

VAD ÉS TERMESZTETT ALAKOR GENOTÍPUSOK PROTEOMIKAI ÉS IMMUNOLÓGIAI VIZSGÁLATA

GELL GYÖNGYVÉR^{1,2}, BIRINYI ZSÓFIA¹, FODOR NÁNDOR¹,
RAKSZEGI MARIANNA¹, KORPONAY-SZABÓ ILMA³ és JUHÁSZ ANGÉLA^{1,4}

¹MTA Agrártudományi Kutatóközpont, Mezőgazdasági Intézet, Martonvásár

²BME, Vegyészmérnöki Kar, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék, Budapest

³Heim Pál Gyermekkórház, Budapest és Debreceni Egyetem, Klinikai központ,
Gyermekgyógyászati Tanszék, Debrecen

⁴Murdoch University Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ, Ausztrália

A gabonafélékhez köthető immunológiai megbetegedések előtérbe kerülésével a növénykutatások egyik kiemelt célja lett az olyan gabonafajták, genotípusok azonosítása, melyek speciális lisztfehérje összetétele a betegek számára is kedvező. A búza tartalékfehérjék kulcsszerepet játszanak a búzához köthető megbetegedések kialakulásában, így a coeliákiás betegek autoimmun reakciójában is.

Jelenleg a coeliákia kezelésére az egyetlen lehetőség az élethosszig tartó gluténmentes diéta. Annak ellenére, hogy a hexaploid kenyérbúza esetében számos információ áll rendelkezésünkre a betegséget kiváltó fehérjékről, az egyszerűbb genom-összetételű vad és termesztett diploid alakor búzák (*Triticum monococcum ssp monococcum* és *Triticum monococcum ssp aegilopoides*) lisztérzékenységet kiváltó fehérjéinek építőpajiról, ezek eloszlásáról és mennyiségéről keveset tudunk.

Kutatásunk fő célja a MTA ATK Mezőgazdasági Intézet Gabona Génbankja által rendelkezésünkre bocsátott, megközelítően 200 vad- és termesztett alakor genotípus magfehérjéinek átfogó vizsgálata, a coeliákiához köthető immunológiai és proteomikai tulajdonságainak jellemzése. Az alakor genotípusok részletes elemzésével kapott eredmények alapján további célunk olyan genotípusok azonosítása, amelyek hozzájárulhatnak alacsony antigén, illetve allergén fehérje tartalmú búza genotípusok nemesítéséhez.

A továbbiakban az előzetes szerológiai ELISA mérések alapján kiválasztott alacsony antigén tartalmú genotípusokat szántóföldön nevelt és kontrollált klímakamrás kísérletsorozatban is vizsgáljuk, ahol emelt légköri CO₂ szint mellett virágzáskor és virágzás utáni fenofázisokban alkalmazott abiotikus stressz kezeléseket vetjük alá őket. Így szabályozott környezeti körülmények között lehetőségünk nyílik az alakor termésbiztonságának, klímadaptációs képességének vizsgálatára, és a coeliákiát, illetve gabona allergiát kiváltó tartalékfehérjék mennyiségi változásának nyomon követésére.

Kulcsszavak: alakor, coeliákia, ELISA

PROTEOMIC AND IMMUNOMIC ANALYSES OF WILD AND CULTIVATED EINKORN GENOTYPES

GY. GELL^{1,2}, ZS. BIRINYI², N. FODOR¹, M. RAKSZEGI¹, I. KORPONAY-SZABÓ³ and A. JUHÁSZ⁴

¹Agricultural Institute, Centre for Agricultural Research, Hungarian Academy of Sciences, Martonvásár

²Department of Applied Biotechnology and Food Science, Budapest University of Technology and Economics

³Coeliac Disease Center, Heim Pál Children's Hospital, Budapest, HU 1089 and Department of Pediatrics,
Clinical Center, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

⁴Murdoch University, School of Veterinary and Life Sciences Perth WA, Australia

With advancement of gluten related disorders, one of the most important goals of the plant research is to identify certain genotypes of cereals or pseudocereals with special flour protein composition, which can be beneficial for patients. Wheat seed storage proteins are considered to be key players triggering wheat related health problems. Therefore, they are responsible for the autoimmune reaction of celiac patients. Currently the only treatment for celiac disease is lifelong adherence to a gluten free diet.

Although several studies are available about the disease-triggering proteins in the view of bread wheat, there are limited information about the epitope content, frequency and distribution of causative proteins in diploid wheat (*Triticum monococcum* ssp. *monococcum* and *Triticum monococcum* ssp. *aegilopoides*).

The main aim of our study is the examination and characterisation of the seed storage protein of the einkorn collection of the Cereal Gene Bank of Agriculture Research Institute in Martonvásár using proteomics, immunomics and bioinformatics analyses.

In this way, we can get important and useful information about the immune reactive and allergen protein level of approximately 200 different einkorn genotypes.

Additionally, environmental effects on epitope content of diploid species (*T. monococcum*) will be characterized within a climate adaptation program. Using growth chamber experiments combined with field trials, we can evaluate a complex interpretation of elevated atmospheric CO₂ combined with specific abiotic stress effects at anthesis and post-anthesis period, and we can monitor their influence on the composition of these proteins. It provides an excellent tool for the climate adaptation ability of einkorn and also suitable for studying the quantitative changes in celiac disease triggering storage proteins under controlled environmental conditions.

Keywords: einkorn, celiac disease, ELISA

Bevezetés

A lisztérzékenység (coeliákia) első sorban a vékonybelet érintő gyulladásos autoimmun megbetegedés, immunológiai intolerancia, amely kiváltói a kalászos gabonafélékben lévő siker (glutén) alkotó fehérjék a genetikailag arra hajlamosak szervezetében. Ezek közé tartoznak a búza gliadin, a rozs szekalin, az árpa hordein. A népesség közel 1%-a szenved coeliákiában, mely során a bélnyálkahártya károsodása miatt felszívódási zavarok, hiánybetegségek alakulhatnak ki.

A búzamazagban található tartalékfehérjék az összfehérje tartalom 70–80 %-át alkotják, kulcsszerepet játszanak a búzához köthető egészségügyi problémák kiváltásában, így a coeliákias betegek autoimmun reakciójában is, melynek kialakulása elsősorban a prolamin családba tartozó fehérjéknek tulajdonítható, így főként az α - és γ -gliadinoknak. Azonban ezek a tartalékfehérjék nem teljes mértékben képviselik a betegségért felelős fehérjék körét, ugyanis a prolamin család további tagjai mellett (HMW és LMW gluteninek, omega gliadinok) egyéb, újonnan azonosított, nem prolamin családba tartozó fehérjék is szerepet játszanak a betegség kialakulásában (Gell et al. 2016, Juhász et al. 2018).

Bár a hexaploid kenyérbúza (*Triticum aestivum*) esetén számos információ áll rendelkezésünkre a coeliákia kiváltásáért felelős fehérjetípusokról, azonban az egyszerűbb genom-összetételű diploid termesztett és vad alakor (*Triticum monococcum* subsp. *monococcum* és *Triticum monococcum* subsp. *aegilopoides*) immunreaktív fehérjéiről keveset tudunk. Az alakor (*Triticum monococcum*; $2n=2x=14$, $A^m A^m$) egyike az első kalászos növényeknek, melyeket kifejezetten élelmezési céllal termesztettek (Monneveux et al. 2000), két alfaja van: a vad alakor (*T. monococcum* subsp. *aegilopoides*, $2n=2x=14$, $A^b A^b$) és a termesztett alakor (*T. monococcum* subsp. *monococcum*, $2n=2x=14$, $A^m A^m$). A termesztett alakor szemtermése nagyobb és teltebb; erős kalászorsója van, mely érskor sem törik, így megakadályozza, hogy a kalászkák érskor szétszóródjanak; a vad fajnál könnyebben csépelhető (Salamini et al. 2002). Az alakor többszörös, egymástól független domesztikációs események alanya, vagyis az alakor domesztikációja, más növényfajokkal ellentétben nem járt együtt a diverzitás csökkenésével, így nagyobb genetikai változatossággal rendelkezik, mint a hexaploid kenyérbúza, tartalékfehérje profilja és epitóp összetétele is változatosabb.

A MTA ATK MGI Gabona Génbankja által rendelkezésünkre bocsátott megközelítően 200 termesztett és vad alakor genotípus által lehetőségünk nyílik a coeliákiához köthető immunológiai és proteomikai tulajdonságok vizsgálatára.

A kiválasztott alacsony antigén és allergén fehérje tartalmú alakor genotípusok klímaadaptációs vizsgálatát szántóföldi és kímakamrás kísérletsorozatban végezzük, mely során a különböző fenofázisokban abiotikus stressz kezeléseket alkalmazunk.

A szabályozott környezeti körülmények között végzett abiotikus stressz kezelések nagyban hozzájárulnak az alakor termésbiztonságának, klímaadaptációs képességének felderítéséhez, emellett lehetőség nyílik toxikus fehérje tartalom mennyiségi változásának nyomon követésére.

Anyag és módszer

A vizsgálat a közel 200 alakor genotípus homogenitás vizsgálatával kezdődött, mely során a teljes magfehérje kivonatok és Orborne frakciók 1D SDS poliakrilamid gélelektroforézis mintázatának összehasonlítását végeztük el.

A fehérjeizolátumokkal saját fejlesztésű szerológiai ELISA tesztet végeztünk, valamint a forgalomban kapható R5 és G12 antitestet tartalmazó ELISA tesztet használtunk. ELISA standardként PWG gliadint és a 'Chinese Spring' kenyérbúza teljes magfehérje kivonatát alkalmaztuk. A szerológiai ELISA teszt során negatív, pozitív beteg és pozitív de glutén mentes diétát folytató betegből származó szérummintával dolgoztunk. A betegek neme, kora és HLA-DQ haplotípusa változatos összetételű volt.

A kiválasztott alacsony coeliákiát kiváltó fehérje tartalmú alakor genotípusok proteomikai vizsgálata során a teljes tartalékfehérje kivonatok kétdimenziós gélelektroforézise és immunoblot vizsgálata után, az immunreaktív fehérjéket azonosítottunk nanoLC-MS/MS vizsgálattal.

A klímakarában történő kezeléseket során, 650 ppm CO₂ koncentrációt alkalmaztunk totális, de nem terminális szárazság stresszel kombinálva. A talajnedvességet folyamatosan monitoroztuk METER Group EC-5 szenzorcsoporttal.

A magmintákból őrlemények készítéséhez Retsch Mixer Mill MM200 malommal dolgoztunk. A fehérjetartalom meghatározása közeli infravörös spektroszkópiával (NIR) történt, a tartalékfehérje összetétel meghatározást SE és RT- HPLC-vel végeztük. A coeliákiát kiváltó immunreaktív fehérjék mérése ez esetben is a forgalomban lévő R5, G12 ELISA tesztekkel történik a gyártó ajánlása szerint, kontrollnak 'Chinese Spring' fehérjekivonatot és PWG gliadin standardot használtunk.

Eredmények

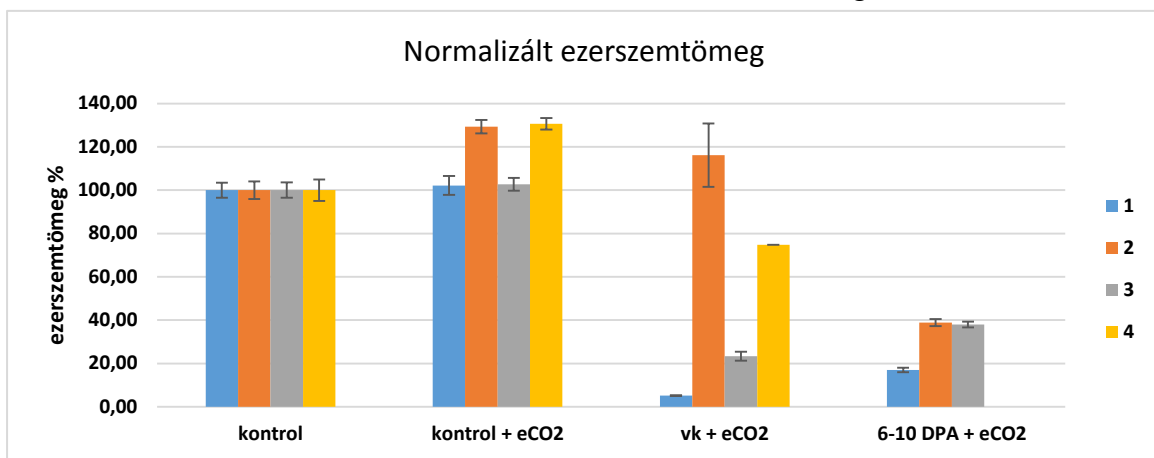
A közel 200 vizsgált alakor genotípus teljes magfehérje kivonatainak, és tartalékfehérje frakcióinak vizsgálata során az egyes genotípusok között nagyfokú variabilitás tapasztalható.

Az szerológiai ELISA tesztek alapján négy alacsony immunreaktivitást mutató genotípust választottunk ki, melyeket a továbbiakban a kereskedelmi forgalomban kapható R5 és G12 ELISA tesztekkel vizsgáltunk, standardként a 'Chinese Spring' kenyérbúzáét és a PWG gliadin referencia anyagot használva. Ennek eredményeként elmondható, hogy előzetes tanulmányunknak megfelelően a gliadin és glutenin fehérjék kimutatására fejlesztett ellenanyagok esetenként nem adnak megbízható eredményt (*Gell et al. 2015*). Esetünkben a négy vizsgált genotípus közül három mind az R5, mind pedig a G12 antitesttel gluténmentesnek, azaz coeliákiás betegek számára biztonságosan fogyaszthatónak minősült, azonban a szerológiai tesztek és immuno blot vizsgálatok nem ezt támasztják alá.

SE - HPLC eredmények alapján az UPP % (Unextractable polymeric glutenin proteins) és a glutenin/gliadin arány csökkenő értékei a minőség romlására utalnak a relatív fehérjetartalom növekedés ellenére.

A normalizált ezerszemtömeg alapján az emelt CO₂ hatására átlagosan 16%-os termésnövekedés tapasztalható a kontroll növények esetében, míg az emelt CO₂ és szennyezés korai szakaszában alkalmazott szárazság stressz kombinációja hatására szignifikáns, átlagosan 76,5%-os termésnövekedés figyelhető meg (1. ábra).

1. ábra Klímakamrában nevelt alacsony immunreaktivitású alakor genotípusok terméshozama különböző fenofázisokban alkalmazott szárazság stressz kezelés emelt légköri CO₂ szint mellett. Kezelések: Kontroll, Emelt CO₂ kontroll, Emelt CO₂ virágzás kezdeti szárazság és emelt CO₂ szennyezés kezdeti szárazság.



A búzával kapcsolatos egészségügyi rendellenességek hátterének növényi oldalról való megértéséhez hasznos információkkal szolgál az alakorban előforduló autoimmun betegséget kiváltó fehérjék komplex vizsgálata. A proteomikai és immunológiai vizsgálatokkal azonosíthatjuk a lisztérzékenység kiváltásáért ténylegesen felelős, emésztésnek ellenálló peptideket. Amellett, hogy sokkal pontosabb információhoz jutunk az alakor tartalékfehérjék és az általuk kiváltott immunbetegség kapcsolatáról, a nagy mintaszámú köszönhetően lehetőség nyílik néhány nagyon alacsony immunreaktivitású genotípus azonosítására, melyek célzott nemesítési alapanyagként szolgálhatnak.

Köszönetnyilvánítás

Gell Gyöngyvér kutatásait az OTKA PD 115641 és GINOP-2.3.2-15-2016-00028 azonosító számú pályázat támogatta. A publikáció a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj és az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-18-4-BME-393 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült.

Irodalom

Gyöngyvér Gell, Krisztina Kovács, István Molnár, Zsuzsanna Bugyi, Tömösközi Sándor, Angéla Juhász (2015) Celiac disease specific prolamin peptide content of wheat relatives and wild species determined by ELISA assays and bioinformatics analyses. *Cereal Res Commun*, **43**, 1. 133-143. doi: 10.1556/CRC.43.2015.1.13

-
- Gell Gy, Kovács K, Veres G, Korponay-Szabó I and Juhász A (2017) Characterization of globulin storage proteins of a low prolamin cereal species in relation to celiac disease. *Sci Rep*, **7**, 39876, doi: 10.1038/srep3987
- Juhász A, Belova T, Florides CG, Maulis C, Fischer I, Gell G, Birinyi Z, Ong J, Keeble-Gagnère G, Maharajan A, Ma W, Gibson P, Jia J, Lang D, Mayer KFX, Spannagl M, International Wheat Genome Sequencing Consortium, Tye-Din JA, Appels R, Olsen O-A (2018) Genome mapping of seed-borne allergens and immunoresponsive proteins in wheat. *Sci Adv*, **4**, eaar8602
- Monneveux P., Zaharieva M., Rekika D. (2000): The utilization of *Triticum* and *Aegilops* species for the improvement of durum wheat. *CIHEAM-Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens*, **40**, 71–81. p.
- Salamini F., Ozkan H., Brandolini A., Schafer-Pregl R., Martin W. (2002): Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. *Nature Reviews Genetics*, **3**, 429–441. p.