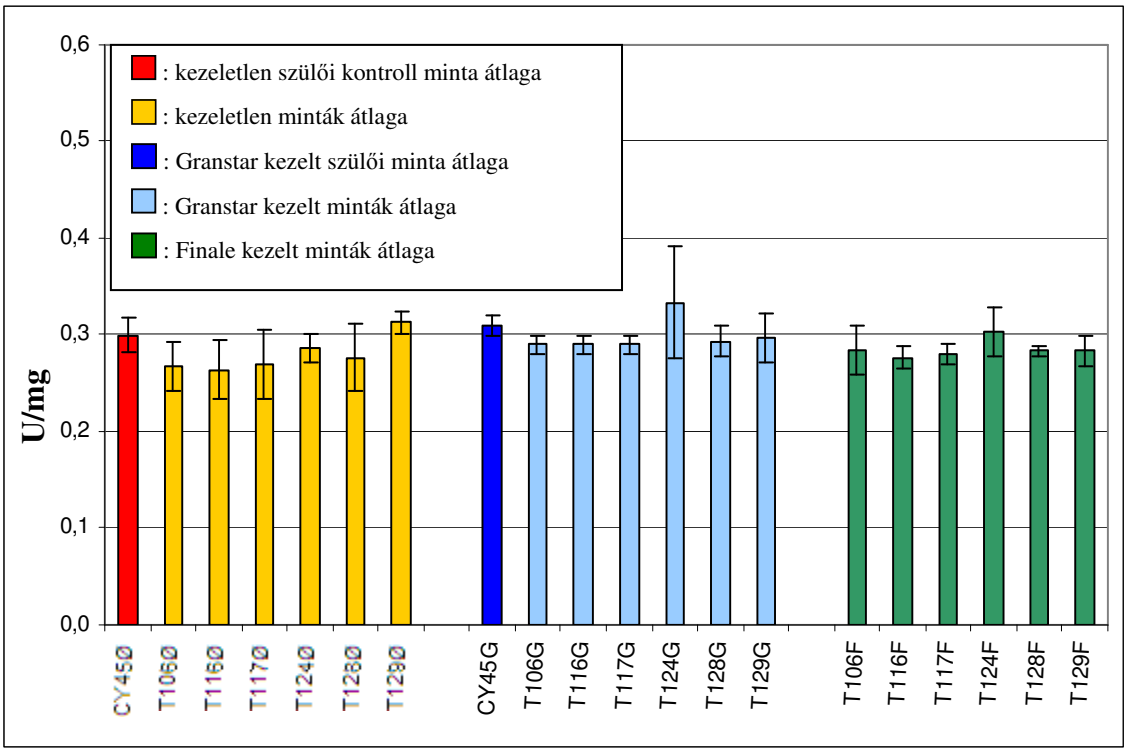
Évjárat hatása (M5/7. ábra). A két tenyészkerti évet összehasonlítva nem tapasztaltam lényeges különbséget az évjáratok között.

Herbicid kezelés hatása (M5/8. ábra). A herbicid kezelések (Finale, Granstar) egyik évben sem okoztak szignifikáns eltérést a kezeletlen mintákhoz képest.

Az α-amiláz enzim aktivitással fordítottan arányos, sütőipari minőséget mutató mérőszám a Hagberg féle esésszám. PAUK és munkatársai (2003) a 2. évi kezeletlen mintáknál átfogó minőségvizsgálatot végeztek a szülői és transzformált búzavonalakból készült kenyerekből. Több sütőipari minőséget jellemző paraméter vizsgálata mellett megmérték a Hagberg féle esésszámot is, amely optimális esetben 250-350 s értéket ad, de a 350 s-nál magasabb esésszám sem okoz gondot a feldolgozó iparnak, ellentétben a 250 sec alatti búzákkal. Vizsgálataiknál magas esésszámú értékeket kaptak a szülői és a transzformált vonalak esetében is, ami alátámasztja a búzavonalakban általam tapasztalt alacsony α-amiláz aktivitás értékeket. Esetükben mind a hat vizsgált transzformált vonal magasabb esésszám értéket mutatott (540-596 s) a szülői búza törzzsel összehasonlítva (521 s). Az esésszámnál tapasztalt növekedést az α-amiláz aktivitás csökkenésében csak tendencia szinten tapasztaltam, szignifikáns csökkenést nem mutattam ki a transzformált vonalakban a szülői búzához hasonlítva.



21. ábra: Az 1. évi tenyészkerti búzaminták α-amiláz aktivitása (U/mg)



22. ábra: A 2. évi tenyészkerti búzaminták α-amiláz aktivitása (U/mg)

A nem csirázott búza nagyobb mennyiségben tartalmaz β-amilázt, mint α-amilázt, ennek megfelelően az össz-amiláz aktivitás mérésénél egy nagyságrenddel magasabb aktivitás értékeket mértem (23. és 24. ábra). A statisztikai számítások eredményeit a 6. mellékletben található.

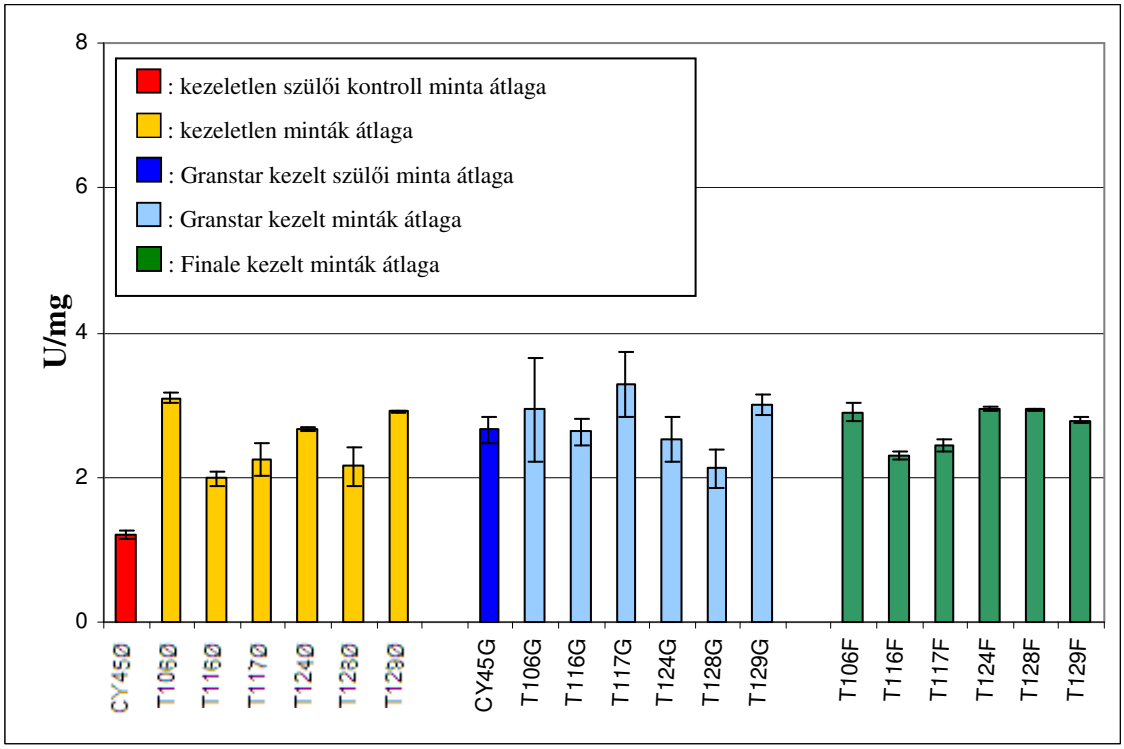
Géntechnológia hatása (M6/1-6. ábra). Az 1. évi kezeletlen tenyészkerti minták esetén szignifikáns növekedést tapasztaltam a transzformált vonalaknál a szülői búzához képest. A 2. évi kezeletlen minták esetében is magasabb össz-amiláz értékeket mértem a transzformált vonalakban, de a különbség itt már nem mutatkozott szignifikánsnak a szülői búzához hasonlítva. HALÁSZ és munkatársai (2007) a 3. évi tenyészkerti kezeletlen minták össz-amiláz aktivitásának vizsgálatakor, az általam kapott eredményekhez hasonlóan a transzgénikus vonalakban növekedést mutattak ki a szülői búzatörzshöz képest. Négy vonal esetében (T-106, T-116, T-128, T-129) szignifikáns, a T-117, T-124 vonal esetében pedig nem szignifikáns enzimaktivitás növekedést tapasztaltak. Ugyanakkor a szülői és a T-128-as transzformált vonal albumin-globulin frakciójának 2D elektroforézis képét denzitométeres kiértékelése alapján a β-amiláz (56 kDa, pI 5,5-6,5) enzimben nem mutattak ki különbségeket.

A herbicid kezelt transzformált vonalaknál kapott nagy variabilitás következtében nem mutatható ki lényeges különbség a herbicid kezelt (CY-45 G) szülői kontroll búzához képest a herbicid kezelt transzformált vonalakban.

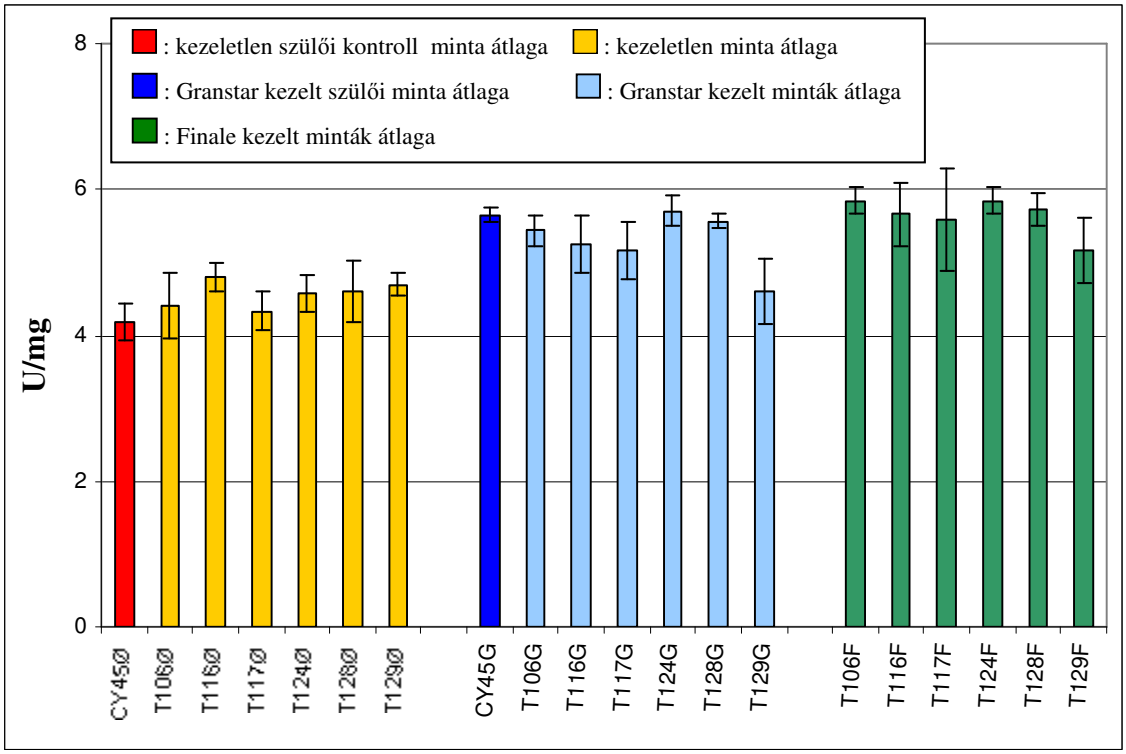
Évjárat hatása (M6/7. ábra): A 2. tenyészkerti évben szignifikáns növekedést tapasztaltam a búzaminták össz-amiláz aktivitásában az 1. évi tenyészkerti mintáknál mértekhez képest. A β-amiláz abiotikus stressz hatására bekövetkező növekedéséről több kutató számolt be (DREIER et al. 1995, ZIEGLER 1998, KAPLAN & GUY 2004).

Herbicid kezelés hatása (M6/8. ábra): A herbicid kezelések hatására mindkét tenyészkerti évben megnövekedett a minták össz-amiláz aktivitása, ugyanakkor a két herbicid kezelés nem mutatott lényeges különbséget a herbicid kezelt transzformált vonalak nagy variabilitása következtében.

EVERY és munkatársai (2002) különböző búza fajták összehasonlításakor a β-amiláz aktivitásban szintén nagyobb változékonyságot mutattak ki, mint az α-amiláz aktivitásában.



23. ábra: Az 1. évi tenyészkerti búzaminták össz-amiláz aktivitása (U/mg)

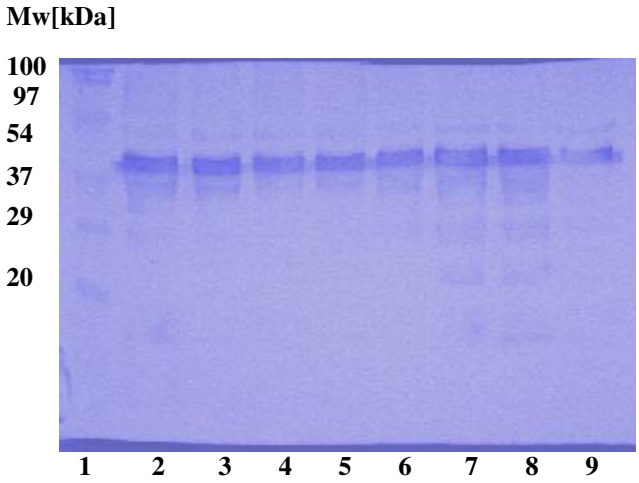


24. ábra: A 2. évi tenyészkerti búzaminták össz-amiláz aktivitása (U/mg)

Összefoglalva megállapítható, hogy az össz-amiláz aktivitás változása elsősorban a β-amilázban bekövetkező változásoknak volt tulajdonítható, amely az 1. évi tenyészkerti kezeletlen mintáknál szignifikánsan nagyobb értéket mutatott a transzgénikus vonalakban. Ugyanakkor a herbicid kezelés és az évjárat hatására jelentősen megnövekedett β-amiláz értékek esetében, már csak a 2. évi kezeletlen transzgénikus vonalaknál tapasztaltam nem szignifikáns növekedést a szülői kontroll búzához képest.

5.3.5. Szerpin

A szerpinek (40 kDa) hőstabil gabona allergénekként felismert szerin proteináz inhibitorok. A Biológiai Osztályon, Dr. Szamos Jenő által tisztított szerpinre specifikus ellenanyagot fejlesztettünk nyúlban. A szülői búza és a T-128, illetve T-129-es transzformált búzavonal 1. évi tenyészkerti kezeletlen és herbicid kezelt mintáinak szerpin specifikus immunblot képét a 25. ábrán mutatom be. Az ábrán látható, hogy minden mintában kimutatható a szerpin, de érdemi különbség nem tapasztalható. Hasonló eredményeket kaptam a további minták vizsgálatánál is.

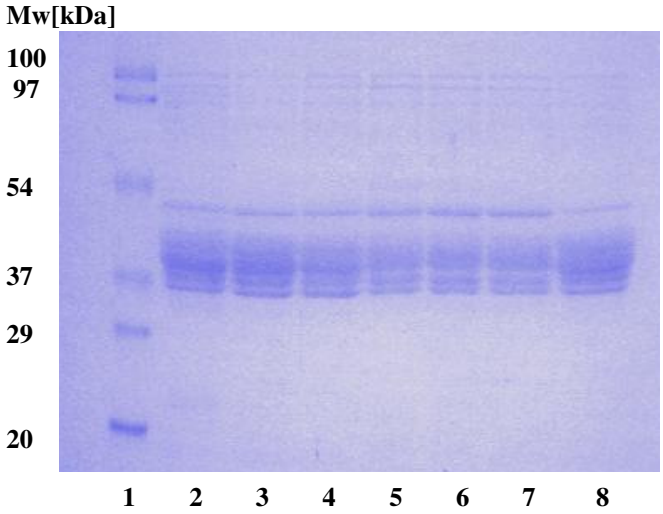


25. ábra: Az 1. évi tenyészkerti búzaminták SDS-poliakrilamid gélen történő szeparálást követő immunblottja szerin proteáz inhibitor specifikus nyúl IgG ellenanyaggal szemben. (1. LMW, 2. CY-45Ø, 3. CY-45G, 4. T-128Ø, 5. T-128G, 6. T-128F, 7. T- 129Ø, 8. T- 129G, 9. T-129F)

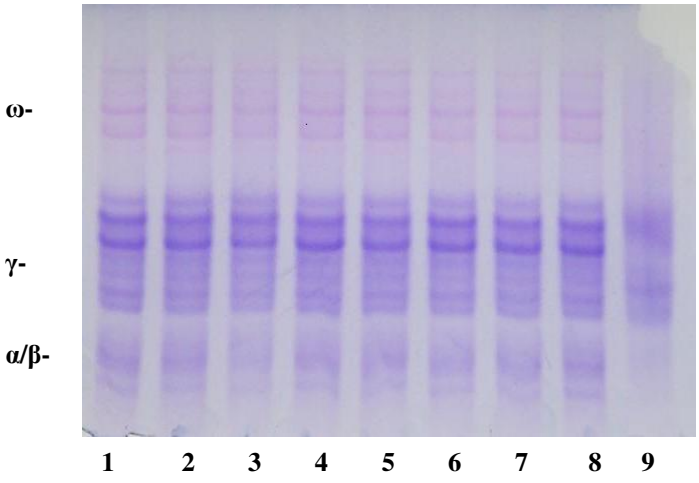
5.3.6. Gliadin

A gliadinok a búza prolamin frakciójában található fontos allergén fehérjék, ezért vizsgálatuk élelmiszer-biztonsági szempontból fontos. Az 1. évi tenyészkerti kezeletlen minták prolamin (4.2.5.) frakciójának SDS-PAGE-val történő elválasztási képe a 26. ábrán látható. A szülői és transzformált vonalak SDS jelenlétében történő elválasztásával kapott fehérjemintázatában nem találtam számottevő különbséget. A gliadinok SDS-PAGE-val (4.2.6.1.) történő elválasztásánál, ahol az SDS elfedi a fehérje saját töltését, a fehérje mozgékonyságát az elektromos térben csak a

mérete befolyásolja. Ezzel a módszerrel végzett elválasztáskor az α-, β-, γ-, ω- gliadinoknak megfelelő fehérjesávoknál átfedést tapasztaltak (LOOKHART & ALBERS 1988). Ezzel szemben a savas pH-n végzett poliakrilamid gélelektroforézissel (A-PAGE), ahol a fehérjék eltérő töltéssűrűsége szerint történik az elválasztás, a gliadin alfrakciók, amelyek közel azonos molekulatömeggel de eltérő töltéssel rendelkeznek, határozottan elkülöníthetőek. Ezért a szülői (CY-45) és transzformált vonalak gliadin alfrakcióinak eloszlását savas PAGE-val vizsgáltam tovább. A szülői és a T-128 és T-129-es transzformált vonalak kezeletlen és herbicid kezelt savas PAGE-vel kapott fehérje mintázata a 27. ábrán található. Az A-PAGE fehérje elválasztással (4.2.6.3.) szintén nem volt érdemi különbség kimutatható a szülői és a transzformált vonalak gliadin alegységeiben. A herbicid kezelt, illetve a 2. évi tenyészkerti minták esetében sem látható érdemi különbség a minták között.

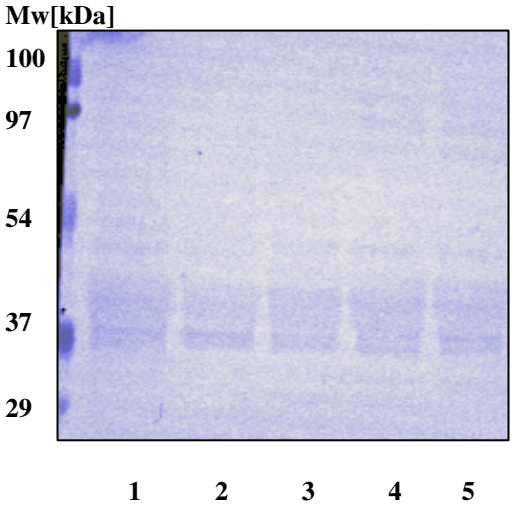


26. ábra: Az 1. évi tenyészkerti búzaminták alkohol oldható frakciójának SDS-PAGE elválasztási képe (1. MW, 2. CY-45Ø, 3. T-106 Ø, 4. T-116Ø, 5. T-117Ø, 6. T-124Ø, 7. T-128Ø, 8. T-129 Ø)

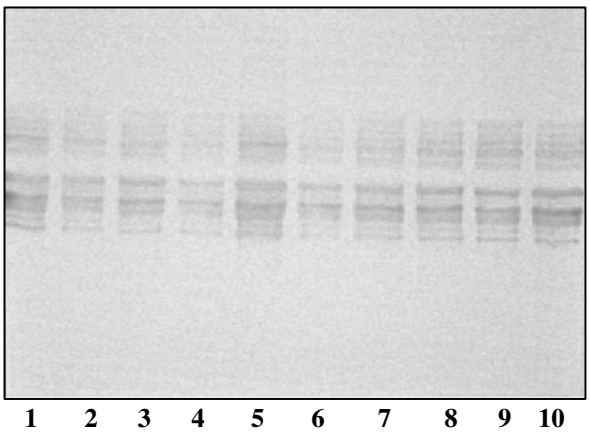


27. ábra: Az 1. évi tenyészkerti búzaminták savas PAGE elválasztási képe (1. CY 45Ø, 2. CY 45G, 3. T128Ø, 4. T128G, 5. T128F 6.T129Ø, 7. T129G, 8. T129F, 9. gliadin)

Gabona allergiás és cöliákiás humán hiperimmun szérumokkal szemben vizsgáltam az IgE, illetve az IgA immunreaktív fehérjék jelenlétét a szülői és transzgénikus búzavonalakban (4.2.7.6). A kontroll (CY-45Ø, CY-45G) és a transzgénikus (T128Ø, T128F, T128G) búzavonalak IgE reaktívitását (28. ábra) és IgA reaktivitását (29. ábra) vizsgálva megállapítható, hogy a gliadinok mind a gabona allergiás, mind pedig a cöliákiás szérumokkal erős reaktivitást mutattak, érdemi különbség csak a sávok intenzitásában mutatkozott. A többi mintánál is hasonló eredményeket tapasztaltam.



28. ábra: Az 1. évi tenyészkerti búzaminták prolamin frakcióinak SDS-poliakrilamid gélen történő szeparálását követő IgE- specifikus immunoblottja gabonaallergiás humán szérumokkal szemben (1. CY 45Ø, 2. CY 45G, 3. T128Ø, 4. T128G, 5. T-128 F)



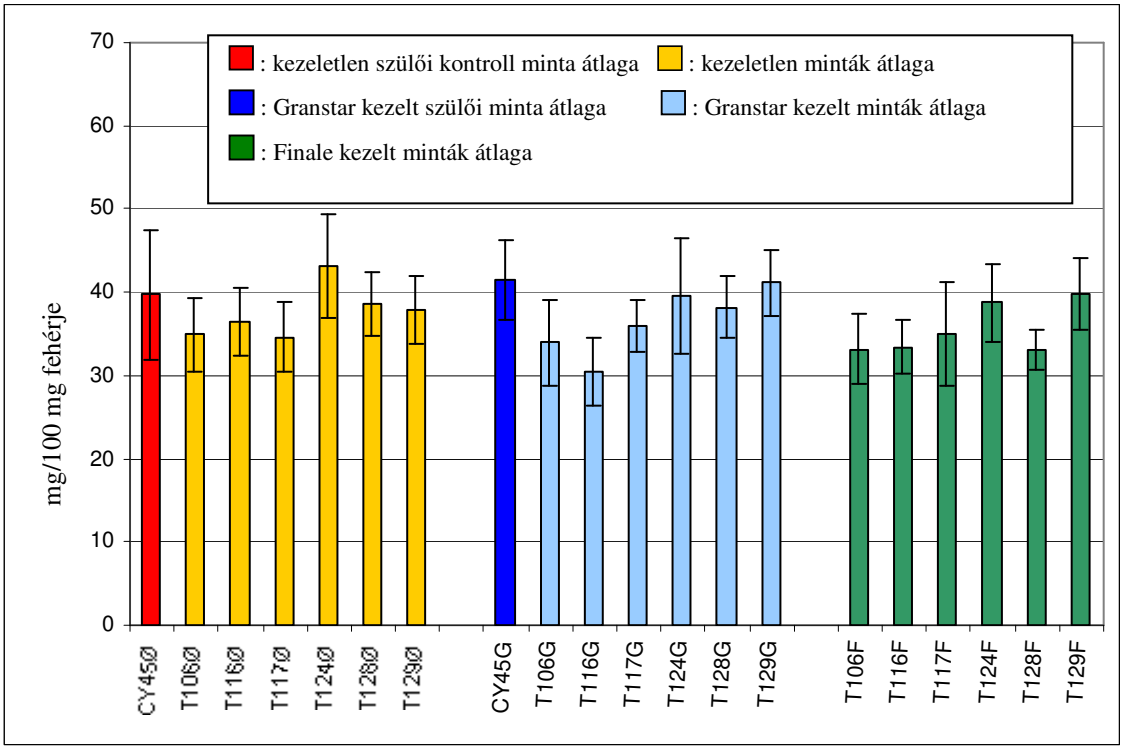
29. ábra: A tenyészkerti 1. és 2. évi tenyészkerti búzaminták fehérjéinek SDS-PAGE-val történő elválasztási képe és cöliákiás humán szérummal mutatott IgA reaktivitásának immunblottja (1. CY 45Ø (1. év), 2. CY 45Ø (2. év), 3. CY 45G (1. év), 4. CY 45G (2. év), 5. T128Ø (1. év), 6. T128Ø (2. év), 7. T128G (1. év), 8. T128G (1. év), 9. T-128 F (1. év), 10. T-129 F (2. év)

Az 1. és 2. évi tenyészkerti szülői és transzgénikus vonalak gliadin tartalmát kompetitív indirekt ELISA segítségével (4.2.7.4.) határoztam meg (30-31. ábra). Az adatok statisztikai kiértékelése a 7. mellékletben található.

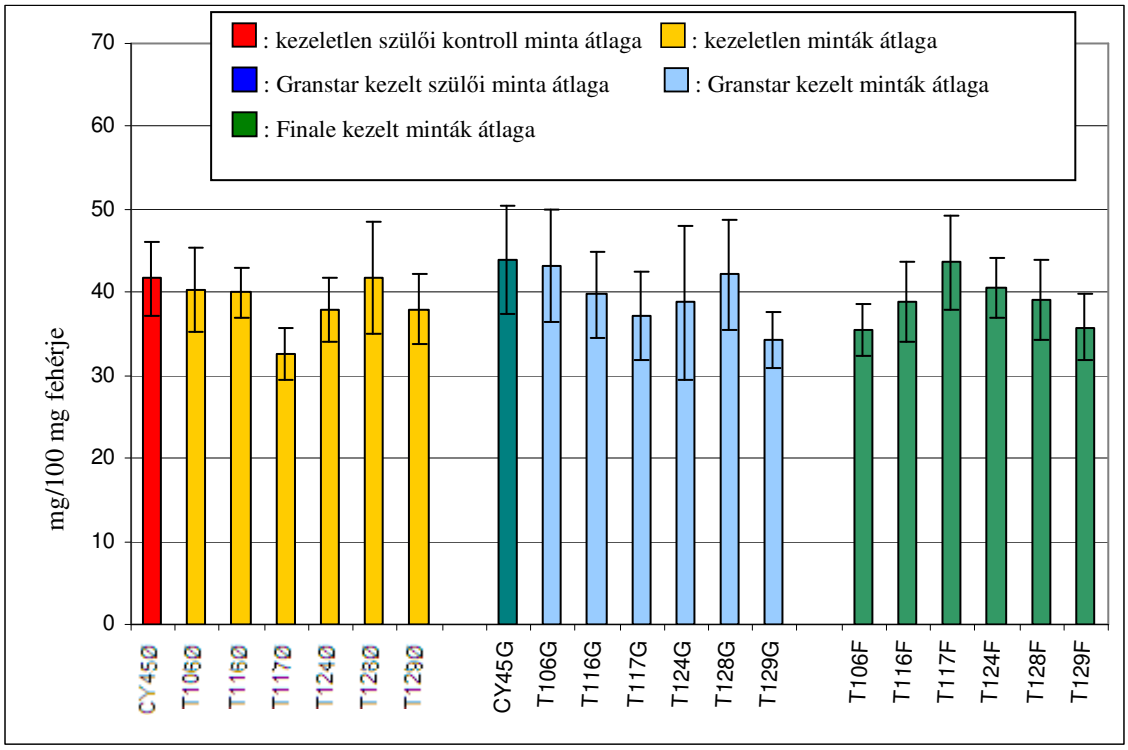
Géntechnológia hatása (M7/1-6. ábra). A szülői és a transzgénikus vonalak gliadin tartalmának összehasonlításakor nem találtam szignifikáns különbséget a kezeletlen, és a herbicid kezelt minták esetében sem. HORVÁTH-SZANICS (2007) a szárazság stressznek kitett szülői és transzgénikus vonal (T-128) kétdimenziós fehérje-térképen szintén nem mutattak ki különbséget a gliadin fehérjék összetételében.

Évjárat hatása (M7/7. ábra). Az 1. évi és 2. évi tenyészkerti minták gliadin tartalmának átlaga lényegesen nem különbözött egymástól. TRIBOI és munkatársai két különböző genotípusú búza gliadin tartalmának vizsgálatakor szintén nem talált szignifikáns különbséget a két évjárat között vizsgált mintáknál (TRIBOI et al. 2000).

Herbicid kezelés. (M7/8. ábra). A Granstar és Finale típusú herbicid kezelés sem volt lényeges hatással a búzaminták gliadin tartalmára.



30. ábra: Az 1. évi tenyészkerti búzaminták gliadin tartalma (mg/100mg fehérje)



31. ábra: A 2. évi tenyészkerti búzaminták gliadin tartalma (mg/100mg fehérje)

Összefoglalva megállapítható, hogy nem tudtam kimutatni lényeges különbséget a búzaminták gliadin fehérjéi között a használt módszerekkel.

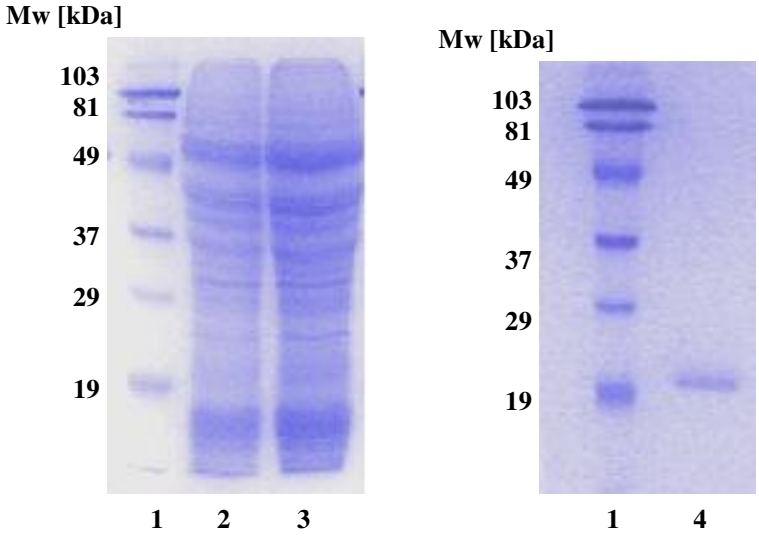
5.4. Marker fehérjék tápcsatorna rezisztenciájának vizsgálata

Az GM növényekbe transzformált új gén expressziós termék, jelen esetben a PAT enzim allergiát kiváltó hatását is szükséges vizsgálni. Mivel nincs elfogadott modell a potenciális allergenitás vizsgálatára, az FAO/WHO (2001a) egy ún. döntési fát dolgozott ki. Első lépésként vizsgálni kell, hogy fennáll-e bármilyen homológia az ismert allergénekkel szemben. A PAT fehérje nem ismert allergén fehérjeként (OECD 1999). Az adatbázisokban található, ismert allergénekre, toxinokra jellemző DNS szekvenciákkal a PAT enzimet kódoló *bar* gén nem mutat homológiát (HEROUET et al. 2005). Ebben az esetben, amikor nem áll fenn szekvencia homológia, a döntési fa szerint a funkcionális homológia vizsgálata szükséges csoport specifikus random szérumokkal szemben. Mivel a PAT bakteriális eredetű fehérje, random szérumszűrésre nincs mód. Ebben az esetben szükség van tápcsatorna rezisztencia vizsgálatokra. Irodalmi adatok szerint az *E. coli*ban expresszált rekombináns PAT-fehérje a gyomrot reprezentáló alacsony pH 2, és a vékonybelet reprezentáló pH 7,5 értéken enzimes emésztéssel egy percen belül elbomlik (OECD 1998, HEROUET et al. 2005),

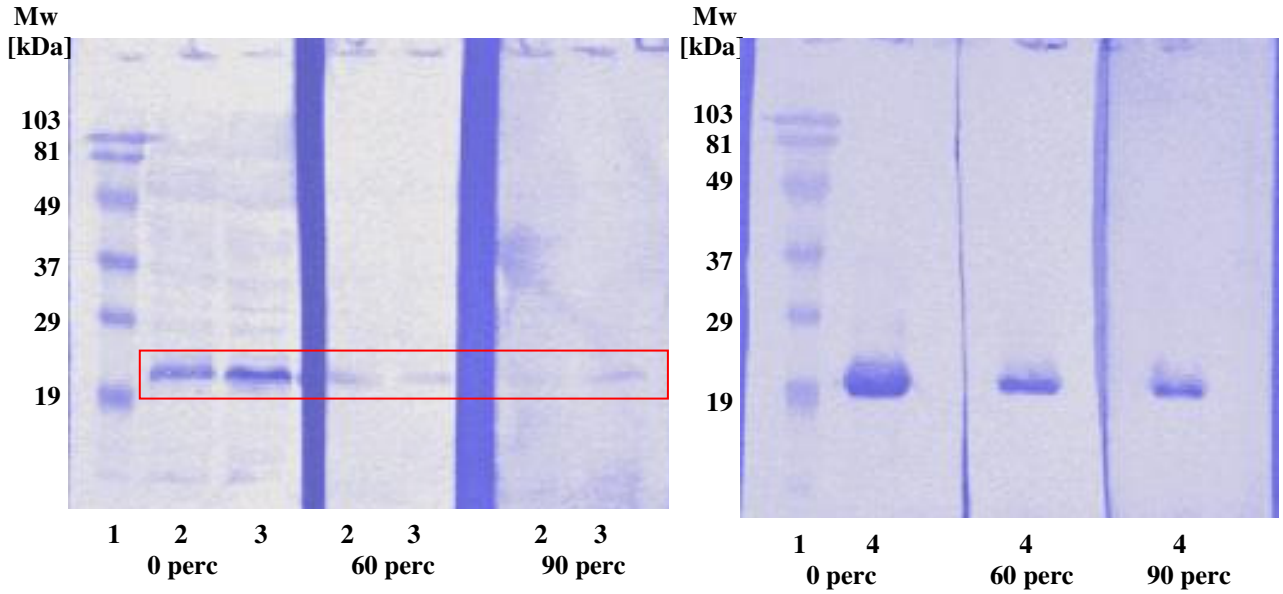
ezért *in vitro* vizsgálatát nem tartottam szükségesnek elvégezni. A PAT fehérje mellett az allergénként ismert WGA-t választottam marker fehérjéként. Ez utóbbi tápcsatorna proteázokkal szembeni rezisztencia vizsgálatát ezért, az általam fejlesztett membránon történő, *in vitro* pepszines emésztéssel végeztem el. Mivel a WGA lektin, specifikus cukormegkötő képessége miatt képes a bélfalhoz kitapadni, és lokális illetve szisztémás toxikus hatást kiváltani (VAN DAMME et al. 1998), valamint a bélfalhoz való kitapadás nagyobb rezisztenciát is biztosíthat, szükségesnek tartottam az *in vivo* állat modellben történő tesztelését is.

5.4.1. WGA *in vitro* pepszin rezisztencia vizsgálata immunblott technikával

A transzgenikus vonalak WGA-tartalom eredményei alapján a jelentősen nagyobb WGA fehérjét expresszáló T-128-as vonalat választottam a pepszines rezisztencia vizsgálatokhoz. Mivel a vizsgálatok hasonló eredményeket mutattak, ezért eredményeimet a 2. évi kezeletlen tenyészkerti szülői (CY-45) és a T-128-as transzgénikus vonal albumin-globulin frakciójának (4.2.5.) bemutatására korlátoztam. Az *in vitro* pepszines emésztését SDS-PAGE-val történő elválasztást követően, immunblott segítségével vizsgáltam (4.2.7.6.). A PVDF membránra átblottolt fehérjék 60 és 90 perces pepszines emésztését követően, a rezisztens fehérjék azonosítását WGA specifikus nyúl IgG ellenanyaggal végeztem. Referenciaként tisztított WGA (21 kDa) fehérjét, pozitív kontrolként a pepszines emésztésnek ellenálló Bowman Birk típusú szója tripszin inhibitort, negatív kontrolként pedig egy jól emészthető α-laktalbumin fehérjét alkalmaztam. Az SDS-PAGE-val szeparált minták fehérje mintázatát a 32. ábra mutatja, míg a membránra transzformált fehérjék emésztés utáni immunblott eredménye a 33. ábrán látható.



32. ábra: A szülői (CY-45Ø) és T-128Ø transzformált vonal albumin/globulin frakciójának SDS-PAGE-val történő elválasztása (1. LMW, 2. CY-45Ø AGF 3. T-128Ø AGF 4. WGA (Sigma))



33. ábra: Búzaminták albumin/globulin frakciójának pepszines emésztése (emésztés: 0 perc, 60 perc, 90 perc) utáni WGA-specifikus nyúl IgG ellenanyaggal történő immunblott eredményei (1. LMW, 2. CY-45 AGF, 3. T-128 AGF, 4. WGA)

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a tisztított WGA-hoz hasonlóan, a szülői és transzformált só- és vízoldható frakciójában a WGA molekulatömeg tartományban (21 kDa) immunreaktív volt. A 60 perces pepszines emésztés során az immunreaktivitás csökkent, de még 90 perc elteltével is sikerült immunreaktív sávot kimutatni. A kapott immunreaktív sávok intenzitása nem mutatott lényeges különbséget a szülői és a transzgén vonal só- és vízoldható frakciója között. Hasonlóan rezisztensnek mutatkozott a szója tripszin inhibitor is, míg az α-laktalbumin már 60 perces emésztésnél sem mutatott immunreaktív sávokat.

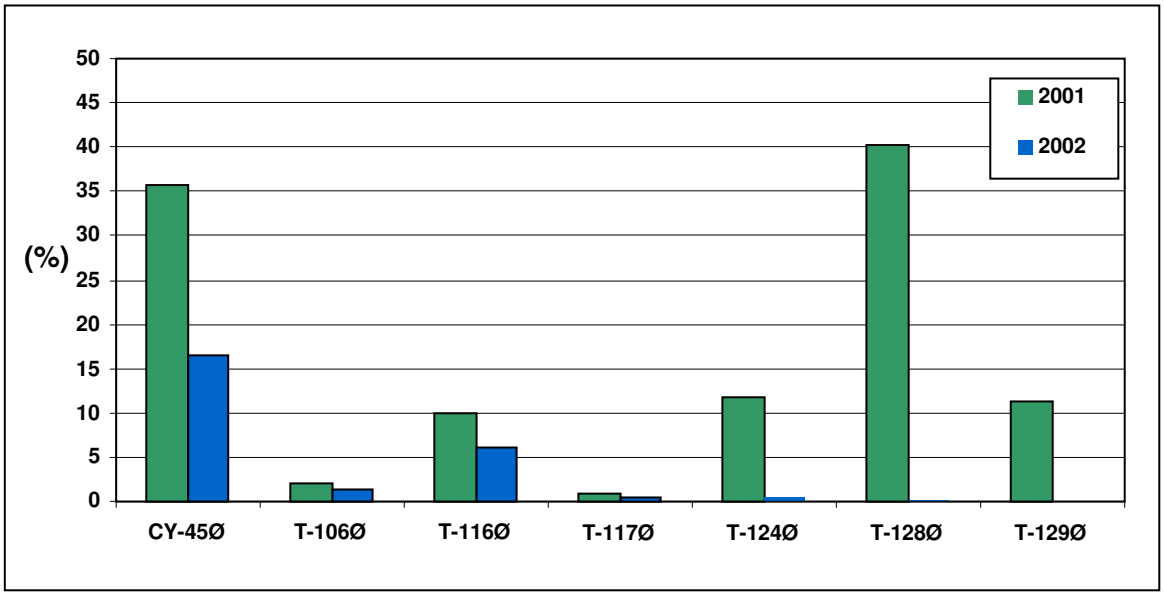
5.4.2. PAT enzim és WGA túlélésének vizsgálata akut patkánykísérletben

A tápcsatornában túlélő fehérjék funkcionális aktivitásuk révén befolyásolhatják az anyagcserét, illetve a szervezet fiziológiai (pl. immun, hormon) aktivitását. Mivel a glüfozinát-ammóniummal szemben rezisztenciát biztosító, PAT enzim fiziológiai aktivitását elsősorban GM szója és GM kukorica mintákon tesztelték, ezért ennek a fehérjének a biológiai aktivitását búzában történő expressziója esetén szintén indokolt vizsgálni (FAO/WHO 2001b).

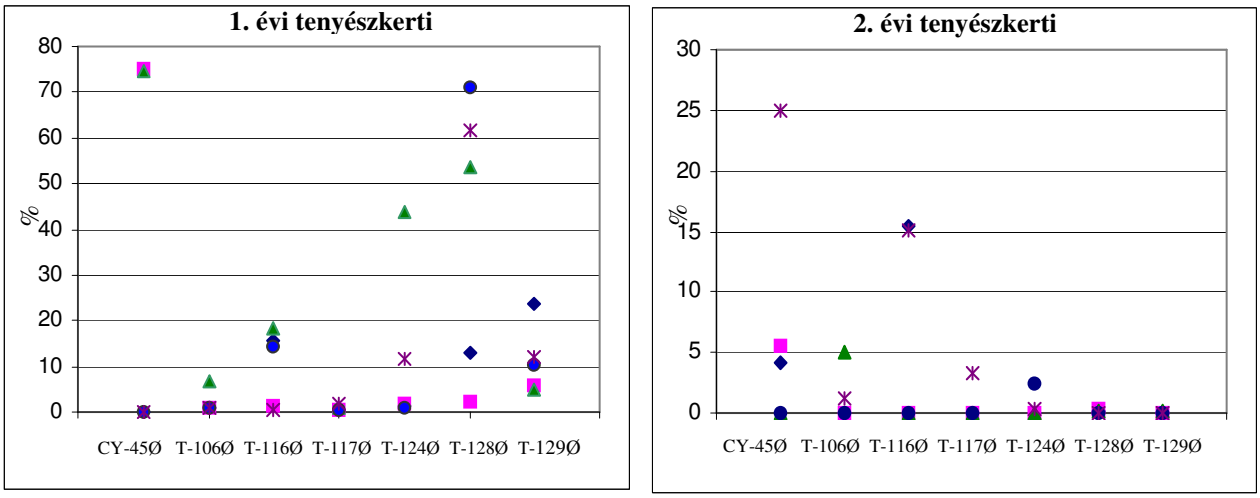
A WGA a 90 perces *in vitro* pepszines emésztés után is immunreaktív maradt (5.3.1.) és a bélfalhoz kötődő képessége miatt, vizsgálatát fontosnak tartottam *in vivo* körülmények között is.

A 1. és 2. évi kezeletlen tenyészkerti búzamintákból az általam vizsgált marker fehérjéket (PAT, WGA) koncentráltan tartalmazó só- és vízoldható frakciókat készítettem (4.2.5.) az *in vivo* állat-modellben történő tesztelés céljából (4.2.9.2.). A tápcsatornában rezisztens, immunológiailag aktív marker fehérjék kvantitatív meghatározását szendvics illetve kompetitív indirekt ELISA segítségével végeztem (PAT-4.2.7.3.; WGA-4.2.7.4.). Túlélő PAT fehérjét a gyomormosó folyadékban és a béllumenben sem tudtam visszamérni. Ez összhangban van az irodalmi adatokkal, miszerint a rekombináns PAT-fehérje enzimes emésztéssel egy percen belül elbomlik (OECD 1998, HÉROUET et al. 2005).

A WGA esetében sem detektáltam a tápcsatornában rezisztens, immunológiailag aktív fehérjét a gyomormosó folyadékban és a béllumenben. Ugyanakkor a kontroll és a transzgénikus vonalakból izolált AGF terhelést követően, a WGA specifikus cukorkötő képessége révén a bélfalról haptén cukoroldattal lemosva, immunreaktív formában visszanyerhető volt. A bélfalhoz kikötődött WGA visszanyerését a bevitt marker fehérje százalékos arányában fejeztem ki. Az öt állatra vonatkoztatott átlagos túlélési eredmények a 34. ábrán láthatók. Mivel a kapott eredmények nagy variabilitást mutattak a csoportátlagban szereplő egyedi eredményeket a 35. ábra mutatja be. Az egyedi értékek nagy variabilitása valószínűleg az egyes állatok egyedi adottságaitól (pl. savkiválasztás, enzimszekréció mértéke) függően a WGA részleges lebomlásával, s ezáltal a lektin cukorkötő képességének részleges elvesztésével járt, melynek következtében az egyedi állatok bélfalához való kötődés és rezisztencia mértéke is különböző lett. Az ábrán különböző színnel jelöltem az egyes állatokra kapott értékeket. Egyes pontok (ahol nem tapasztaltam túlélést) takarásban vannak. Az egyedi szóródás ilyen mértéke miatt az eredmények biológiai relevanciája kétségessé válik, jelentős eltérések nem mutathatók ki.



34. ábra: A bélfalhoz kötődött immunreaktív WGA túlélése a tápcsatornában (%)



35. ábra: A bélfalhoz kötődött immunreaktív WGA túlélésének eredményei a tápcsatornában (%) a vizsgált egyedi állatokban (5 állat/csoport)

Összefoglalóan megállapítható, hogy a GM búzavonalakban újonnan expresszált géntermék (PAT fehérje) a tápcsatornában elbomlott, ezért nem jelent további kockázatot a szervezet számára. Ugyanakkor a WGA csak részlegesen bomlott el a tápcsatornában, részleges cukorkötő képességét megtartva és a bélfal receptorokra kikötődve, potenciális kockázatot jelenthet a szervezet számára.

5.5. A szülői és transzgénikus vonal fehérje hasznosulásának vizsgálata

A szülői kontrol és a transzformált búzavonalak az általam vizsgált marker fehérjék bizonyos esetében eltértek egymástól. Ha a lényegi egyenértékűség nem áll fenn, az nem feltétlenül jelenti azt, hogy a transzformált vonalak nem fogyaszthatók biztonságosan (FAO/WHO 2000), csupán az óvatosság elve szerint, a transzformált vonalak körültekintőbb, egyedi vizsgálatára van szükség.

5.5.1. A fehérje tápértékének meghatározása *in vitro* módszerrel

A fehérjeszintézisben bekövetkező esetleges változások a fehérjék elsődleges szerkezetében kiegyensúlyozatlan aminosav összetételű fehérjét eredményezhetnek. Ez hatással lehet a fehérje hasznosulásra. A búzára jellemző lizinhiány esetleg tovább romlik, további aminosavakban bekövetkező kedvezőtlen irányú változással.

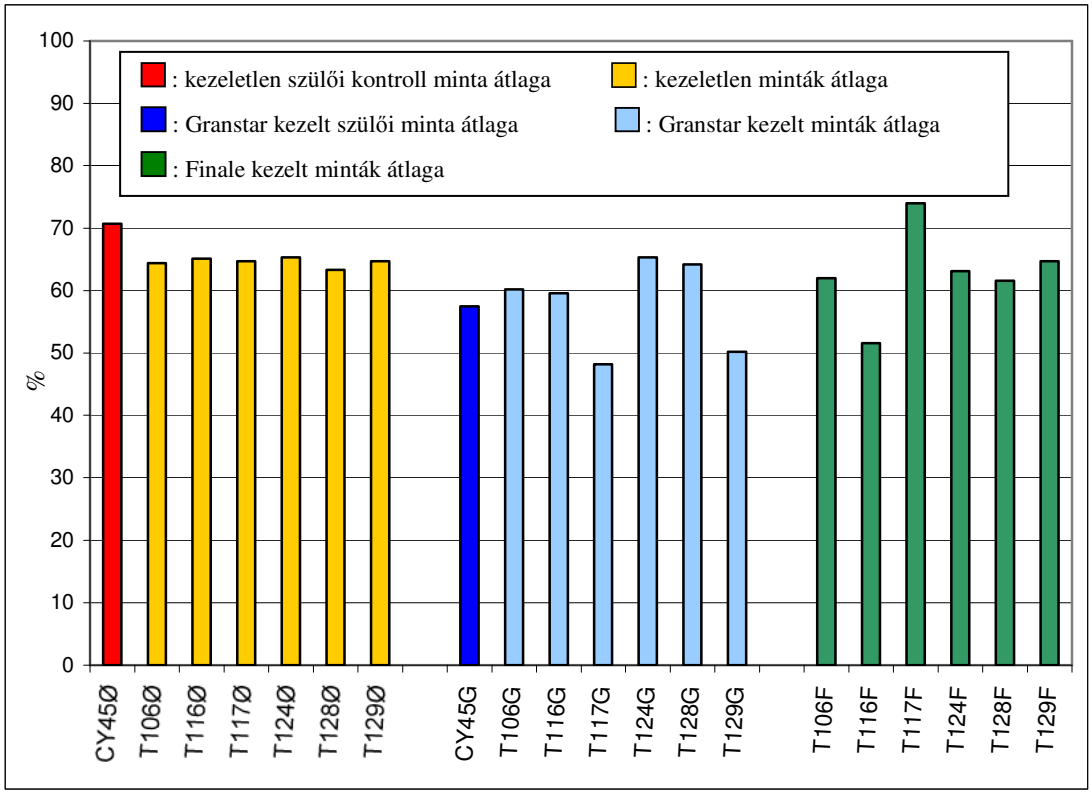
Ennek ellenőrzésére összehasonlítottam a tenyészkerti szülői és búzavonalak ion-affinitás kromatográfiás elválasztással nyert aminosav összetételét (4.2.4.). A búzaminták aminosav összetételét a 8. melléklet tartalmazza (M8). A FAO/WHO/UNU (1985) referencia fehérje

adataihoz hasonlítva megállapítható, hogy a vizsgált búzaminták limitáló aminosava továbbra is a lizin volt. Az 1. és 2. évi tenyészkerti szülői és transzgén vonalak referencia fehérjére számított *in vitro* tápértékindex (CS, Chemical Score, %) értékeit (4.2.10.1) a 36-37. ábrán látható.

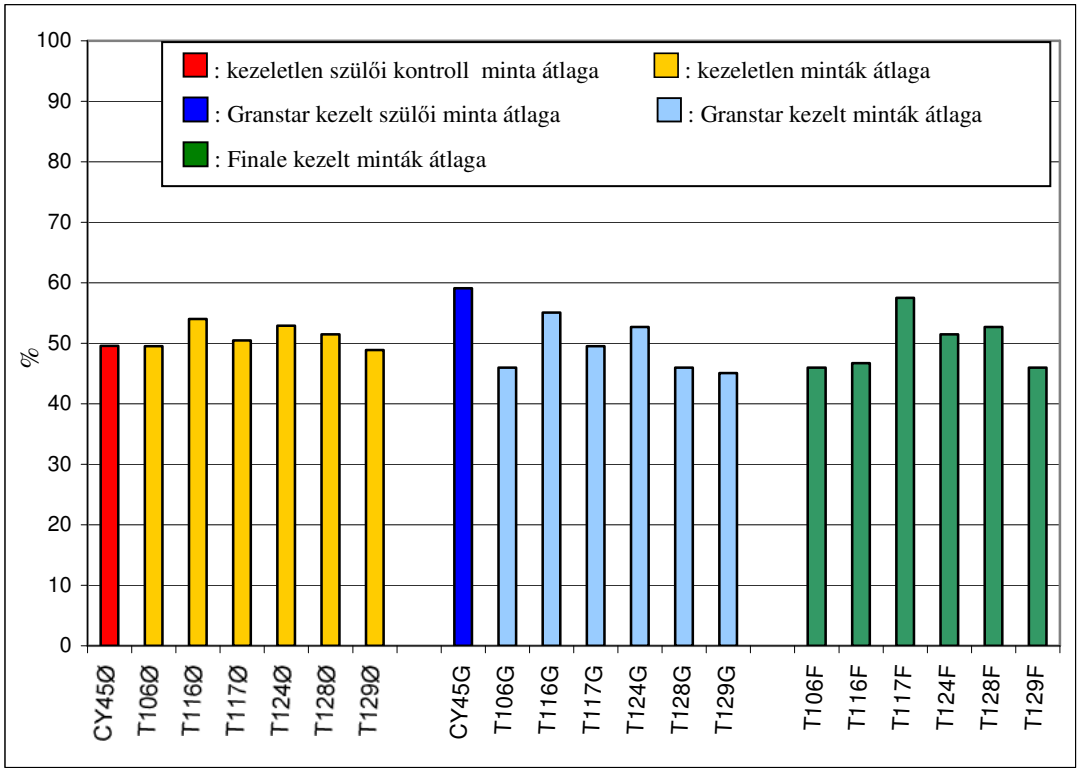
Géntechnológia hatása. A kapott eredményekből megállapítható, hogy amíg az 1. évi tenyészkerti kezeletlen mintáknál a transzformált vonalak *in vitro* tápérték indexe kisebb értéket mutatott a szülői búzához képest, addig ezt a tendenciát a 2. évi tenyészkerti mintáknál és az 1. évi kezelt mintáknál már nem tapasztalható.

Évek hatása: A 2. évi tenyészkerti mintáknál átlagban alacsonyabb *in vitro* tápérték indexet kaptam, az 1. évi tenyészkerti mintákhoz képest.

Herbicid kezelés hatása: A herbicid kezelés néhány esetben csökkenést eredményezett a CS értékekben, ugyanakkor a herbicid kezelés hatására nagyobb variabilitás figyelhető meg a transzgénikus vonalak között.



36. ábra: Az 1. évi tenyészkerti búzaminták *in vitro* tápértékindex értékei (%)



37. ábra: A 2. évi tenyészkerti búzaminták *in vitro* tápértékindex értékei (%)

Összefoglalásképpen megállapítható, hogy az *in vitro* tápérték indexek közepes vagy gyenge fehérjehasznosulást jósolnak, és tendenciózus elváltozás a vizsgált mintákban nem mutatható ki. Mivel az aminosavanalizis eredmények egy mérésből származtak, statisztikai kiértékelésre nem volt lehetőség.

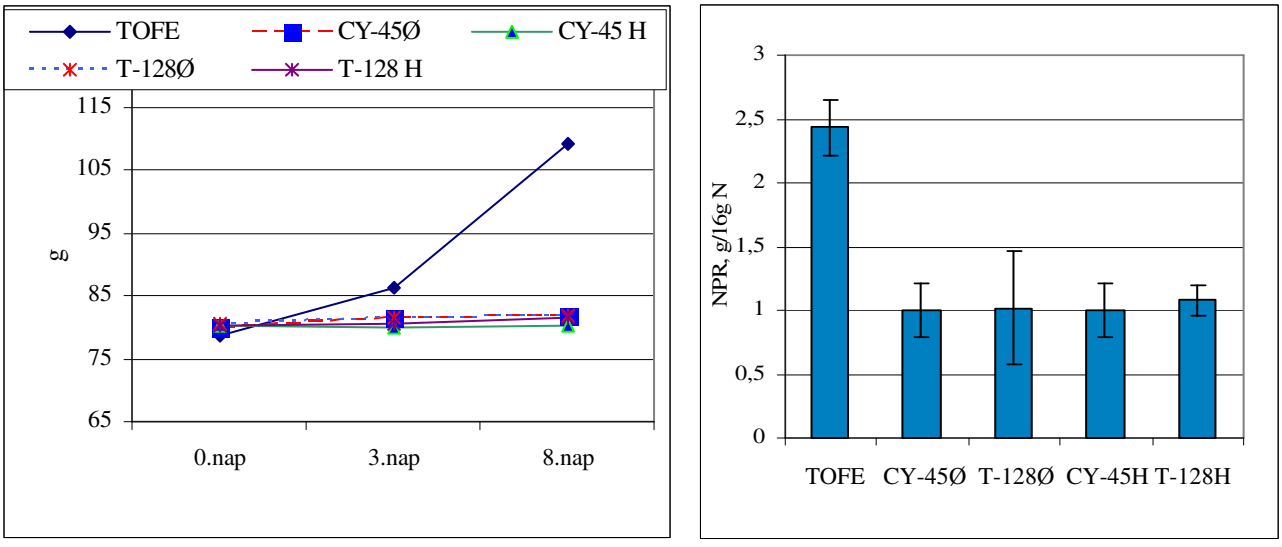
5.5.2. Fehérjehasznosulás vizsgálata nitrogén-egyensúlyi kísérletekben

A fehérje hasznosulását számos faktor befolyásolhatja. Amikor azonos korú, nemű és testtömegű, növekedésben lévő, egészséges állatok igényszintjüknek megfelelő izo-energetikus és izo-protein tartalmú tesztfehérjét fogyasztanak egy *per fed* etetett, jól hasznosuló fehérjét fogyasztó kontroll csoport mellett, a fehérje hasznosulást elsősorban az aminosavak imbalansza, illetve a funkcionálisan aktív antinutritív vagy toxikus anyagok jelenléte ronthatja le.

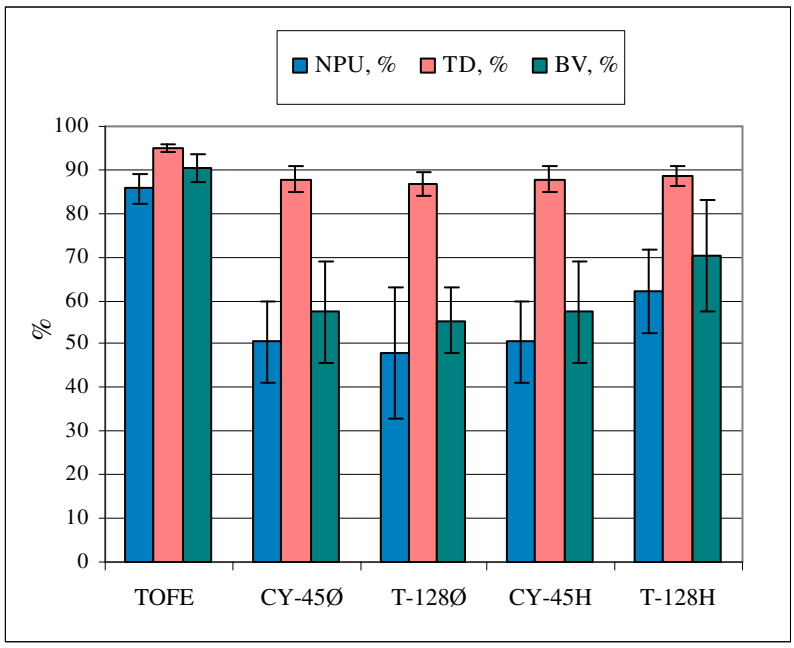
Az 1. évi tenyészkerti kezeletlen vonalak aminosavösszetételének és *in vitro* tápérték indexeinek eredményei alapján (5.4.1.) a T-128-as vonalnál kaptuk a legkisebb CS-értéket (62,5%). Emellett az antinutritiv komponensként ismert WGA tartalomban szignifikáns növekedés (5.2.2.3.), a szintén antinutritív α-amiláz inhibitor aktivitás vizsgálatánál (5.2.2.4.) is növekedés jellemezte ezt a vonalat a szülői búzához hasonlítva, így az *in vivo* fehérjehasznosulási kísérletekben ezt a vonalat vizsgáltam a szülői vonal mellett (4.2.10.2.). Mivel a búzában lévő antinutritív komponensek

(amiláz inhibitorok, szerin proteáz inhibitorok, lektinek) hőstabilitását nem ismertem, a kísérleteket hőkezelt mintákra is kiterjesztettem. A fehérjehasznosulási kísérlet szempontjából fontos volt kiszűrni, hogy bármely esetleg felmerülő rendellenes hatás nem származik-e mikrobiológiai szenyezettségből. Ezért a tenyészkerti kísérletekből származó minták mikrobiológiai szennyezettséget az összes élőcsíraszám, penész- és élesztőszennyezettség alapján a KÉKI Mikrobiológiai Osztályán vizsgálták. Az eredmények azt mutatták, hogy a kísérletben használt búzaminták mindkét évben a megengedett szennyezettségi határérték alatt maradtak, így a biológiai vizsgálatra alkalmasak voltak.

A 1. évi tenyészkerti minták etetési kísérleténél tapasztaltak alapján, amikor a 10 %-os fehérjetartalmú teszttáp fehérjeforrása csak a búzából származott, az állatok fehérjebevitele csupán az endogén veszteségek pótlására volt elegendő és lényeges testtömegnövekedés nem történt (38. ábra). Ennek megfelelően a testtömeg indexek (NPR) sem tértek el egymástól. A pozitív kontrollként használt TOFE csoport fehérjehasznosulási mutatói lényegesen magasabb értékeket adtak (39. ábra), a teszttápot fogyasztó csoportokkal szemben, ami a búzaférhérjék alacsony lizin tartalmának, meglévő aminosav kiegyensúlyozatlanságának is köszönhető. A szülői és transzformált búzaminták biológiai értéke egymástól lényegesen nem különbözött. A transzformált vonal esetében a hőkezelés relatív növekedést eredményezett, szignifikáns különbség azonban nem volt kimutatható.

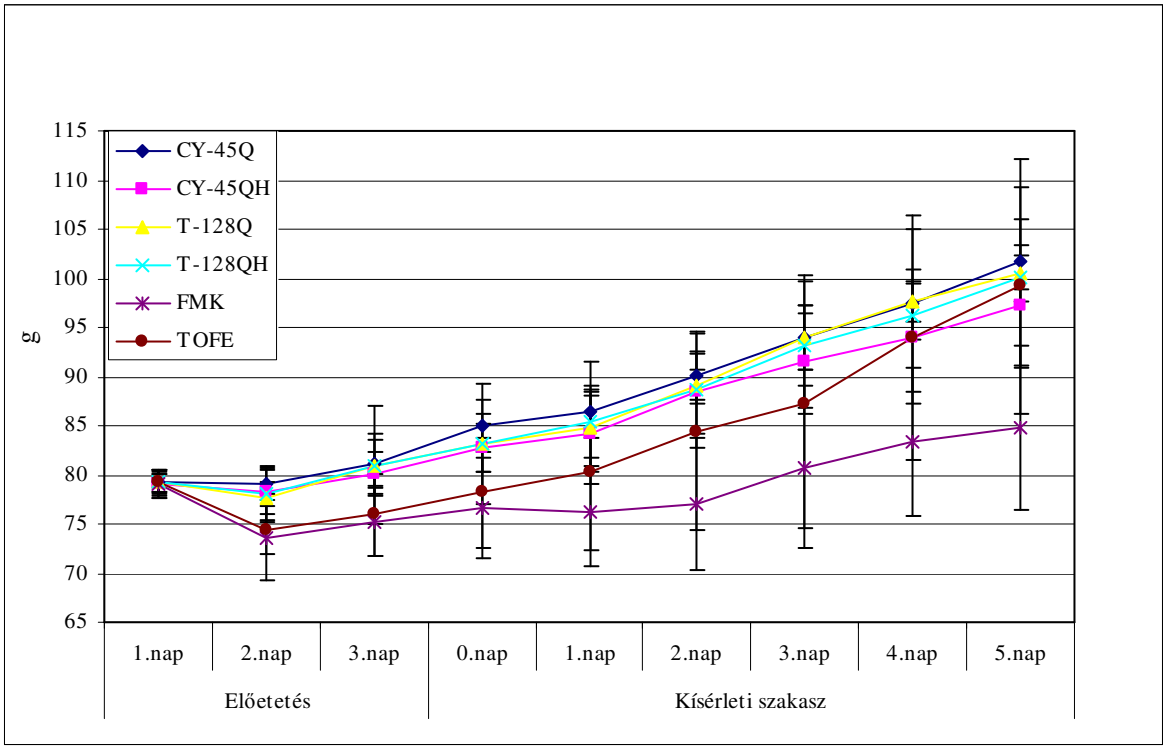


38. ábra: Az állatok testtömegének (g) változása és a számított NPR (g/16gN) értékek az 1. évi tenyészkerti minták állatetetési kísérlete során.

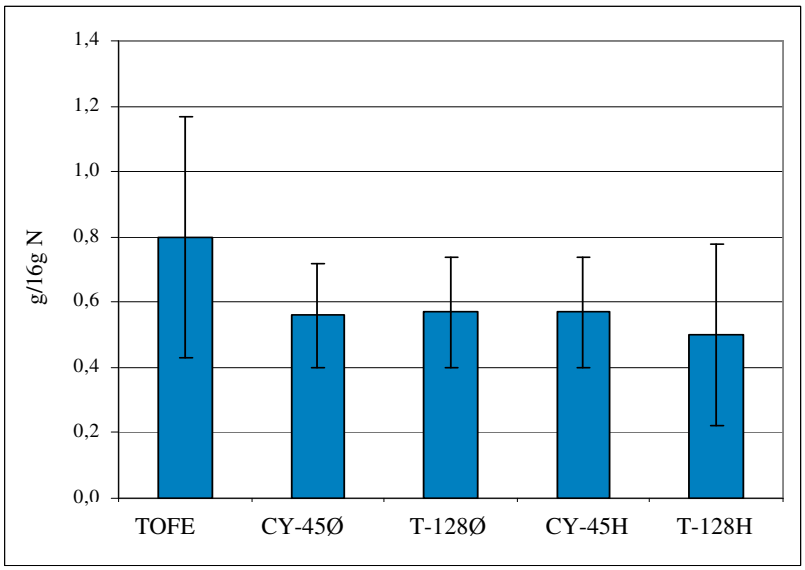


39. ábra: A szülői (CY-45Ø) és a transzformált vonal (T-128Ø) 1. évi tenyészkerti mintáinak fehérjehasznosulási mutatói (%)

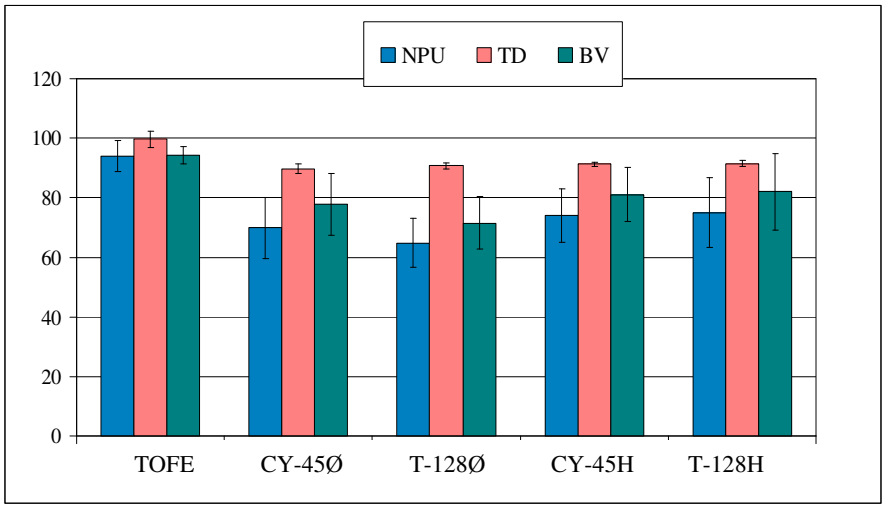
Mivel a búzafehérje, mint fehérjeforrás egyedüli felhasználása szinte csak az endogén fehérjeveszteség pótlására volt elegendő és nem támogatta a növekedést, ezért nem volt alkalmas sem egy esetleges vonalak közötti különbség, sem a hőkezelés hatásának érdemi elkülönítésére. Ezért a 2. tenyészkerti minták teszttápjainál, a diéta kialakításánál a fehérje 50%-át a jól hasznosuló tojásfehérjével helyettesítettem. A tesztcsoportot fogyasztó állatok testtömege ennek következtében folyamatosan növekedett a kísérlet során, viszont nem tudtam kimutatni lényeges eltérést a tesztcsoportok között (40. ábra). Ennek következtében a testtömeg növekedésen alapuló NPR értékek sem térnek el egymástól. (41. ábra). Az eredmények alapján elmondható, hogy a kontrollként alkalmazott, jól emészthető és kiegyensúlyozott aminosav összetételű TOFE fehérje hasznosulás mutatói lényegesen jobb értéket mutattak a búzafehérjékkel szemben (42. ábra), míg az FMK negatív N-mérleggel és testtömeg csökkenéssel volt jellemezhető. A hőkezelés kedvezően befolyásolta a szülői és a transzformált búzavonal fehérje hasznosulását. A teszttápok emészthetősége elmaradt a TOFE-től, ugyanakkor lényegesen nem tértek el egymástól.



40. ábra: Az állatok testtömegének (g) változása a 2. évi tenyészkerti minták etetési kísérlete során



41. ábra: A 2. évi tenyészkerti szülői (CY-45Ø) és transzformált vonal (T-128Ø) NPR (g/16g N) értékei



42. ábra: A 2. évi tenyészkerti szülői (CY-45Ø) és transzformált vonal (T-128Ø) fehérjehasznosulási mutatói

Összességében megállapítható, hogy teszttáp fehérjének 50%-át jól hasznosuló tojásfehérjével kiegészítve a fehérje hasznosulás mutatói kedvezőbben alakultak és a hőkezelés kisebb javulást eredményezett a szülői és a transzformált vonalnál egyaránt, de itt sem mutatható ki szignifikáns eltérés a fehérje hasznosulás mutatóiban.

A fehérje hasznosulást elsősorban az aminosav kiegyensúlyozatlansága rontotta. Az antinutritív, esetleg toxikus anyagok hőkezeléses ínaktivációjával a fehérje hasznosulás mértéke nem nőtt jelentősen. Feltételezhetően ezen komponensek diétával bejutó mennyisége olyan csekély volt, melynek a rövidtávú etetés alatt nem volt kimutatható hatása. Így, bár a transzformált vonalak a biológiailag aktív fehérjék tekintetében nagy variabilitást mutattak és eltértek a kontroll búzától, ez a fehérje hasznosulásban nem okozott jelentős változásokat.

5.6. Új tudományos eredmények

1. A ppt-toleranciát hordozó, hazai előállítású transzgénikus búzavonalak és a nem-transzgénikus kontroll CY-45 tavaszi búza lényegi egyenértékűségének összehasonlító vizsgálatát elsőként végeztem el. Megállapítottam, hogy egyes transzgénikus vonalakban a szárazanyagra vonatkoztatott fehérjetartalom szignifikánsan megnőtt (2001: T106G-F, T116G-F, T117G-F; 2002: T116Ø-F, T117Ø-F, T124Ø-F, T129F).

2. A ppt-toleranciát hordozó, transzgénikus búzavonalak és a nem-transzgénikus kontroll CY-45 tavaszi búza allergén fehérjéinek összehasonlító vizsgálatának eredményiből megállapítottam, hogy lényeges változás az AGF fehérjék szintjén következett be, míg a tartalékfehérjéket tekintve, a gliadinokban nem volt szignifikáns változás.

3. A transzgénikus vonalak többségében szignifikáns növekedést tapasztaltam a WGA tartalomban (2001: T116Ø-G-F, T117Ø-G-F, T124Ø-G-F, T128Ø-G-F, T129Ø-G-F; 2002: T106G, T117G-F, T124G T129Ø-G-F), ugyanakkor a GM vonalak egymás közötti összehasonlításban nagy variabilitást mutattak.

4. Az α-amiláz inhibitorok esetében, a vizsgált vonalakban (T128Ø-G-F, T129Ø-G-F) nagyobb enzimaktivitási szintet mértem, melyet a herbicid kezelés tovább növelt. E változások, bár megnövelhetik a GM vonalak patogénekkel szembeni ellenálló képességét, viszont az allergén kockázat veszélyét fokozhatják.

5. A kezeletlen GM vonalakban újonnan expresszált géntermék (PAT) és a potenciális allergénként azonosított, szelektált marker fehérje (WGA) akut patkánymodelljét búzafehérjére adaptáltam. A fehérjék tápcsatorna rezisztenciájának vizsgálatából megállapítottam, hogy míg a PAT fehérje a tápcsatornában elbomlik, addig a bélfalhoz specifikusan kitapadó WGA lektin esetében számolni kell a szervezetbe való bekerülés kockázatával.

6. A WGA tápcsatorna rezisztencia *in vivo* vizsgálatára specifikus kompetitív indirekt ELISA-t, az *in vitro* vizsgálatára membránon történő pepszines emésztést követő immunblott módszert fejlesztettem ki.

7. Az élelmiszer-biztonság szempontjai szerint szelektált T-128Ø kezeletlen, natív transzgénikus búza vonal és a nem-transzgénikus CY-45 kontroll tavaszi búza rövidtávú etetésének patkánymodellben történő összehasonlító vizsgálatából megállapítottam, hogy a fehérjék szintjén bekövetkezett változások mértéke nem érte el azt a szintet, amely a fehérjehasznosulásra hatással lett volna.

6. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

- Kísérleti eredményeim statisztikai kiértékelésében a GM vonalakon belüli nagy variabilitás nehézségeket okozott, amely a transzformációs technológia hatásának (pl. random integrációk, növényregenerálás során fellépő szomaklonális variabilitás), környezeti hatásoknak tulajdonítható.

  Szükség van a transzgén részletesebb molekuláris jellemzésére, amellyel a tervezett hatások mellett a váratlan hatások is előre jelezhetők.

- A PAT enzim expressziós szintje növényi fehérjére vonatkoztatva rendkívül alacsony, ezért géntermékben és más biológiailag aktív fehérjékben dús albumin/globulin frakciót tisztítottam a fehérjevizsgálatokhoz.

  Amennyiben a géntermék kockázatának vizsgálatát rekombináns fehérjékkel kívánjuk elvégezni, úgy szükséges a homológ szerkezet biztosítása, melyhez a hagyományos módszerek alkalmazása indokolt. A kockázatot jelentő különbségfehérjék összehasonlító jellemzésére pedig omix technikák (pl. proteomika) használata és adatbázisok fejlesztése szükséges.

- A bakteriális eredetű PAT enzim nem mutat szekvencia homológiát az adatbázisokból ismert allergénekkel, ezért a funkcionális homológia megállapítására random szérumszűrést kell végezni. A valóságban erre sajnos nincs mód, mivel nem áll rendelkezésre az adott baktériumra specifikus hiperimmun szérum, illetve az adott GM-fehérjét igazoltan fogyasztó és allergiás klinikai tüneteket mutató betegcsoportból származó hiperimmun szérum sem.

  Az allergén kockázat előrejelzéséhez szükséges funkcionális homológia vizsgálatokhoz szükség van olyan fiziológiai markerek fejlesztésére, melyeket az engedélyezett GM növény piacra kerülést követően monitorozásra, illetve a klinikai gyanú igazolása esetén az ilyen hiperimmun szérumok vérbankban történő gyűjtésére használhatnánk.

- Mivel a funkcionális homológia vizsgálatok nem kivitelezhetőek, szükség volt a tápcsatorna rezisztencia vizsgálatára. A vizsgálatokhoz itt is szükséges fenntartani a fehérjék (rekombináns és tisztított) szerkezeti azonosságát. Az általam vizsgált WGA, specifikus cukormegkötő képessége miatt képes a tápcsatornával közvetlen kapcsolatba lépve a tápcsatorna immunválaszát és metabolizmusát befolyásolni. Ugyanakkor az állatok egyedi válaszképessége olyan variabilitást mutatott, amely nem tette lehetővé a biológiai relevancia hiteles igazolását.

  Fontosnak tartom a specifikus cukormegkötő képességgel rendelkező lektinek (pl. WGA) in vitro pepszines emésztésének vizsgálata mellett, akut patkány modellben történő tesztelését is. Az állatmodellekben kapott eredmények biológiai relevanciája szempontjából, szükség van megfelelő predikciós statisztikai modellek kifejlesztésére, amelyek képesek figyelembe venni az egyedi válaszképességből adódó variabilitást.

- Mivel a fehérjék szintjén eltéréseket tapasztaltam, állatkísérletekben teszteltem a rövidtávú biológiai hatást. Az adott kísérleti körülmények között a fehérje szinten bekövetkezett változások nem okoztak kimutatható biológiai hatást. A hazai étrendi szokásokat figyelembe véve, valószínűleg a *bar* génnel transzformált búza rövidtávon nem jelent kockázatot.

  Az állatmodellek tervezését (állatok száma, diéta összetétele, aktív komponensek kritikus terhelési dózisa, stb.), célszerű lenne standard protokollá fejleszteni.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A géntechnológia alkalmazása során számos élelmiszer-biztonsági kérdés merült fel. Mivel a hagyományos toxikológiai vizsgálatok nem alkalmazhatók a GM növények kockázat becslésére, ezért a nemzetközi szervezetek ajánlásokat fogalmaztak meg, melyben a transzgénikus növények tápanyag egyenértékűségének (lényegi egyenértékűség) tesztelésén túl a táplálkozási vagy az élelmiszer-biztonsági (pl. toxikus hatás, allergén kockázat, rövid és hosszútávú terheléssel járó biológiai hatás) kockázatok feltárását is szükségesnek tartják.

Az Európai Unióban az új GM termény vonal piacra kerülését megelőzően összehasonlító kockázat-becslés szükséges, az EFSA ajánlásoknak megfelelően. Ennek érdekében vizsgálni kell a biztonságos fogyasztási háttérrel rendelkező, szülői vonal jellemzőit (eredet, biztonságos felhasználás), a transzgén donort (allergén, toxikus szekvencia homológia), a transzformáció módját (donor gén illesztés módja és vektor leírása, transzformált DNS jellemzése), a génterméket (szerkezet, eredet jellemzése, hatásmód, toxicitás, allergenitás). Emellett igen fontos az új GM termény vonal élelmiszer-biztonsági jellemzőinek (agronómiai viselkedés, tápanyag összetétel, biztonsági értékelés állatkísérletekkel), valamint a környezeti kockázat folyamatos figyelemmel kísérése és felügyelete. Nincs tehát előre elhatározott protokoll az élelmiszer-biztonsági vizsgálatokhoz.

A szegedi Gabonakutató Nonprofit Kft. által létrehozott és szegedi tenyészkertbe kihelyezett, hat független fertilis, ppt-toleráns transzgénikus búzavonal (T106, T116, T117, T124, T128, T129) és a nem-transzgénikus kontroll tavaszi búzatörzs (CY-45) két egymást követő évi (2001, 2002), kezeletlen és herbicid (FINALE, GRANSTAR) kezelt mintáin végeztem összehasonlító vizsgálatokat, azzal a céllal, hogy történt-e érdemi változás a GM-technológia, az évjárat, illetve a herbicid kezelés hatására. A totális herbicid toleranciáért felelős, bakteriális eredetű *bar* gén kukorica eredetű ubiquitin promóter irányítása alatt működik.

A *bar* gén jelenlétének igazolására *bar* gén specifikus PCR technikát használtam, emellett PAT-ELISA módszerrel valamennyi transzgénikus búza vonalban igazoltam a PAT fehérje expresszióját.

A főbb tápanyaghordozók vizsgálata során megállapítottam, hogy bár a transzgénikus vonalak fehérje tartalmukban nagy variabilitást mutattak, de az esetek többségében jelentősen nagyobb fehérjetartalommal rendelkeztek a kontroll búzával szemben. A fehérjetartalomra a GM technológián kívül az évjárat és a herbicid kezelés is hatással volt.

Vizsgáltam, hogy bekövetkezik-e szignifikáns változás a só- és vízoldható frakcióban található olyan fontos gabona allergén fehérjékben, mint a WGA, az α-amiláz inhibitor, a szerpin és az amilázok. Az albumin/globulin frakció (AGF) elektroforézises vizsgálatával a fehérjeszerkezetben nem tapasztaltam különbségfehérjék megjelenését. Ugyanakkor az immunreaktív WGA tartalom

jelentősen, míg az α-amiláz inhibitor aktivitás több transzgénikus vonalban is megnövekedett. Ez a tény a rezisztencia nemesítés szempontjából kedvező is lehet. Ugyanakkor élelmiszer-biztonsági szempontból további vizsgálatokat igényel, hogy a technológiai kezelésektől vagy az étrendben alkalmazott terheléstől függően valóban fennállhat-e az allergén kockázat veszélye. Az össz-amiláz aktivitásban tapasztalt változás elsősorban a β-amilázban bekövetkező változásoknak volt tulajdonítható, mely az 1. évi kezeletlen mintáknál szignifikánsan nagyobb értéket mutatott a transzgénikus vonalakban, de ez a különbség az évjárat és herbicid kezelés hatására jelentősen megnövekedett β-amiláz értékeknél már nem volt tapasztalható.

A prolamin frakcióban lévő gliadin allergének profiljában lényeges eltéréseket nem tapasztaltam.

Az újonnan expresszált PAT fehérje és az általam választott WGA marker fehérje tápcsatorna rezisztenciájának vizsgálatakor megállapítottam, hogy a PAT fehérje a patkány tápcsatornájában elbomlott, ezért nem jelentett további allergén kockázatot a szervezet számára. Ugyanakkor az immunreaktív WGA csak részlegesen bomlott el a patkány tápcsatornájában és a bélfalhoz kötődve kimutatható volt. Bár az állatok egyedi válasza rendkívül nagy variabilitást mutatott, a túlélő antigén potenciális kockázatot jelenthet a szervezet számára.

A kontroll búza és az élelmiszer-biztonsági szempontok alapján kiválasztott T-128-as vonal rövidtávú patkányetetési kísérletéből megállapítottam, hogy a fehérjékben bekövetkezett változások nem érték el azt a szintet, hogy hatással legyenek a fehérjehasznosulásra.

8. SUMMARY

The application of GM technology has raised lots of food safety related questions. Different food safety strategies have been developed by international organizations as the risk assessment strategy normally used in the toxicology has failed when applied to the whole GM plant. According to comparative safety assessment approach first of all it is necessary to identify the differences between the non-GM recipient plant having safe history of use and the GM plant by comparison of the main nutrients (Concept of Substantial Equivalence). Following there is a need to assess the identified differences regarding the environmental, food safety (toxic, allergenic) and nutritional (short and long term exposure) impact. Therefore there is no absolute safety assessment itself.

In the European Union before marketing a new GM plant a comparative pre-market safety assessment is necessary, according to the EFSA guidance document. The key element for such a safety assessment is the characterisation of the recipient plant (origin, history of safe use), the transgene donor (allergenic or toxic sequences), the transgenic technology (insertion of the donor gene and vector elements, characterization of the recombinant DNA), and the gene product (structure, origin, mode of action, toxicity, allergenicity). Beside these the food safety parameters of the new GM plant are equally important (agronomic performance, composition of main nutrients, nutritional and safety analyses by using animal experiments), as well as monitoring and surveillance of the effect on the environment.

In the experiments I have applied a comparative food safety assessment approach for the six independent, ppt-tolerant transgenic wheat lines (T106, T116, T117, T124, T128, T129) and the isogenic control spring wheat counterpart (CY-45) developed by Cereal Research Non-Profit Ltd (Szeged) and cultivated in experimental field of Szeged area in two subsequent years (2001, 2002), which were non-treated or treated by herbicides (FINALE, GRANSTAR) to identify any differences resulted as an effect of GM technology, years of the cultivation and herbicide treatments.

The bacterium originated *bar* gene responsible for the total herbicide tolerance works under the regulation of the maize originated ubiquitin promoter.

The bar gene insertion was detected by bar gene specific PCR method and the PAT protein expression was proved by PAT-ELISA in transgenic wheat lines.

Concerning the composition of the main nutrients I have found that nevertheless the transgenic wheat lines were characterized with high variability they showed significantly higher protein contents in most of the cases in comparison with the control wheat. I concluded that herbicide treatments and the years also affected on these results beside the GM technology.

I investigated if there was any meaningful difference in the main wheat allergenic profile concerning the albumin/globulin protein fractions (AGF) of wheat samples as WGA, α-amylase inhibitor, serpin and amylases. I did not found any difference in the protein bands, which might be related to any newly expressed protein after the electrophoretic separation of AGF. However I have detected a significant increase in the immune reactive WGA contents, and a relative increase in the α-amylase inhibitor activities for most of the transgenic wheat lines. This fact could be important for the resistance breeding. However further research would be necessary to make the right decision concerning the food safety aspects and to define if there is any allergenic risk depending on the technological treatments and dietary exposure levels. The changes in total amylase activities were a consequence of the altered β-amylase activities. For the 1st year of cultivation these activities were significantly increased in the non-treated transgenic wheat lines but such remarkable difference was not found in the samples with significantly increased β-amylase activities, which were consequences of year and herbicide treatments effects.

I did not found any significant differences in gliadin allergenic profile of the prolamin fractions.

By investigating the gut resistance of the newly expressed PAT protein and WGA selected, as marker protein I proved that the PAT protein was fully digested in the rat gut therefore did not represent any further allergenic risk for the organism. At the same time the immune reactive WGA was only partially digested in the rat gut and it was detectable so far bound to the rat gut mucosal surface. Although the variability of individual responses of the rats were high the survival of WGA can represent a potential allergenic risk for the organism.

The series of short term rat feeding trials with parent wheat and the non-treated transgenic wheat line (T128) selected by the food safety assessment aspects have shown that changes on the level of wheat proteins did not exceed the threshold value of biological relevance to have any affect on the protein utilization.

9. MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

1829/2003 EK rendelet: A géntechnológiával módosított élelmiszerekről és takarmányokról. *Európai Unió Hivatalos Lapja L 268*, 13 (32) 432-455. p.

1830/2003 EK rendelet: A géntechnológiával módosított szervezetek nyomonkövethetőségéről és címkézéséről, és a géntechnológiával módosított szervezetekből előállított élelmiszer- és takarmánytermékek nyomonkövethetőségéről, valamint a 2001/18/EK irányelv módosításáról. *Európai Unió Hivatalos Lapja L 268*, 13 (32) 455-459. p.

AALBERSE R.C. (2000): Structural biology of allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology,* 106 228-238. p.

AKAGAWA M., HANDOYO T., ISHII T., KUMAZAWA S., MORITA N., SUYAMA K. (2007): proteomic analysis of wheat flour allergens. *journal of agricultural and food chemistry*, 55 (17) 6863-6870. p.

ANTONYUK L.P., EVSEEVA N.V. (2006): Wheat lectin as a factor in plant- microbial communication and a stress response protein. *Microbiology,* 75 (4) 470-475. p.

A.O.A.C. (2000): Official Methods of Analysis. 17th ed., Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA

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

AULRICH K., BÖHME H., DAENICKE R., HALLE I., FLACHOWSKY G. (2002): Novel feeds-a review of experiments at our Institute. *Food Research International*, 35 285-293. p.

AUMAITRE A., AULRICH K., CHESSON A., FLACHOWSKY G., PIVA G. (2002): New feeds from genetically modified plants: substantial equivalence, nutritional equivalence, digestibility, and safety for animal and the food chain. *Livestock Production Science,* 74 223-238. p.

BARBOSA T.M., SCOTT K.P., FLINT H.J. (1999): Evidence for recent intergeneric transfer of a new tetracycline resistance gene, tet (W), isolated from *Butyrivibrio fibrisolvents*, and the occurrence of tet (O) in ruminal bacteria. *Enviromental Microbiology*, 1 (1) 53-64. p.

BÁNÁTI D. (2007): Nemzetközi szervezetek szerepe a modern biotechnológiai úton előállított élelmiszerek biztonsági értékelésében. *KÉKI Élelmiszer-Biztonsági Kötetek IV.*, 26-36. p.

BHAGLAL P., SINGH P., BHULLAR S.S. (1999): Drought-increased in wheat germ agglutinin (WGA) accumulation in developing wheat embryos appears to be independent of ABA. *Australian Journal of Plant Physiology,* 26 (8) 787-791. p.

BRAKE J., FAUST M.A., STEIN J. (2003): Evaluation of transgenic event Bt11 hybrid corn in broiler chickens. *Poultry Science*, 82 551-559. p.

BRANT A. (2007): Baker's asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology,* 7 (2) 152-155. p.

CAMMUE P.A., BROKAERT W.F., KELLENS J.T.C., RAIKHEL N.V., PEUMANS W.J. (1989): Stress-induced Accumulation of Wheat Germ Agglutinin and Abscisic Acid in Roots of Wheat Seedlings. *Plant Physiology,* 91 1432-1435. p.

CAPOCCHI A., FONTANINI D., MUCCILLI V., CUNSOLO V., SAVIOZZI F., SALETTI R., FOTI S., GALLESCHI L. (2006): Tetraploid and hexaploid wheats express identical isoforms of nsLTP1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 54 (6) 2372-2377. p.

CELLINI F., CHESSON A., COLQUHOUN I., CONSTABLC A., DAVICS H.V., ENGEL K.H., GATEHOUSE A.M.R., KAERENLAEMPI S., KOK E.J., LEGUAY J.J., LEHESRANTA S., NOTEBORN H.P.J.M., PEDERSEN A.J., SMITH M. (2004): Unintended effects and their detection in genetically modified crops. *Food and Chemical Toxicology,* 42 (7) 1089-1125. p.

CHASSY B. M. (2002): Food safety assessment of current and future plant biotechnology products. Chapter 4, In: Thomas J.A., Fuchs R.I. (Eds.) *Biotechnology and Safety Assessment. 3rd Edition*. San Diego: Academic Press.

CHEN H., TORCHILIN V., LANGER R. (1996): Lectin-bearing polymerized liposomes as potential oral vaccine carriers. *Pharmaceutical Research*, 13 1378–1383. p.

COCKBURN A. (2002): Assuring the safety of genetically modified (GM) foods: the importance of an holistic, integrative approach. *Journal of Biotechnology,* 98 79-106. p.

DECKER L. A. (1977): Worthington enzyme manual. Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ. 176 p.

Directive 2001/18/EC. Directive 2001/18/EC of the European Parliment and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into enviroment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EC.

Directive 2003/89/EC EPC. Annex IIIA; International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Sub-Committee, http://www.allergen.org.

DONN G., TISCHLER E., SMITH J.A., GOODMAN H.M. (1984): Herbicide resistant alfalfa cells an example of gen amplification in plants. *Journal of Molecular and Applied Genetics*, 2 621-635. p.

DREIER W., SCHNARRENBERGER C., BÖRNER T. (1995): Light- and stress-dependent enhancement of amylolytic activities in white green barley leaves: β-amylases are stress induced proteins. *Journal of Plant Physiology,* 145 342-348. p.

DUDITS L., HESZKY L. (2003): Növényi biotechnológia és géntechnológia. Budapest: Agroinform Kiadó. p 312.

EFSA (2006): Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. *The EFSA Journal,* 99 1-100. p.

EHLERS B., STRAUCH E., GOLTZ M., KUBSCH D., WAGNER H., MAIDHOF H., BENDIEK J., APPEL B., BUHK H.J. (1994): Nachweis genetischer Veranderungen in Mais mittels PCR. *Bundesgesundsheitsblatt,* 4 118-121. p.

EVERY D., SIMMONS L., AL-HAKKAK J., HAWKINS S., ROSS M. (2002): Amylase, falling number, polysaccharide, protein and ash relationships in wheat millstreams. *Euphytica,* 126 135-142. p.

EWEN S.W.B., PUSZTAI A. (1999): Effects of diets containing genetically modified potatoes expressing *Galanthus nivalis* lectin on rat small intestine. *Lancet,* 354 1353-1354. p.

FAO/WHO (1991): Strategies for assessing the safety of foods produced via biotechnology. Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO, Geneva.

FAO/WHO (2000): Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology. Safety aspects of genetically modified food of plant origin. WHO, Headquarters, Geneva, Switzerland

FAO/WHO (2000): Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation of Food derived from Biotechnology, WHO, Geneva

FAO/WHO (2001a). Expert Consultation „Evaluation of allergenicity of genetically modified foods". FAO, Rome, Italy, 22-25 January 2001.

FAO/WHO (2001b): Joint FAO/WHO Food Standard Programme. Codex ad hoc. Intergovernmental Task Force on Food Derived from Biotechnology. Second Session. Chiba, Japan, 25-29 March 2001. Information Paper on Familiarity. CX/FBT 11/7.

FAO/WHO (2003): Guideline for the Conduct of Food Safety Assesment of Foods Derived from Recombinant-DNA Plants. CAC/GL 45-2003. Rome, Italy, 16 p.

FAO/WHO/UNU (1985): Energy and protein requirements. *Technical Report Series No. 724*, WHO, Geneva

FLACHOWSKY G., AULRICH K., BÖHME H., DAENICKE R. (2000): GMO in animal nutrition-results of experiments at our Institute. *Proceedings of the 6th International Feed Production Conference*, 2000., Piacenza

FVM (2001): Búza Minőségi térkép 2001

FVM (2002): Búza minőségi térkép 2002

GABOR F., BOGNER E., WEISSENBOECK A., WIRTH M. (2003): The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. *Lectins and Glycoconjugates in Drug Delivery and Targeting*, 56 (4) 459-480. p.

GANGULY C., DAS S. (1994): Plant lectins as inhibitors of tumour growth and modulators of host immune response. *Chemotherapy,* 40 272-278. p.

GASZTONYI K., LÁSZTITY R. (1992): Élelmiszer-kémia I. Budapest: Mezőgazda Kiadó. 790 p.

GELENCSÉR É., BÁNÁTI D. (2007): A GM növényekre alapozott élelmiszerek biztonsági értékelése. *KÉKI Élelmiszer-Biztonsági Kötetek IV.,* 53-68. p.

HAJÓSNÉ NOVÁK MÁRTA (1999): Genetikai variabilitás a növénynemesítésben – Molekuláris diagnosztika. Budapest. Mezőgazda Kiadó. 142 p.

HAJÓS GY., GELENCSÉR É., EWEN S.W.B., PUSZTAI Á., GRANT G., SAKHRI M., BARDÓCZ S. (1995): Biological effects and survival of trypsin inhibitors and the agglutinin from soya bean in the gut. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 43 165-170. p.

HALÁSZ Á., HORVÁTH-SZANICS E., NAGY-GASZTONYI M., PAUK J., HAJÓS GY. (2007): Changes in total α-amylase activities and wheat germ agglutinin content in nwide-range herbicide resistant wheat lines. *Cereal Research Communication*, 35 (3) 1405-1413. p.

HARBOE N., INGLID A. (1973): Immunization, isolation of immunoglobulins, estimation of antibody titre. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2 (Suppl 1): 161-164. p.

HAUGHN G.W., SMITH J., MAZUR B., SOMERVILLE C. (1988): Transformation with a mutant Arabidopsis acetolactate synthase gene renders tobacco resistantto sulfonylurea herbicides. *Molecular and General Genetics*, 211 266-271. p.

HENSON C.A. & STONE J.M. (1988): Variation in α-amylase and α-amylase inhibitor activities in barley malts. *Journal of Cereal Science*, 8 39-46. p.

HÉROUET C., ESDAILE D.J., MALLYON B.A., DEBRUYNE E., SCHULZ A., CURRIER T., HENDRICKX K., VAN DER KLIS R., ROUAN, D. (2005): Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 41 134-149. p.

HERRERA-ESTRELLA L., DEPICKER A., VAN MONTAGU M., SCHELL, J. (1983): Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti plasmid-derived vector. *Nature*, 303 209-213. p.

HESZKY L., FESŰS L., HORNOK L. (2005): Mezőgazdasági biotechnológia. Budapest: Agroinform Kiadó. 366 p.

HESZKY, L., GALLI, ZS. (2008): A genetika alapjai. Egyetemi Jegyzet. Gödöllő: Szent István Egyetem.

HO M.W., RYAN A., CUMMINS J. (1999): Cauliflower mosaic viral promoter a recipe for disaster? *Microbial Ecology in Health and Disease*, 11 194-197. p.

HORVÁTH-SZANICS E., SZABÓ E., JANÁKY L., PAUK J., HAJÓS GY. (2005): Proteomics as an emergent tool for identification of stress-induced protein sin control and genetically modified wheat lines. *Chromatographia Supplement*, 63 S143-147. p.

HORVÁTH-SZANICS E. (2007): Proteomikai módszerek használata különböző eredetű fehérjék vizsgálatára. Doktori értekezés. Központi-élelmiszertudományi Intézet. Budapest

HULL R., COVEY S., DALE, P. (2000): Cauliflower Mosaic Viral Promoter A Recipe for Disaster? *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12 1-5. p.

ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications) (2007): Global status of commercialized Biotech/GM crops. Brief 37.

JAMES J.M., SIXBEY J.P., HELM R.M., BANNON G.A., BURKS A.W. (1997): Wheat α-amylase inhibitor: a second route of allergic sensitization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 99 (2) 239-244. p.

JAMES C. (2004).: Preview: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2004. Ed.: ISAAA. Vol. 2004. Ithaca NY, ISAAA.

KAPLAN F., GUY C. L. (2004): β-amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiology,* 135 1674-1684. p.

KEMÉNY S., DEÁK A. (2000): Kísérletek tervezése és értékelése. Budapest: Műszaki Könyvkiadó. 492 p.

KIMBER, I., DEARMAN, R.J. (2001): Can animal models predict food allergenicity. *Nutritional Bulletin,* 26 127-131. p.

KIMBER I., DEARMAN R.J. (2002): Approaches to assessment of the allergenic potential of novel proteins in food from genetically modified crops. *Toxicological Sciences,* 68 4-8. p.

KIMOTO M, YOSHIKAWA M, TAKAHASHI K, BANDO N, OKITA M, TSUJU H. (1998): Identification of allergens in cereals and their hypoallergenization. I. Screening of allergens in wheat and identification of an allergen, Tri a Bd 17K. *Annual Report of Interdisciplinary Research Institute of Environmental Sciences,* 17 53-60. p.

KJERRULF M., GRDIC D., EKMAN L., SCHON K., VAJDY M., LYCKE N.Y. (1997): Interferon-γ receptor-deficient mice exhibit impaired gut mucosal immune responses but intact oral tolerance. *Immunology,* 92 60-68. p.

KOMAROVA E.N., VYSKREBENTSEVA E.I., TRUNOVA T.I. (2003): Activity of Lectin-like proteins of the cell walls and the outer organelle membranes as related to endogenous ligands in cold-adapted seedlings of winter wheat. *Russian Journal of Plant Physiology*, 50 (4) 455-460. p.

KÖNIG A. (2003): A framework for design crops – science, safety and citizen's concerns. *Nature Biotechnology,* 21 1274-1279. p.

KOSHATZKY K., MAßFELLER S. (1994): Gentechnik für Lebensmittel? Möglichkeiten, Risiken und Akzeptanz gentechnischer Entwicklungen (Biotechnology for Food? Possibilities, Risk and Acceptance of Development in Biotecn.). Cologne: TÜV Rheinland anf H. Groupp.

KRAMER M.G., REDENBAUGH K. (1994): Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene: The Flavr Savr™ tomato story. *Euphytica*, 79 293–297. p.

KUIPER H.A., KLETER G.A., NOTEBORN H.P.J.M., KOK E.J. (2001): Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *Plant Journal*, 27 503-528. p.

KUIPER H.A., KLETER G.A., KÖNIG, A., HAMMES W.P., KNUDSEN I. (2004): Safety Assessment, Detection and Traceability and Societal Aspects of Genetically Modified Foods. European Network on Safety Assessment of Genetically Modified Food Crops (ENTRANSFOOD). *Food and Chemical Toxicology,* 42 (Special Issue No.7.) 1181-1193. p.

LÁSZTITY R. (1981): Gabonafehérjék. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó.

LÁSZTITY R. (1999): Cereal Chemistry. Budapest: Akadémiai Kiadó. 307 p.

LOOKHART G.L., ALBERS L.D. (1988): Correlations between reversed-phase high-performance liquid-chromatography and acid-polyacrylamide and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel-electrophoretic data on prolamins from wheat sister lines differing widely in baking quality. *Cereal Chemistry*, 65 222-227. p.

LOOKHART G., BEAN S. (1995): Separation and characterization of wheat-protein fractions by high-performance capillary electrophoresis. *Cereal Chemistry,* 72 527-532. p.

MALIGA P., KURODA H., CORNEILLE S., LUTZ K., AZHAGIRI K.A., SVAB Z., TREGONING J., NIXON P., DOUGAN G. (2003): Tobacco cloroplast as platform for vaccine production. 397-400. p. In: VASIL I.K. (Ed.) *Plant Biotechnology 2002 and Beyond.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 625 p.

MANIATIS T., FRIRSCH E. F., SAMBROOK J. (1989): Molecular cloning. New York: Cold Spring Harbor. 586 p.

MARSAN P.A., LUPOTTO E., LOCATELLI F., QIAO Y..M., CATTANEO M. (1993): Analysis of stable events of transformation in wheat via PEG-mediated DNA uptake into protoplasts. *Plant Science,* 93 85-94. p.

MATSUO H, DAHLSTROM J, TANAKA A, KOHNO K, TAKAHASHI H, FURUMURA M, MORITA E. (2008): Sensitivity and specificity of recombinant omega-5 gliadin-specific IgE measurement for the diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Allergy,* 63 (2) 233-236. p.

METCALFE D.D., ASTWOOD J.D., TOWNSEND R., SAMPSON H.A., TAYLOR S.L., FUCH R.L. (1996): Assessment of the allergenic potential of foods from genetically engineered crop plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36 S165-S186. p.

METZ P.L.J., STIEKEMA W.J., NAP J.P. (1998): A transgen-centered approach to the biosafety of transgenic phosphinothricin-tolerant plant. *Molecular breeding*, 4 335-341. p.

ODELL J.T., NAGY F., CHUA N.H. (1985): Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 313 810-812. p.

OECD (1998): Report of the OECD Workshop on the Toxicological and Nutritional Testing of Novel Foods. Paris, October 1998.

OECD (1999): Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Harmonization of Regulatory Oversight of Biotechnology, number 11. June 1, 1999, 1-26. p.

OECD (2002): Report of the OECD Workshop on the Nutritional Assessment of Novel Foods and Feeds. Paris

OECD (2003): Consensus document on compositional considerations for new varieties of bread wheat *(Triticum aestivum L).* : Kex food and feed nutrients, anti-nutrients and toxicant. OECD, Paris

OSBORNE T. B. (1907): The proteins of wheat kernel. Washington: Carnegie Institution. 119 p.

PALACIN A., QUIRCE S., ARMENTIA A., FERNANDEZ-NIETO M., PACIOS L.F., ASENSIO T., SASTRE J., AZ-PERALES A., SALCEDO G. (2007): Wheat lipid transfer protein is a major allergen associated with baker's asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120 (5) 1132-1138. p.

PALOSUO K., VARJONEN E., NURKKALA J., KALKKINEN N., HARVIMA R., REUNALA T., ALENIUS H. (2003): Transglutaminase-mediated cross-linking of a peptic fraction of omega-5 gliadin enhances IgE reactivity in wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111 (6) 1386-1392. p.

PARISA M.V., JOHNSON E.A. (2001): Evaluating the safety microbial enzyme preparations used in food processing update for a new century. *Regulatory Toxicology and Pharmacology,* 33 176-180. p.

PAUK J., KERTÉSZ Z., JENES B., PURNHAUSER L., MANNINEN O., PULLI S., DUDITS D. (1994): Fertile wheat (*Triticum aestivum* L.) regenerants from protoplasts of embryogenic suspension culture. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 38 1-10. p.

PAUK J., HÄNSCH R., SCHWARZ G., NERLICH A., MONOSTORI T., MÉSZÁROS A., JENES B., KERTÉSZ Z., MATUZ J., SCHULZE J., MENDEL R.R. (1998): Transzgénikus búza (*Triticum aestivum* L.) elállítása Magyarországon. (Production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) in Hungary.) *Növénytermesztés*,47 241–251. p.

PAUK J. (2003): Androgenezis és a genetikai transzformáció különböző gabonafajokban, Akadémiai Doktori értekezés, Gabonatermesztési Kutató Kht., Szeged

PELLET P.L., YOUNG V.R. (1980): Nutritional evaluation of protein foods: Methodology for net protein utilization. Tokyo: The United Nations University. 103 p.

PENNINKS A.H., KNIPPELS L.M. (2001): Determination of protein allergenicity: studies in rats. *Toxicology Letters,* 120 171-180. p.

PETRÓ-TURZA M., SZÁRFÖLDI-SZALMA I., FÜZESI-KARDOS K., BARÁTH Á. (1989): Study on tastesubstances of tomato II.: Analytical investigation into the free amino acid, peptide and protein contents. *Acta Alimentaria*, 18 107–117. p.

POLGAR M., HAJOS GY., GELENCSER, E. (1998). Cross allergy. *Pediatr. Integral,* 3 (2) 208-217. p.

POWLES S. (2000): Herbicide Resistant Weeds in W.A. Western Australian Herbicid Resistance Initiative. Faculty of Agriculture, University of Western Australia, Nederlands

PUSZTAI Á. (1991): Plant Lectins. Cambridge: Cambridge University Press. 263 p.

PUSZTAI Á., EWEN S.W.B., GRANT G., BROWN D.S., STEWART J.C., PEUMANS W.J., VAN DAMME E.J.M., BARDÓCZ S. (1993): Antinutritive effects of wheat-germ agglutinin and other N-acetylglucosamine-specific lectins. *British Journal of Nutrition*, 70 313-321. p.

PUSZTAI Á., BARDÓCZ, ZS. (2006): A genetikailag módosított élelmiszerek biztonsága. Budapest: Természetesen alapítvány. 110 p.

SANDIFORD C.P., TATHAM A.S., FIDO R., WELCH J.A., JONES M.G., TEE R.D., SHEWRY P.R., NEWMAN TAYLOR A.J. (1997): Identification of the major water/salt insoluble wheat proteins involved in cereal hypersensitivity. *Clinical and Experimental Allergy*, 27 (10) 1120-1129. p.

SANFORD J.C. (1988): The biolistic process - a new concept in gene transfer and biological delivery. *Trends in Biotechnology*, 6 229-302. p.

SCHUBBERT R., LETTMANNAND C., DOERFLER W. (1994): Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Molecular and General Genetics*, 242 (5) 495-504. p.

SHAH D.M., HORSCH R.B., KLEE H.J., KISHORE G.M., WINTER J.A., TUMER N.E., HIRONAKA C.M., SANDERS P.R., GASSER C.S., AYKENT S., SIEGEL N.R., ROGERS S.G., FRALEY R.T. (1986): Engineering tolerance in transgenic plants. *Science,* 25 478-481. p.

SINGH P., CHATTERJEE S., PATHANIA R., BHULLAR S.S. (1999): Enhanced wheat germ agglutinin accumulation in the germinating embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.) appears to be a general stress response. *Current Science (Indian Academy of Science)* 76 1140-1142. p.

SOTKOVSKY P., HUBALEK M., HERNYCHOVA L., NOVAK P., HAVRANOVA M., SETINOVA I., KITANOVICOVA A., FUCHS M., STULIK J., TUCKOVA L. (2008): Proteomic analysis of wheat proteins recognized by IgE antibodies of allergic patients. *Proteomics,* 8 1677-1691. p.

TRIBOI E., ABAD A., MICHELENA A., LLOVERAS J., OLLIER J.L., DANIEL C. (2000): Environmental effects on the quality of two wheat genotypes: 1. quantitative and qualitative variation of storage proteins. *European Journal of Agronomy*, 13 (1) 47-64. p.

US EPA (2000): SAP Meeting Biopesticides Registration Action Document: Bt Plant-Pesticides, October 18-20, 2000.

US FDA (1992): Statement of policy: foods derived from new plant varieties. Notice, Federal Registre 57 (104) 22,984-23,005. p.

VAECK M., REYNAERTS A., HÖFTE H., JANSENS S., DE BEUCKELEER M., DEAN C., ZABEAU M., VAN MONTAGU M., LEEMANS, J. (1987): Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, 327 33−37. p.

VAN DAMME E.J.M., PEUMANS W.J., PUSZTAI Á., BARDÓCZ S. (1998): Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Applications. West Sussex, England: John Wiley & Sons. 466 p.

VAN REE R., VOITENKO V., VAN LEEUWEN W.A., AALBERSE R.C. (1992): Profilin is a cross-reactive allergen in pollen and vegetable foods. *International Archives of Allergy and Immunology,* 98 (2) 97-104. p.

VASIL V., BROWN S.M., RE D., FROMM M.E., VASIL I.K. (1991): Stabily transformed callus lines from microprojectile bombardment of cell suspension cultures of wheat. *Bio/Technology*, 9 743-747. p.

VISSER R.G.F., JACOBSEN E. (1993): Toward of modifying plant for altered starch content and coposition. *Trends in Biotechnology,* 11 63-68. p.

VOELKER T.A. (1996): Genetic manipulation of plant oil composition. Proc. Int. Symp. On the use of induced Mutations and molecular Techniques for Crop Improvement. IAEA-SM-34/58, 93-99. p.

WATANABE J., TANABE S., SONOYAMA K., KURODA M., WATANABE M. (2001): IgE-reactive 60 kDa glycoprotein occurring in wheat flour. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,* 65 (9) 2102-2105. p.

WEHRMANN A., VAN VLIET A., OPSOMER C., BOTTERMAN J., SCHULZ A. (1996): The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology,* 14 1274–1278. p.

WEICHEL M., VERGOOSSEN N.J., BONOMI S., SCIBILIA J., ORTOLANI C., BALLMER-WEBER B.K., PASTORELLO E.A., CRAMERI R. (2006): Screening the allergenic repertoires of wheat and maize with sera from double-blind, placebo-controlled food challenge positive patients. *Allergy,* 61 (1) 128-135. p.

YAMASHITA H., KIMOTO M., HIEMORI M., OKITA M., SUZUKI K., TSUJI H. (2001): Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay system for micro-detection of the wheat allergen, Tri a Bd 17 K. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,* 65 (12) 2730-2734. p.

YUNGINGER J.W. (1990): Classical food allergens. *Allergy Proceedings*, 11 7-9. p.

ZIEGLER P. (1999): Cereal Beta-amylases. *Journal of Cereal science* 29 195-204. p.

ZIMMERMANN A., LÜTHY J., PAULI U. (1998): Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food Samples. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung A,* 207 81-90. p.

M2. Szülői és transzgénikus vonalak beltartalmi adatai

M2/1. ábra: 1. évi tenyészkerti minták beltartalmi adatai (g/100g szárazanyag)

	1.évi tenyészkerti minták										
	CY-45 (Ø)	T (Ø)			T (F)			CY-45 (G)	T (G)		
	Átlag	Átlag	Intervallum	Szórás	Átlag	Intervallum	Szórás	Átlag	Átlag	Intervallum	Szórás
rost	4,03	4,18	3,70-5,07	0,53	4,07	3,56-4,60	0,43	3,28	3,93	3,40-4,71	0,51
nyerszsír	2,44	2,01	1,22-2,44	0,44	2,03	1,26-2,44	0,40	2,43	2,20	1,54-2,82	0,41
szénhidrát	72,75	73,61	72,95-75,16	0,81	73,06	71,54-74,02	1,03	74,47	72,88	71,10-73,51	0,88
hamu	1,67	1,47	1,34-1,75	0,14	1,50	1,29-2,02	0,25	1,47	1,61	1,38-1,77	0,12
nedvesség	9,39	9,56	9,01-10,30	0,40	9,32	9,01-9,48	0,16	9,33	9,47	8,76-9,66	0,33

M2/2. ábra: 2. évi tenyészkerti minták beltartalmi adatai (g/100g szárazanyag)

	2. évi tenyészkerti minták										
	CY-45 (Ø)		T (Ø)			T (F)			CY-45 (G)	T (G)		
	Átlag	Szórás	Átlag	Intervallum	Szórás	Átlag	Intervallum	Szórás	Átlag	Átlag	Intervallum	Szórás
rost	2,30		2,14	2,04-2,36	0,18	2,17	2,02-2,45	0,17	2,31	2,12	1,84-2,37	0,23
nyerszsír	1,30		1,52	1,39-1,64	0,08	1,45	1,33-1,54	0,07	1,67	1,34	1,25-1,53	0,99
szénhidrát	79,33		77,64	76,98-78,00	0,39	76,97	76,32-77,49	0,44	77,57	77,27	76,21-77,96	0,61
hamu	1,46		1,46	1,34-1,58	0,09	1,57	1,41-1,58	0,09	1,54	1,41	1,41-1,66	0,11
nedvesség	9,03		8,83	7,97-8,73	0,49	8,79	8,21-9,04	0,28	9,23	8,79	8,15-9,50	0,45

Ahol
T = A hat transzgénikus vonal (T-106, T-116, T-117, T-124, T-128, T-129) eredményeinek átlaga
Ø= kezeletlen minták
G= Granstar kezelt minták
F= Finale kezelt minták

M3. A fehérje tartalom statisztikai értékelése

M3/1 ábra: 1. évi tenyészkerti kezeletlen minták fehérje tartalmának összehasonlítása

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
,685	6	14	,665

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	4,638	6	,773	6,312	,002
Hiba	1,715	14	,122		

LSD teszt:

	CY45Ø	T106Ø	T116Ø	T117Ø	T124Ø	T128Ø
T129Ø		●●				
T128Ø	●●	●●●	●	●	●	
T124Ø		●●				
T117Ø		●●				
T116Ø		●●				
T106Ø	●					

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	Sign.
,139	,218	-,329	,607	,535

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M3/2 ábra: 1. évi tenyészkerti Granstar kezelt minták fehérje tartalmának összehasonlítása

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
1,216	6	14	,355

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	10,567	6	1,761	12,866	,000
Hiba	1,916	14	,137		

LSD teszt:

	CY45G	T106G	T116G	T117G	T124G	T128G
T129G		●●	●	●●●		
T128G		●	●●	●●		
T124G		●●		●●●		
T117G	●●●					
T116G	●●					
T106G	●●●					

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	Sign.
-,816	,231	-1,357	-.367	,002

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M3/3 ábra: 1. évi tenyészkerti Finale kezelt minták fehérje tartalmának összehasonlítása

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
,331	6	14	,909

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	7,235	6	1,206	9,623	,000
Hiba	1,754	14	,125		

LSD teszt:

	CY45G	T106F	T116F	T117F	T124F	T128F
T129F		●●	●	●●●		
T128F		●		●●		
T124F		●●	●●	●●●		
T117F	●●●					
T116F	●●					
T106F	●●●					

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	Sign.
-,817	,221	-1,291	-,344	,002

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M3/4 ábra: 2. évi tenyészkerti kezeletlen minták fehérje tartalmának összehasonlítása

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
2,353	6	14	,088

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	5,208	6	,868	4,488	,010
Hiba	2,707	14	,193		

LSD teszt:

	CY45Ø	T106Ø	T116Ø	T117Ø	T124Ø	T128Ø
T129Ø				●		
T128Ø				●●		
T124Ø	●●					
T117Ø	●●●	●●				
T116Ø	●●					
T106Ø						

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	p
-,927	,274	-1,515	-,339	,004

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M3/5 ábra: 2. évi tenyészkerti Granstar kezelt minták fehérje tartalmának összehasonlítása

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
1,986	6	14	,136

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	4,123	6	,687	2,499	,074
Hiba	3,849	14	,275		

Bonferroni teszt:

	CY45G	T106G	T116G	T117G	T124G	T128G
T129G						
T128G						
T124G						
T117G						
T116G						
T106G						

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	Sign.
-,911	,327	-1,612	-,210	,015

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M3/6 ábra: 2. évi tenyészkerti Finale kezelt minták fehérje tartalmának összehasonlítása

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
1,639	6	14	,209

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	3,871	6	,645	3,958	,016
Hiba	2,282	14	,163		

LSD teszt:

	CY45G	T106F	T116F	T117F	T124F	T128F
T129F	●●					
T128F	●			●		
T124F	●			●		
T117F	●●●	●				
T116F	●					
T106F						

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	Sign.
-,924	,252	-1,464	-,384	,003

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M3/7 ábra: Az évjárat hatásának vizsgálata

	év	N	átlag	szórás	t	p
fehérje	2001	60	17,029	,718	11,168	,000
	2002	60	15,587	,697		

M3/8. ábra: A herbicid kezelés hatásának vizsgálata

1.évi	kezelések	N	átlag	szórás
fehérje	Ø	21	16,654	,122
	G	21	17,196	,172
	F	18	17,274	,151

kezelések		p.
Ø	G	,012
Ø	F	,006
F	G	,719

2.évi	kezelések	N	átlag	szórás
fehérje	Ø	21	15,042	,620
	G	21	15,814	,631
	F	18	15,957	,434

kezelések		p
Ø	G	,000
Ø	F	,000
F	G	,433

M4. WGA tartalom eredményeinek statisztikai kiértékelése

M4/1 ábra: 1. évi kezeletlen minták összehasonlítása

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
2,291	6	14	,940

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	17104,227	6	2850,704	24,510	,000
Hiba	1627,767	14	116,269		

LSD teszt:

	CY45Ø	T106Ø	T116Ø	T117Ø	T124Ø	T128Ø
T129Ø	●●●	●●●				
T128Ø	●●●	●●●	●	●		
T124Ø	●●●	●●				
T117Ø	●●●	●●				
T116Ø	●●●	●●				
T106Ø						

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	p
-50,414	6,724	-64,836	-35,992	,000

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M4/2 ábra: 1. évi tenyészkerti Granstar kezelt minták összehasonlítása

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
1,472	6	14	,257

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	23518,446	6	3919,741	60,650	,000
Hiba	904,808	14	64,629		

LSD teszt:

	CY45G	T106G	T116G	T117G	T124G	T128G
T129G	●●●	●●●	●●●			
T128G	●●●	●●●	●●	●●		
T124G	●●●	●●●	●●●			
T117G	●●●	●●●	●●●			
T116G	●●●	●●●				
T106G						

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	p
-61,973	5,013	-72,726	-51,221	,000

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M4/3 ábra: 1. évi tenyészkerti Finale kezelt minták összhasonlítása

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
2,680	6	14	,060

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	27525,971	6	4587,662	63,999	,000
Hiba	1003,561	14	71,683		

LSD teszt:

	CY45G	T106F	T116F	T117F	T124F	T128F
T129F	●●●	●●●	●●●	●●●		●●●
T128F	●●●	●●●	●●●		●●●	
T124F	●●●	●●●	●●●	●●		
T117F	●●●	●●●	●●●			
T116F						
T106F						

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	p
-46,393	5,280	-57,717	-35,069	,000

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M4/4 ábra: 2. évi tenyészkerti kezeletlen minták összehasonlítása

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
1,101	6	14	,409

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	933,903	6	155,651	,770	,606
Hiba	2828,454	14	202,032		

Bonferroni teszt:

	CY45Ø	T106Ø	T116Ø	T117Ø	T124Ø	T128Ø
T129Ø						
T128Ø						
T124Ø						
T117Ø						
T116Ø						
T106Ø						

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	p
-6,691	8,864	-25,702	12,320	,463

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M4/5 ábra: 2. évi tenyészkerti Granstar kezelt minták összehasonlítása

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
1,399	6	14	,282

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	7945,181	6	1324,19	12,455	,000
Hiba	1489,607	14	106,40		

LSD teszt:

	CY45G	T106G	T116G	T117G	T124G	T128G
T129G	●●		●		●●	●
T128G	●●●	●●	●●●		●●●	
T124G		●		●●●		
T117G	●●●	●	●●●			
T116G						
T106G	●					

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	p
-26,745	,001	-40,541	-12,949	,001

M4/6 ábra: 2. évi tenyészkerti Finale kezelt minták összehasonlítása

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
2,718	6	14	,058

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	19588,835	6	3264,80	40,663	,000
Hiba	1124,038	14	80,28		

LSD teszt:

	CY45G	T106F	T116F	T117F	T124F	T128F
T129F	●●●	●●●	●●●	●	●●●	●●●
T128F		●●		●●●	●	
T124F	●●			●●●		
T117F	●●●	●●●	●●●			
T116F						
T106F	●●					

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	p
-7,996	5,588	-19,981	3,988	,174

M4/7 ábra: Az évjárat hatásának vizsgálata

	év	N	átlag	szórás	t	p
WGA	2001	60	64,167	33,750	-,617	,539
	2002	60	67,512	25,040		

M4/8. ábra: A herbicid kezelés hatása

1.évi	kezelések	N	átlag	szórás
WGA	Ø	21	59,744	30,603
	G	21	69,653	34,945
	F	18	62,926	36,766

kezelések		p
Ø	G	,699
Ø	F	,988
F	G	,914

2.évi	kezelések	N	átlag	szórás
WGA	Ø	21	73,371	13,716
	G	21	71,247	21,719
	F	18	56,319	34,750

kezelések		p
Ø	G	,974
Ø	F	,174
F	G	,326

M5. α-amiláz aktivitás eredményeinek statisztikai kiértékelése

M5/1 ábra: 1. évi tenyészkerti kezeletlen minták összehasonlítása

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
2,190	6	14	,106

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	,008	6	,001	5,146	,005
Hiba	,004	14	,003		

LSD teszt:

	CY45Ø	T106Ø	T116Ø	T117Ø	T124Ø	T128Ø
T129Ø	●●			●	●	
T128Ø	●●●			●	●	
T124Ø		●				
T117Ø		●				
T116Ø	●					
T106Ø	●●					

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	Sign.
,042	,010	,020	,064	,001

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M5/2 ábra: 1. évi tenyészkerti Granstar kezelt minták összehasonlítása

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
1,836	6	14	,164

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	,001	6	,000	1,189	,367
Hiba	,002	14	,000		

Bonferroni teszt:

	CY45G	T106G	T116G	T117G	T124G	T128G
T129G						
T128G						
T124G						
T117G						
T116G						
T106G						

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	Sign.
-,002	,008	-,019	,016	,843

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M5/3 ábra: 1. évi tenyészkerti Finale kezelt minták összehasonlítása

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
1,836	6	14	,164

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	,002	6	,000	1,432	,270
Hiba	,002	14	,000		

Bonferroni teszt:

	CY45G	T106F	T116F	T117F	T124F	T128F
T129F						
T128F						
T124F						
T117F						
T116F						
T106F						

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	Sign.
-,005	,008	-,028	,013	,555

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M5/4 ábra: 2. évi tenyészkerti kezeletlen minták összehasonlítása

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
,984	6	14	,472

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	,006	6	,001	1,529	,240
Hiba	,010	14	,001		

Bonferroni teszt:

	CY45Ø	T106Ø	T116Ø	T117Ø	T124Ø	T128Ø
T129Ø						
T128Ø						
T124Ø						
T117Ø						
T116Ø						
T106Ø						

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	p
,021	,016	-,014	,055	,227

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M5/5 ábra: 2. évi tenyészkerti Granstar kezelt minták összehasonlítása

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
1,096	6	14	,412

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	,001	6	,000	1,113	,403
Hiba	,003	14	,000		

Bonferroni teszt:

	CY45G	T106G	T116G	T117G	T124G	T128G
T129G						
T128G						
T124G						
T117G						
T116G						
T106G						

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	Sign.
,015	,009	-,050	,035	,130

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M5/6 ábra: 2. évi tenyészkerti Finale kezelt minták összehasonlítása

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
2,206	6	14	,104

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	,003	6	,000	1,931	,146
Hiba	,004	14	,000		

Bonferroni teszt:

	CY45G	T106F	T116F	T117F	T124F	T128F
T129F						
T128F						
T124F						
T117F						
T116F						
T106F						

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	Sign.
,025	,010	,004	,046	,024

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M5/7 ábra: Az évjárat hatásának vizsgálata

	év	N	átlag	szórás	t	p
α-amiláz	2001	60	,288	,018	-,091	,928
	2002	60	,288	,021		

M5/8. ábra: A herbicid kezelés hatásának vizsgálata

1.évi	kezelések	N	átlag	szórás
α-amiláz	Ø	21	,291	,024
	G	21	,285	,014
	F	18	,288	,018

kezelések		p.
Ø	G	,681
Ø	F	,967
F	G	,811

2.évi	kezelések	N	átlag	szórás
α-amiláz	Ø	21	,282	,028
	G	21	,297	,015
	F	18	,285	,016

kezelések		p
Ø	G	,120
Ø	F	,977
F	G	,068

M6. Összamiláz aktivitás eredményeinek statisztikai kiértékelése

M6/1 ábra: 1. évi tenyészkerti kezeletlen minták

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
1,930	6	14	,146

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	7,337	6	1,223	68,007	,000
Hiba	,252	14	,018		

LSD teszt:

	CY45Ø	T106Ø	T116Ø	T117Ø	T124Ø	T128Ø
T129Ø	●●●		●●●	●●●	●●	●●●
T128Ø	●●●	●●●			●●●	
T124Ø	●●●	●●	●●●	●		
T117Ø	●●●	●●●	●			
T116Ø	●●●	●●●				
T106Ø	●●●					

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	p
-1,313	,084	-1,492	-1,133	,000

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M6/2 ábra: 1. évi tenyészkerti Granstar kezelt minták

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
1,664	6	14	,202

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	2,539	6	,423	3,039	,041
Hiba	1,950	14	,139		

LSD teszt:

	CY45G	T106G	T116G	T117G	T124G	T128G
T129G						●
T128G		●		●		
T124G				●		
T117G						
T116G						
T106G						

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	p
-,095	,233	-,595	,404	,688

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M6/3 ábra: 1. évi tenyészkerti Finale kezelt minták

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
2,349	6	14	,088

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	1,194	6	,199	34,494	,000
Hiba	,081	14	,006		

LSD teszt:

	CY45G	T106F	T116F	T117F	T124F	T128F
T129F	●●		●●●	●●●	●	●
T128F	●●●		●●●	●●●		
T124F	●●●		●●●	●●●		
T117F	●	●●●	●			
T116F	●●●	●●●				
T106F	●●●					

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	p
-,117	,047	-,219	-,016	,027

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M6/4 ábra: 2. évi tenyészkerti kezeletlen minták

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
1,078	6	14	,421

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	,843	6	,140	1,576	,226
Hiba	1,248	14	,089		

Bonferroni teszt:

	CY45Ø	T106Ø	T116Ø	T117Ø	T124Ø	T128Ø
T129Ø						
T128Ø						
T124Ø						
T117Ø						
T116Ø						
T106Ø						

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	p
-,386	,186	-7,850	0,014	,057

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M6/5 ábra: 2. évi tenyészkerti Granstar kezelt minták

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
2,590	6	14	,067

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	2,571	6	,428	4,837	,007
Hiba	1,240	14	,890		

LSD teszt:

	CY45G	T106G	T116G	T117G	T124G	T128G
T129G	●●●	●●	●	●	●●●	●●
T128G						
T124G				●		
T117G						
T116G						
T106G						

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	p
,361	,186	-,037	,750	,720

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M6/6 ábra: 2. évi tenyészkerti Finale kezelt minták

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
2,055	6	14	,125

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	,959	6	,160	1,135	,392
Hiba	1,971	14	,140		

Bonferroni teszt:

	CY45G	T106F	T116F	T117F	T124F	T128F
T129F						
T128F						
T124F						
T117F						
T116F						
T106F						

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	p
1,000E-02	,234	-,492	,512	,967

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M6/8. ábra: Az évjárat hatásának vizsgálata

	év	N	átlag	szórás	t	p
összamiláz	2001	60	2,589	,511	-23,943	,000
	2002	60	5,114	,636		

M6/8. ábra: A herbicid kezelés hatásának vizsgálata

1.évi	kezelések	N	átlag	szórás
összamiláz	Ø	21	2,331	,615
	G	21	2,735	,473
	F	18	2,720	,267

kezelések		p.
Ø	G	,065
Ø	F	,041
F	G	,999

2.évi	kezelések	N	átlag	szórás
összamiláz	Ø	21	4,517	,701
	G	21	5,340	,095
	F	18	5,548	,141

kezelések		p.
Ø	G	,000
Ø	F	,000
F	G	,537

M7. Gliadin tartalom eredményeinek statisztikai kiértékelése

M7/1 ábra: 1. évi tenyészkerti kezeletlen minták összehasonlítása

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
,426	6	14	,849

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	161,245	6	26,874	1,013	,455
Hiba	371,273	14	26,520		

LSD teszt:

	CY45Ø	T106Ø	T116Ø	T117Ø	T124Ø	T128Ø
T129Ø						
T128Ø						
T124Ø						
T117Ø						
T116Ø						
T106Ø						

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	Sign.
2,148	3,211	-4,739	9,036	,514

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M7/2 ábra: 1. évi tenyészkerti Granstar kezelt minták összehasonlítása

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
,686	6	14	,665

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	292,647	6	48,774	2,223	,102
Hiba	307,144	14	21,939		

Bonferroni teszt:

	CY45G	T106G	T116G	T117G	T124G	T128G
T129G						
T128G						
T124G						
T117G						
T116G						
T106G						

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	Sign.
4,840	2,921	-1,425	11,105	,120

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M7/3 ábra: 1. évi tenyészkerti Finale kezelt minták összehasonlítása

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
,568	6	14	,749

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	222,855	6	37,142	1,899	,151
Hiba	273,778	14	19,556		

Bonferroni teszt:

	CY45G	T106F	T116F	T117F	T124F	T128F
T129F						
T128F						
T124F						
T117F						
T116F						
T106F						

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	Sign.
5,843	2,758	-0,0719	11,757	,056

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M7/4 ábra: 2. évi tenyészkerti kezeletlen minták összehasonlítása

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
,570	6	14	,748

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	179,130	6	29,855	1,470	,258
Hiba	284,324	14	20,309		

Bonferroni teszt:

	CY45Ø	T106Ø	T116Ø	T117Ø	T124Ø	T128Ø
T129Ø						
T128Ø						
T124Ø						
T117Ø						
T116Ø						
T106Ø						

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	p
	2,810	-2,763	9,292	,265

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M7/5 ábra: 2. évi tenyészkerti Granstar kezelt minták összehasonlítása

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
1,033	6	14	,445

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	217,610	6	36,268	,888	,529
Hiba	571,563	14	40,826		

Bonferroni teszt:

	CY45G	T106G	T116G	T117G	T124G	T128G
T129G						
T128G						
T124G						
T117G						
T116G						
T106G						

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	Sign.
4,679	3,985	-3,867	13,225	,260

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M7/6 ábra: 2. évi tenyészkerti Finale kezelt minták összehasonlítása

Levene Variancia homogenitási teszt:

F	df1	df2	p
,698	6	14	,656

F-próba:

Az eltérés forrása	Eltérés négyzetösszeg	Szabadsági fok	Szórás négyzet	F	p
Hatás	200,893	6	33,482	1,450	,265
Hiba	323,363	14	23,097		

Bonferroni teszt:

	CY45G	T106F	T116F	T117F	T124F	T128F
T129F						
T128F						
T124F						
T117F						
T116F						
T106F						

A kontroll csoporthoz való hasonlítás:

Kontraszt becslése	Std. Hiba	Alsó határ	Felső határ	Sign.
4,987	2,997	-1,441	11,415	,118

● p<0,05, ●● p<0,01, ●●● p<0,001

M7/7 ábra: Az évjárat hatásának vizsgálata

	év	N	átlag	szórás	t	p
gliadin	2001	60	36,96	5,12	-2,408	,180
	2002	60	39,24	5,27		

M7/8. ábra: A herbicid kezelés hatásának vizsgálata

1.évi	kezelések	N	átlag	szórás
gliadin	Ø	21	37,88	5,16
	G	21	37,25	5,47
	F	18	35,55	4,61

kezelések		p.
Ø	G	,688
Ø	F	,162
F	G	,307

2.évi	kezelések	N	átlag	szórás
gliadin	Ø	21	38,86	4,81
	G	21	39,89	6,28
	F	18	38,92	4,69

kezelések		p
Ø	G	,534
Ø	F	,975
F	G	,572

M8. Szülői és transzgénikus vonalak aminosav összetételi adatai

M8/1. ábra: 1. évi tenyészkerti minták aminosav összetételi adatai (AA%)

	1. évi tenyészkerti minták										
	CY-45 (Ø)	T (Ø)			T (F)			CY-45 (G)	T (G)		
	Átlag	Átlag	Intervallum	Szórás	Átlag	Intervallum	Szórás	Átlag	Átlag	Intervallum	Szórás
Esszenciális aminosavak											
Lizin	5,17	4,92	4,46-5,20	0,28	5,39	4,10-8,06	1,36	4,79	4,47	3,78-4,99	0,58
Leucin	7,67	8,47	7,94-9,37	0,49	9,06	8,67-9,48	0,32	9,1	9,06	8,27-9,60	0,53
Izoleucin	4,04	4,39	4,12-4,74	0,21	4,66	4,56-4,87	0,14	4,89	4,76	4,42-5,06	0,26
Treonin	3,40	3,99	3,64-4,79	0,41	4,13	3,75-4,54	0,26	4,40	3,97	3,60-4,52	0,38
Valin	4,79	5,04	5,06-6,23	0,43	5,62	5,08-6,22	0,44	5,68	5,73	5,24-6,11	0,30
Metionin	0,70	0,63	0,59-0,68	0,04	0,60	0,31-0,70	0,15	0,89	0,62	0,59-0,68	0,04
Fenilalanin	5,66	5,95	5,51-6,21	0,25	6,32	5,61-5,72	0,39	6,63	6,58	6,20-6,84	0,27
Triptofán	1,32	1,22	1,13-1,32	0,08	1,30	1,12-1,94	0,32	1,33	1,13	1,06-1,22	0,06
Nem-esszenciális aminosavak											
Alanin	4,05	4,95	4,31-6,27	0,69	5,54	4,66-7,44	0,99	5,11	4,96	4,45-5,55	0,48
Aszpartámsav	5,70	7,01	5,92-9,22	1,13	7,81	6,35-10,26	1,39	6,57	6,86	6,38-7,41	0,54
Glutaminsav	38,00	38,26	35,95-40,95	1,64	37,68	29,42-43,49	4,80	41,53	40,67	36,72-42,76	2,79
Szerin	5,45	6,00	5,62-6,70	0,39	5,93	5,35-6,76	0,55	6,88	5,87	5,04-6,95	0,76
Glicin	5,14	5,89	5,24-7,08	0,64	6,73	5,84-8,50	0,93	6,23	6,16	5,56-6,71	0,48
Cisztein	0,51	0,48	0,44-0,51	0,03	0,50	0,25-0,83	0,19	0,77	0,54	0,44-0,81	0,16
Tirozin	4,71	4,36	4,03-4,57	0,28	4,30	2,07-5,08	1,11	5,32	4,69	4,46-4,96	0,20
Hisztidin	4,84	4,48	4,14-4,84	0,29	5,48	4,43-9,44	1,95	4,49	4,41	3,94-4,76	0,27
Arginin	7,03	6,67	6,06-7,03	0,36	8,58	6,73-14,49	2,95	9,55	7,73	7,03-8,37	0,67
Prolin	14,84	14,16	13,27-15,57	0,78	13,47	9,35-15,09	2,10	15,34	14,86	14,27-16,36	0,82

Ahol
T = A hat transzgénikus vonal (T-106, T-116, T-117, T-124, T-128, T-129) eredményeinek átlaga
Ø= kezeletlen minták
G= Granstar kezelt minták
F= Finale kezelt minták

M8/2. ábra: 2. évi tenyészkerti minták aminosav összetételi adatai (AA%)

	2. évi tenyészkerti minták										
	CY-45 (Ø)	T (Ø)			T (F)			CY-45 (G)	T (G)		
	Mean	Mean	Range	SEM	Mean	Range	SEM	Mean	Mean	Range	SEM
Esszenciális aminosavak											
Lizin	3,86	4,43	4,20-4,69	0,20	4,35	3,70-5,50	0,69	5,38	4,24	3,60-4,69	0,45
Leucin	9,22	10,32	9,72-11,10	0,48	10,50	9,36-11,74	0,79	10,86	10,35	8,75-11,38	0,97
Izoleucin	4,65	5,14	4,46-5,69	0,40	5,37	4,46-6,47	0,74	5,44	5,41	4,44-7,17	0,95
Treonin	3,83	4,35	4,10-4,60	0,20	4,30	3,81-4,92	0,40	4,83	4,20	3,71-4,57	0,34
Valin	5,65	6,37	6,04-6,77	0,32	6,36	5,55-7,33	0,68	6,79	6,24	5,61-6,78	0,41
Metionin	0,52	0,56	0,42-0,66	0,10	0,56	0,45-0,66	0,09	0,45	0,55	0,44-0,68	0,41
Fenilalanin	6,02	6,79	6,38-7,36	0,35	6,66	5,96-7,69	0,82	7,02	6,60	5,94-7,53	0,59
Triptofán	1,55	1,72	1,61-1,87	0,10	1,74	1,64-1,86	0,09	1,72	1,70	1,39-1,87	0,18
Nem-esszenciális aminosavak											
Alanin	5,46	6,21	5,92-6,42	0,20	6,17	5,48-7,18	0,61	7,11	6,07	5,47-6,41	0,41
Aszpartámsav	6,72	7,78	7,48-8,03	0,19	7,72	7,08-9,00	0,74	9,27	7,75	7,24-8,41	0,41
Glutaminsav	45,13	49,68	47,81-52,49	1,68	49,76	45,15-53,68	3,30	45,60	49,82	45,78-54,09	2,74
Szerin	4,70	5,36	5,03-5,63	0,24	5,31	4,45-5,82	0,52	5,74	5,26	4,89-5,76	0,33
Glicin	4,82	5,35	5,12-5,57	0,19	5,22	4,77-6,04	0,53	6,01	5,20	4,86-5,48	0,24
Cisztein	0,36	0,41	0,36-0,50	0,05	0,41	0,35-0,53	0,07	0,44	0,42	0,33-0,53	0,08
Tirozin	3,41	4,26	3,19-5,02	0,80	4,35	3,40-4,92	0,74	3,41	4,25	3,38-5,10	0,73
Hisztidin	4,36	4,40	4,12-4,68	0,23	4,35	3,48-4,91	0,47	4,55	4,13	3,57-4,58	0,38
Arginin	6,25	7,86	6,57-8,95	0,82	7,48	6,57-8,79	0,82	8,54	7,75	7,31-8,93	0,59
Prolin	15,67	17,03	15,97-18,63	1,04	17,80	15,97-18,79	1,02	17,52	18,56	16,23-20,83	1,60

Ahol
T = A hat transzgénikus vonal (T-106, T-116, T-117, T-124, T-128, T-129) eredményeinek átlaga
Ø= kezeletlen minták
G= Granstar kezelt minták
F= Finale kezelt minták

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, **Dr. Gelencsér Évának** az iránymutatásait, tanácsait s az általa nyújtott elméleti hátteret, amelyek nagymértékben hozzájárultak doktori dolgozatom elkészítéséhez.
Köszönöm **Dr. Bánáti Diánának**, a Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet Főigazgatójának a lehetőséget, hogy ezen Intézményben készíthettem el a doktori munkámat.
Köszönöm **Dr. Pauk Jánosnak**, a kísérleteimhez biztosított vizsgálati mintákért.
Köszönöm, **Dr**. **Beczner Juditnak és a** Mikrobiológiai Osztálynak a tenyészkerti kísérletekből származó minták mikrobiológiai szennyezettségének vizsgálataiért.
Köszönöm **Dr. Szamos Jenőnek** hogy tisztított antigént biztosított vizsgálataimhoz.
Köszönöm **Dr. Polgár Mariannak** a kísérleteimhez biztosított humán szérumokért.
Köszönöm **Drégely-Kiss Ágotának** a statisztikai kiértékelésben nyújtott segítségéért.
Külön köszönettel tartozom **Dr. Szabó Erzsébetnek, Dr. Nagyné-Gasztonyi Magdolnának, Dr. Szerdahelyi Emőkének, Dr. Szabó Erikának, Dr. Jánosi Annának, Dr. Zalán Zsoltnak, Horváthné Dr. Szanics Enikőnek, Dr. Takács Krisztinának,** hogy szakmai tudásukkal, gyakorlati tanácsaikkal segítettek munkámban.
Külön köszönettel tartozom **Kissné Valentin Évának, Molnár Mihálynénak, Háderné Sólyom Katalinnak, Gyebróczki Józsefnek** a laborban és állatházban nyújtott segítségükért, gyakorlati tanácsaikért.
Köszönetemet fejezem ki a **Biológia Osztály minden egyes munkatársainak és az intézeti kollegáknak** baráti segítőkészségükért, valamint a bíztatásukért.
Köszönöm **családom, minden kedves rokon és barát** türelmét és támogatását nélkülük nem sikerült volna célom elérése.