



---

**Élelmiszertudományi Kar**

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

**Maczó Anita**

**PhD értekezés tézisei**

Készült a Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet

Biológia Osztályán

Jogutódja: Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ

Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet

Biológia Osztály

**Budapest**

**2015**

**A doktori iskola**

**megnevezése:** Élelmiszertudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Élelmiszertudományok

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

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

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

## 1. BEVEZETÉS

A hüvelyesek (*Leguminosae* vagy *Fabaceae*) rendjébe tartozó növények fontos szerepet töltenek be a humán táplálkozásban azáltal, hogy kitűnő forrásai a szénhidrátoknak, rostoknak, ásványi anyagoknak és fehérjéknek, melyek bioaktív szerepe az utóbbi évek táplálkozástudományi kutatásainak fontos részét képezik. A tartalékfehérjéket képező albumin és globulin frakció mellett, a kutatások előterébe kerültek olyan minor fehérjekomponensek, amelyek főleg biológiailag aktív fehérjékből állnak.

A biológiailag aktív komponensekkel végzett korai kutatások elsősorban az antinutritív anyagok negatív hatását vizsgálták laboratóriumi és haszonállatok tápanyag hasznosításában. E vizsgálatok hasznos mennyiségi és minőségi információkat szolgáltatottak a káros hatás jellemzésére. Így indulhatott meg a nemkívánatos hatást csökkentő eljárások fejlesztése is. Az utóbbi évtizedben azonban szemléletváltás következett be, mely jelentős fejlődést eredményezett táplálkozásban betöltött szerepük megítélésében. A tudományos érdeklődés egyre inkább e komponensek egészséggel és életminőséggel kapcsolatos előnyös alkalmazásának irányába fordult. Kiemelt szerepet kapott a tápcsatornával való kölcsönhatásuk vizsgálata, többek között a metabolizmus, a hormon- és az immunreguláció, melyekkel kapcsolatban még ma is sok a feltárni való ismeret. Ezért, a témában élen járó kutatók az „antinutritív” kifejezés helyett „a nem tápanyaghordozó, bioaktív komponensek” kifejezést részesítették előnyben. A genetikailag módosított növények fejlesztésével e komponensek egy egészen új, növényvédelmi alkalmazási területe is reflektorfénybe került.

Ilyen, biológiailag aktív fehérjék csoportjába tartoznak a főként babokban (*Phaseolus vulgaris*) előforduló alfa-amiláz inhibitorok ( $\alpha$ AI), melyeket egy közös lektin-géncsalád kódol. Az  $\alpha$ AI az alfa-amiláz emésztőenzim katalízisét gátolja enzim-inhibitor komplex kialakítása révén. Az  $\alpha$ AI-1 a humán illetve rovar eredetű nyál és pankréász enzimeivel szemben hatásos. A növényi fehérjeszintézist követően az  $\alpha$ AI-1 egy funkcionálisan inaktív előfehérjéből poszt-transzlációs módosulások alkalmával aktív alegységekké bomlik. Gátló hatásuk miatt a növényi kártevők szénhidrát és energiahasznosulását károsan befolyásolják, így a növényi védőfehérjék családjába sorolandók.

Az új biotechnológiai kutatásokban ugyanezt a szénhidrát metabolizmust befolyásoló funkciót eredményesen hasznosították a növényi kártevők elleni védekezésben. A Tendergreen bab (*Phaseolus vulgaris* L. vs Tendergreen) eredetű  $\alpha$ AI-1 gén borsóba (*Pisum*

*sativum*) való transzformálása hatásosnak bizonyult a borsó kártevő (*Bruchus pisorum*) elleni védekezésben. További kutatások azonban rávilágítottak arra, hogy az  $\alpha$ AI-1 transzformációja a fehérje immunológiai jellegének megváltozását eredményezte. Ez felvetette az allergén kockázat veszélyét is, mely fontos élelmiszerbiztonsági kérdés. Ezért további kutatások irányultak a bab eredetű  $\alpha$ AI-1-ek szerkezet funkció kapcsolatának vizsgálatára. Így derült fény arra a megfigyelésre, hogy az  $\alpha$ AI-1-ek nemcsak a GM borsóban, hanem egyes babfajtákban is hasonló immunogén jelleggel bírnak. Mivel az allergének fajspecifikusan képesek kóros immunválasz kiváltására és a humán vizsgálatok számos etikai problémát vetnek fel, jelenleg sincs validált állatmodell ennek vizsgálatára. Ezért, továbbra is nyitva maradt az a kérdés, hogy  $\alpha$ AI-1 fehérje jelent-e allergén kockázatot a humán szervezetben.

A bab  $\alpha$ AI-1-ek a humán szénhidrát metabolizmusban betöltött szerepük miatt is fontos tárgyát képezik a kutatásoknak az egészségmegőrzés és életminőség javítása szempontjából. Mivel az  $\alpha$ AI-1 a keményítő lebontását befolyásolja, ezáltal ígéretes összetevő lehet az elhízottak és cukorbetegségektől diétájában. Ugyanakkor az elhízás elleni készítményeknek, számos nem kívánatos mellékhatását bizonyították, melyek vetekednek a tényleges hatással. Ezért lett fontos a nem gyógyszeralapú alternatívák kutatása az elhízás megelőzésére és diétás alkalmazására. A babokban (*Phaseolus vulgaris*) található  $\alpha$ AI-1-ek szénhidrát metabolizmust befolyásoló funkciójuk miatt (ún. „starch blocker”) kínáltak egy alternatív lehetőséget az életminőség javításában. A tisztított  $\alpha$ AI-1 klinikai körülmények között kevésbé volt hatásos a részlegesen tisztított bab fehérje extraktumokkal szemben. Ennek megértése újabb kutatásokat igényel.

Ismert, hogy a fehérjék többsége lebomlik az emésztés során, hozzájárulva ezzel a szervezet létfenntartásához és az egészség megőrzéséhez szükséges energia- és esszenciális aminosav ellátásához. Míg számos kutatás folyt az  $\alpha$ AI-1 enzimgátló hatásáról a tápcsatornában, addig az inhibitor sorsáról a tápcsatornában csak kevés adat áll rendelkezésre. Tápcsatornában való viselkedésük és rezisztencia esetén kifejtett enzimgátló vagy immunmoduláló hatásuk megismerésében azonban még sok feltáratlan terület maradt.

Bár számos kutatás indult e fehérje szerkezeti és funkcionális tulajdonságainak jellemzésére, még több nyitott kérdés maradt a kutatás számára. Így, a fehérje szerkezetének pontosabb megismerése olyan új információkat eredményező módszerekkel, mint pl. a proteomika, indokolt. A szerkezet és funkció kapcsolatának megismerése és összekötése olyan biológiai aktivitás vizsgálatokkal, mint pl. az antigenitás vagy allergenitás még további kutatást igényel. Ez utóbbiak fontosak mind a táplálkozási ismeretek bővítése mind pedig az élelmiszerbiztonság számára.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

- Számos kutatási eredmény áll rendelkezésre a bab eredetű  $\alpha$ AI-1-ek szerkezet és funkció közötti kapcsolatának feltárására. Ismert tény, hogy bab inhibitorok aktív  $\alpha$ - és  $\beta$ -láncainak biológiai aktivitása az aminosav összetétel és a glükán szerkezet függvényében eltérő, mégis további adatok szükségesek az allergén kockázat és az egészséggel kapcsolatos pozitív állítások igazolására. Ezért célul tűztem ki a Magyarországon termesztett babfajtákból (*Phaseolus vulgaris* L.) tisztított  $\alpha$ AI-1-k összehasonlító, proteomikai vizsgálatát egy már jól jellemzett babfajtából (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Tendergreen) izolált  $\alpha$ AI-1-el, illetve ennek borsóban (*Pisum sativum* L.) expresszált, tisztított formájával.
- A Tendergreen bab eredetű  $\alpha$ AI-1 expressziója GM borsóban eltérő glükán szerkezetű és immunogenitású fehérjét eredményezett, azt sugallva, hogy ez akár allergén kockázatot is jelenthet. Ismert tény, hogy az  $\alpha$ AI szupercsalád tagjai atópiás betegekben allergiát válthatnak ki. Ugyanakkor az allergén reakciók fajspecifikus volta miatt nincs validált *in vivo* modell az allergén aktivitás/keresz-reaktivitás vizsgálatára. Ezért célom volt a donor Tendergreen bab, és a transzformált GM borsó eredetű  $\alpha$ AI-1 immunogenitásának vizsgálata súlyos kombinált immunhiányos humanizált egérmodellben (HuSCID) orális érzékenyítést követően. További célom volt a Tendergreen bab, a GM borsó eredetű  $\alpha$ AI-1 és a nGM borsó IgE-reaktív epitóp mintázatának összehasonlító vizsgálata a kísérletekből nyert egérszérumokkal szemben, a klinikailag igazolt hüvelyes allergiában szenvedő betegek,  $\alpha$ AI-1 specificitással rendelkező szérumával összehasonlításban.
- Ismert, hogy  $\alpha$ AI-1 az emlősök nyál és pankreász eredetű amiláz enzimek működését gátolja, ezáltal blokkolja a keményítő lebomlását az emésztés során. Ezt felismerve számos  $\alpha$ AI-1 preparátumot, beleértve a bab eredetű inhibitor is, alkalmaztak elhízottak és 2. típusú cukorbetegség diétájában, illetve testtömeg kontrolljában. Ugyanakkor klinikai vizsgálatokban a tisztított készítmények kevésbé voltak hatékonyak a részlegesen tisztított készítményekkel szemben, melynek okát nem sikerült érdemben feltárni. Ezért célom volt az általam izolált bab eredetű  $\alpha$ AI-1-k viselkedését megismerni szimulált gyomorfoliadékban, illetve egy  $\alpha$ AI-1 tartalmú tarkabab bab őrlemény tápcsatornában való viselkedését megismerni akut patkánymodellben, különös tekintettel az immunreaktív és az enzimaktív szerkezet megőrzésére.

### 3. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

#### 3.1. Babok és izolált fehérjék

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

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

*Magyarországi kereskedelmi forgalomból szerzett babfajták:*

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

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

#### 3.2.Vérszérumok

- Klinikailag igazolt hüvelyes allergiás anonim humán szérumok (Allergo-Derm Bakos Kft. Etikai bizottság jóváhagyásának száma: GH277-1/2011). Ismeretlen eredetű csalánkiütéses, vagy hüvelyes terhelést követően, krónikus és néhány esetben légúti klinikai tüneteket produkáló anonim felnőtt betegek, illetve hüvelyes allergia tüneteit nem produkáló egészséges anonim donorok szérumai. A vizsgálatba vont betegek, hüvelyes

terhelést követően a natív hüvelyes növényvel szemben pozitív allergén specifikus “*Prick in Prick*” teszteredményt produkáltak. A klinikai tünetek erősségének függvényében a skálán növekvő értékek szerepeltek (1:+, 2: ++, 3: +++). Négy hetes eliminációs diéta után egy ismételt hüvelyes terhelést követően a klinikai tünetek ismételt megjelenését tapasztalták.

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

### 3.3. Vizsgálati módszerek

- A kereskedelmi forgalomból szerzett és referenciaként alkalmazott őrleményekből desztillált vízzel 1:10 arányban (tf %), szobahőmérsékleten, 1400 rpm fordulatszámon 1 órán át történő keverést követően 10 percig 10000 g értéken való centrifugálással készítettem fehérje extraktumokat.
- Az elektroforézis vizsgálatokat denaturáló körülmények között (SDS-PAGE) Laemmli (1970) módszere alapján végeztem 15%-os elválasztógélt és 6%-os gyűjtőgélt alkalmazva, TRISZ-SDS-glicin tartalmú futtató-pufferrel, 200 V, 400 mA paraméterekkel 50-70 percig MINI-PROTEAN 3-CELL (Bio-Rad) készülékben. Az elválasztás után Coomassie Blue festékkel tettem láthatóvá a fehérjesávokat.
- Az  $\alpha$ AI-1-ek aktivitásának detektálására az elektroforézist natív körülmények között (natív-PAGE) végeztem 10%-os natív poliakrilamid gélen TRISZ-glicin tartalmú futtató pufferben 200 V, 47 mA paraméterekkel. Az elválasztás után a géleket  $\alpha$ -amiláz enzimet

tartalmazó extrakciós oldatban, majd keményítőt tartalmazó extrakciós oldatban szobahőmérsékleten inkubáltam. Az aktív sávokat kálium-jodid oldattal tettem láthatóvá.

- Az izoelekromos fókuszálást immobilizált pH grádiens (pH 3-10) tartalmazó 7 cm-es gélsíkon végeztem lineárisan 250V- 24.000Vh növekedő feszültség mellett. A gélsíkokat először DTT tartalmú equilibráló oldatban, majd jódetamidot tartalmazó equilibráló oldatban inkubáltam, ezután SDS-PAGE-n molekulatömeg szerint szeparáltam.
- A LOC elektroforézist kit segítségével végeztem a gyártó leírása alapján.
- Az immunblott vizsgálatoknál az 1-DE illetve 2-DE szeparált fehérjéket PVDF membránra való blottolás után nyúlban termelt Tendergreen bab  $\alpha$ AI elleni specifikus ellenanyaggal (1:40) illetve hüvelyes allergiás humán szérummal (1:20) egy éjszakán át szobahőmérsékleten inkubáltam. Ezután torna-peroxidáz enzimmel (HRPO) jelölt anti-nyúl IgG (1:500) illetve kecskében termelt HRPO jelölt anti-humán IgE (1:100) másodlagos ellenanyaggal inkubáltam a membránt. Az immunreaktív fehérjéket 4-chloro-1-naphftol szubsztrátoldat hozzáadásával tettem láthatóvá.
- A fehérjék deglikozilálását WOODWARD (1984) módszere alapján végeztem, melynek során a membránra blottolt fehérjékről savas közegben nátrium-metaperjodáttal elimináltam a szénhidrátokat.
- A Schiff-festést SACCHARIUS (1969) módszere alapján végeztem. A membránra blottolt fehérjéket perjódsavban, majd Schiff-reagensben és metabiszulfítban inkubáltam.
- A kromatográfiás fehérjetisztítás során DEAE anioncserélő oszlopot és Superose 12 gélszűrő oszlopot alkalmaztam.
- Az  $\alpha$ AI aktivitás mérését MURAO (1981) módszere alapján végeztem. A fehérjeoldatokat sertés eredetű pankreász alfa-amiláz enzimmel és keményítővel inkubáltam. A reakció savoldattal történő leállítására és az elegyek jóddal való inkubálása után 660 nm-en mértem az elegyek abszorbanciáját, amelyből a következő egyenlettel határoztam meg az  $\alpha$ AI aktivitásokat: 
$$\text{Inhibitor aktivitás (\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{minta}} - \text{OD}_{\text{kontroll}}}{\text{OD}_{\text{vak}} - \text{OD}_{\text{kontroll}}} \times 100$$
- A heamagglutinációs tesztet CUADRADO (1996) módosított módszere alapján végeztem. A bab és borsó őrleményekből 0,9% NaCl oldattal extraktumot készítettem, amelyek 100 $\mu$ l-ét kétszeres tova futó hígítással mértem mikrotiter lemezre. A Tendergreen bab és GM borsó eredetű  $\alpha$ AI- ok 1 mg/ml-es oldatából kiindulva hasonlóan jártam el. Ezután tízszeres hígítású EDTA alvadás gátlót tartalmazó csőbe levett patkányvér 100  $\mu$ l-ét adtam mindegyik mintához. Szobahőmérsékleten való inkubálás után pozitív (bab PHA-L) és negatív (0,9% NaCl oldat) kontrollokhoz viszonyítva értékeltem ki.



- A tömegspektrometriás vizsgálatokhoz a 2-DE szeparált  $\alpha$ AI- fehérjéket a gélről való kivágás után tripszinnel emésztettem, majd emésztett mintákat Zorbax 300 SB-C8 (3.5 micron, 2.1x150mm, Agilent Technologies) oszloppal rendelkező Ultimate 3000 RSLC (Dionex, Germany) készülékbe injektáltam. Electrospray ionizációt (ESI) követően az oszlopról leoldott peptideket 214 nm-en és 280 nm-en UV detektor és microTOF II (time-of-flight) repülési idő analizátor (Bruker Daltonics, Germany) analizálta. A spektrumok felvétele 100-3000  $m/z$  tömegtartományban történt. Az  $\alpha$ AI peptideket *in silico* emésztett peptid markerek (*Phaseolus vulgaris*  $\alpha$ AI **P02873**, UniProt) alapján azonosítottam.
- Az  $\alpha$ AI *in vitro* pepszines emésztése szimulált gyomor fázisban THOMSAS (2004) és KUMAR (2011) módszere alapján történt. A tisztított  $\alpha$ AI-okat illetve a bab extraktumokat sertés pankréasz eredetű pepszinnel 60 percen történő emésztést követően  $\alpha$ AI aktivitásfestéssel vizsgáltam. A tisztított  $\alpha$ AI-ok immunreaktivitását emésztés után immunblotton vizsgáltam nyúlban Tendergreen bab  $\alpha$ AI ellen termelt ellenanyag segítségével.
- Az  $\alpha$ AI tápcsatornában való túlélésének vizsgálatát akut patkánymodellben vizsgáltam. 60 perces emésztést követően az eltávolított gyomor és bél mintákból extrahált fehérjéket elektroforézissel (SDS-PAGE, natív PAGE) és immunblottal vizsgáltam. A gyomor mintákból extrahált fehérjéket LOC elektroforézissel is elválasztottam.

#### 4. EREDMÉNYEK

- Első célkitűzésemnek megfelelően proteomikai vizsgálatokkal kapott eredményeim alapismeretekkel járultak hozzá a Magyarországon termesztett *Phaseolus vulgaris* babfajtákban található  $\alpha$ AI-ok biokémiai tulajdonságainak megismeréséhez. Az  $\alpha$ AI  $\alpha$ - és  $\beta$ -láncainak detektálása során variabilitást találtam a különböző babokból izolált  $\alpha$ AI-okban. Mivel a detektálás a Tendergreen bab  $\alpha$ AI aminosav szekvenciájára leírt marker peptidek alapján történt, ezért a munka folytatásaként szükségesnek tartom a magyarországi babokból izolált  $\alpha$ AI-ok pontos aminosav szekvenciájának meghatározását.
- Referenciaként használt Tendergreen bab és GM borsó, valamint magyarországi kereskedelmi forgalomból szerzett *Phaseolus vulgaris* babfajták fehérjéit 1-DE illetve 2-DE módszerrel szeparáltam. A referenciaként alkalmazott Tendergreen bab és GM borsó  $\alpha$ AI-ok molekulatömegei illetve nyúlban Tendergreen bab  $\alpha$ AI ellen termelt ellenanyag segítségével a szeparált fehérjékben azonosítottam az  $\alpha$ AI-okat.
- Az őrleményekből fehérje extraktumokat készítettem és natív-PAGEN történő aktivitásfestéssel illetve spektrofotometriás módszerrel  $\alpha$ AI aktivitást igazoltam.
- A GM borsó illetve a nem-GM borsó őrleményekben 2-DE szeparálást követően szoftveres kiértékeléssel feltérképeztem a különbségfehérjéket. A GM növényben 79, a nGM növényben 54 fehérjefoltot detektáltam.
- A bab és borsó fehérje extraktumok 10 percig 80 °C-on történő hőkezelés után jelentősen veszítettek inhibitor aktivitásukból, illetve 10 percig 100 °C-on történő hőkezelés után már teljesen elveszítették aktivitásukat.
- Hemagglutinációs teszt eredményei alapján a tisztított Tendergreen és GM borsó eredetű  $\alpha$ AI-ok nem mutattak lektin aktivitást ellentétben a bab és borsó őrleményekkel.
- Cink-hidroxid szervesen adszorbenst alkalmazó kromatográfias fehérjetisztítási módszert dolgoztam ki az  $\alpha$ AI izolálására a magyarországi babfajtákból valamint a GM borsóból.
- Elektroforézis (1-DE 2-DE, LOC) és tömegspektrometriás módszerekkel igazoltam, hogy míg a bab izolátumok tartalmazzák az  $\alpha$ AI-előfehérjét, addig a GM borsóban az előfehérje sáv nem volt detektálható. Schiff-festéssel igazoltam, hogy az izolált fehérjék glikoproteinek.
- Az 1-D elválasztással eddig felismert két fő sáv mellett, a 2-DE elválasztást követően az izolált  $\alpha$ AI-ban három fehérjefoltot azonosítottam a molekulatömegek és izoelektromos pontok alapján.

- A 2-DE szeparált  $\alpha$ AI foltokban tripszines emésztést követően LC-TOF-MS módszerrel *in silico* emésztett marker peptidek alapján a Tendergreen bab  $\alpha$ AI-ra jellemző  $\alpha$ - és  $\beta$ -láncokat azonosítottam.
- Második célkitűzésem szerint, az  $\alpha$ AI fehérje vizsgálata során arra szerettem volna választ kapni, hogy jelent-e az  $\alpha$ AI élelmiszerbiztonsági szempontból kockázatot a hüvelyes allergiás egyének számára.
- A bab  $\alpha$ AI aminosav szekvenciája alapján a FAO/WHO kritériumokat tartalmazó adatbázisok (SDAP, ADSF, ProAP) segítségével olyan ismert allergéneket kerestem, amelyek a kritériumoknak megfelelően szekvencia homológiát mutatnak az  $\alpha$ AI-ral.
- Epitóp predikációs szoftver (IEDB) segítségével potenciális lineáris B-sejt epitópokat térképeztem fel az  $\alpha$ AI aminosav szekvenciáján.
- Hüvelyes allergia klinikai tüneteit mutató anonim humán szérumok közül immunblottal szelektáltam az  $\alpha$ AI-ra specifikusakat, mely megerősítette, hogy az  $\alpha$ AI potenciális allergénforrás lehet az arra érzékeny betegek számára. Az  $\alpha$ AI glikoprotein deglikozilálásával kizártam a szénhidrát specifikus IgE kötődést.
- Mivel az allergia kóros, fajspecifikus immunválasz eredménye, ezért nincs validált állatmodell ennek vizsgálatára. Ugyanakkor a humán vizsgálatoknál számos etikai korlát merül fel. Ezért az *EU FP7 GMSAFOOD* keretprogram által biztosított együttműködés keretében lehetőségem nyílt az allergiakutatásban még újnak számító súlyos kombinált immunhiányos humanizált egérmodellben (HuSCID) a bab és GM borsó eredetű  $\alpha$ AI ellenanyagválaszt tanulmányozni és a molekulatömeggel és izo-elektomos ponttal jellemzett, IgE-reaktív polipeptid mintázatot a humán szérumokkal nyert mintázattal összevetni.
- Harmadik célkitűzésem volt annak megismerése, hogy az  $\alpha$ AI immunreaktív és enzimaktív formában éli-e túl a tápcsatorna degradáló hatását, mivel csak ebben az esetben jelenthet potenciális allergén kockázatot a hüvelyes allergiás betegek számára, vagy léphet interakcióba az  $\alpha$ -amiláz enzimmal, gátolva ezzel a szénhidrátok lebontását.
- Szimulált gyomorfolydékban való *in vitro* pepszines emésztést alkalmazva, az izolált  $\alpha$ AI fehérjék immunológiailag aktív formában élték túl az emésztést, azonban inhibitor aktivitásukat elvesztették. Az  $\alpha$ AI-t és annak elő-fehérjéjét tartalmazó bab fehérje extraktumok *in vitro* pepszines emésztését követően az inhibitor aktivitás viszont részlegesen detektálható volt.

- A 100 °C-on hőkezelt Tarkabab fehérje extraktum akut patkánymodellben való *in vivo* emésztése után az  $\alpha$ AI a gyomor mintákban immunogén formában és inhibitor aktív formában is detektálható volt. Az aktivitás a vékonybélben azonban már nem volt detektálható, mivel valószínűleg az inhibitor és a pankreász eredetű  $\alpha$ -amiláz enzim komplexet formált. Így, valószínűleg gátolni képes az enzim működését, ezért hatásos összetevője lehet az elhízottak és 2. típusú cukorbetegség diétájának.

## 5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

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

## AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ TARTOZÓ PUBLIKÁCIÓK

### Impakt faktoros folyóiratcikkek

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

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

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

### Nem impakt faktoros folyóiratcikkek

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

### Angol nyelvű konferencia kiadványok

Nagy A., **Maczó A.**, Hegyi F., Szabó E., Takács K., Szerdahelyi E., Gelencsér É. *In vivo* digestibility of common bean derived alpha-amylase inhibitors. 4<sup>th</sup> International Conference of Food Digestion. 17-19 March 2015, Naples, Italy.

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

**Anita Maczó**, Éva Gelencsér: Characterization of Ig-E binding epitopes in allergens of *Phaseolus vulgaris* bean species. First International Conference on Food Digestion. 19-21, March 2012 Cesena, Italy. abstract number: P31.

**Anita Maczó**, Éva Gelencsér: Investigation of alpha-amylase inhibitor from legume seeds 19-21 October 2011., Le Croisic, France, COST INFOGEST meeting.

### **Magyar nyelvű konferencia kiadványok**

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

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

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

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