

## Bevezetés

Az ismeretlen allergének és a különböző allergiás esetek száma világszerte növekszik és a fejlett országokban az allergiás megbetegedések, szinte járványszerű méreteket öltve, súlyos problémát jelentenek.

Az élelmiszerekben számos allergén található, ezek rendszerint fehérjék, vagy glikoproteinek, molekulatömegük 10 és 70 kDa közötti (Besler, 2001). Megismerésük, továbbá aktivitásuk, epitopjaik és hatásmechanizmusuk meghatározása az élelmiszertudomány és orvostudomány fontos feladata. Az ismeretek alkalmazása ugyanakkor azt is jelenti, hogy módszereket dolgozunk ki az allergének élelmiszerekben való jelenlétének detektálására, illetve koncentrációjuk meghatározására, ami az eddigi tapasztalatok szerint a nehezen megoldható feladatok kategóriájába tartozik.

A gabona allergének közül a búzafehérjék szervezetbe jutása váltja ki a legtöbb allergiás reakciót, amelyek közül a víz- és sóoldható alfa-amiláz/tripszin inhibitor szuperfamilia tartozó fehérjék, illetve a prolamin szuperfamilia tartozó, alkohol oldható gliadinok a jellemzőek. A legrégebben felfedezett búza allergiát, a pék asztnát - 300 évvel ezelőtt Ramazzini írta le elsőként - a búzaliszt, pontosabban a búza albuminok és globulinok inhalációja, okozza (Baur&Posch, 1998).

A búzaliszt allergének azonosításához és jellemzéséhez az elektroforetikus módszereket IgE immunblot eljárásokkal kombinálják, és a kiválasztott fehérjék peptid térképét, illetve aminosav szekvenciáját tömegspektrometriás módszerekkel határozzák meg. Az elektroforetikus módszerek felbontása jobb, mint a kromatográfiás eljárásoké és az allergének jellemzése céljából kétdimenziós elektroforézissel a búzaliszt több száz fehérjekomponense választható szét (Baur&Posch, 1998). Az elektroforézist követő immunblottal többek között Sandiford et al. (1995), Varjonen et al. (1995) és Houba et al. (1996) detektáltak major antigéneket a 12 – 69 kDa molekulatartományban. Kétdimenziós elektroforetikus szétválasztás alkalmazásával Posch et al. (1995), valamint Weiss et al. (1993) 700 egyedi, oldható búzafehérje közül 70-80 fehérjefolt IgE-kötő aktivitását detektálták a 14 – 70 kDa molekulatömeg tartományban. Weiss et al. (1993) megállapították, hogy a legerősebb IgE-kötő frakció az albumin/globulin frakció, és ezen belül a major antigén egy 27000 Da molekulatömegű fehérje. Fontos kvantitatív eredményük továbbá, hogy az adott allergének által megkötött IgE mennyisége jelentős, búzafajta specifikus különbségeket mutat. Fenti és más szerzők egybehangzó eredménye, hogy a péküzemek és cukrászatok fő (major) allergénje az  $\alpha$ -amiláz inhibitor család (heterotetramerek, homodimerek,  $\alpha$ -amiláz inhibitor és búza tioredoxin (Weichel et al. (2006)), ezen kívül néhány enzim (peroxidáz, acil-CoA oxidáz, fruktóz-bifoszfát aldoláz). James et al. (1997) azt találták, hogy az  $\alpha$ -amiláz inhibitor család nem csak inhalatív, hanem egyúttal táplálkozási allergén is (pék-asztnában szenvedő felnőttnél súlyos anaphylaxia alakult ki a búzafehérjék elfogyasztása után). Zapatero et al. (2003) azt találták, hogy egy 9 éves gyermek anaphylaxiás sokkjában (aki toleráns volt tejjel és glutént nem tartalmazó gabonákkal (rizs és kukorica) szemben), amit 5 különböző gabonából készített gyermekétel elfogyasztása váltott ki, érzékenyítő allergének voltak a CM 13 és CM 16 búza  $\alpha$ -amiláz inhibitorok.

Az allergén fehérjék azonosítására és jellemzésére a klasszikus proteomikai utat követtük, ami kétdimenziós elektroforézissel való elválasztásukat, az IgE-kötés Western blottal való meghatározását, a kiválasztott és gélből kivágott fehérjefoltok tripszines emésztését, tömegspektrometriás analízisét és adatbázisból való visszakeresését jelentette. A tömegspektrométer fehérjekémiába való bevezetése óta ez a legmegbízhatóbb fehérjeazonosító módszer. Az IgE-kötő képesség alapján való kiválasztáskor figyelembe kell venni az egyes betegek közötti különbséget. Sander et al. (2001) pékasztmában szenvedő 10 páciens szérumaival víz- és sóoldható búzafehérjék kétdimenziós fehérjetérképeire kapott IgE-mintázatait hasonlították össze. Nagyszámú IgE-kötő fehérjét, ezen belül 4 búzafehérjét detektáltak, köztük két inhibitor: a dimer  $\alpha$ -amiláz inhibitor és a szerpint (*Triticum aestivum* szerin proteáz inhibitor). Az IgE immunblottok rendkívüli heterogenitást mutattak: mindegyik páciens egyéni érzékenységi mintázattal rendelkezett, 5- 50 közötti számú allergén fehérjefolttal. Ilyen mértékű eltérést, amelynek oka ismeretlen, az immunreaktív fehérjék 2D-mintázatában más szerzők eddig még nem figyeltek meg. Lehetséges magyarázatként Sander et al., (2001) az esetleges extrém nagy inhalációs, expozíciós szinteket tekintik, amikor nagy allergén potenciállal nem rendelkező fehérjék is allergénné válhatnak.

Az allergén jelleg meghatározása, előrejelzése új élelmiszerek esetében, továbbá peptid markerek kimutatása és előállítása döntően a kétdimenziós elektroforézis alkalmazására épül, ezért a közülünk eltávozott Dr. Hajós Gyöngyi témavezető, és a laboratóriumból eltávozott 2 fiatal Ph.D-hallgató nélkül, akik a 2D-elektroforézis gyakorlati kivitelezésében megfelelő jártassággal rendelkeztek, a kutatás ebbe az irányba nem volt továbbvihető. A továbblépést a marker peptid kifejezés közelebbi értelmezése tette lehetővé. Az eredeti megfogalmazás szerint 12-14 aminosavból álló peptidek, lineáris epitóppal esetében, már jó markerek lehetnek az allergia előrejelzésében. Sefcheck et al.,(2004) és (2006), a mogyoró fő allergén fehérjéjének, az Ara h 1-nek élelmiszerben való mérésére kvantitatív módszert dolgoztak ki, ami tömegspektrometriás módszerekkel való peptid markerek kiválasztásán alapult. A marker peptidek a tripszines emésztéssel kapott peptidekből a jelintenzitás, a retenció idő pozíció és a téves hasítások minimuma alapján kiválasztott peptidek, és átfedést mutatnak az ismert, immunológiailag aktív epitóppal. A módszer, amely a szerzők szerint más élelmiszer mátrixokra is könnyen adaptálható, két lényeges lépésből áll: a célfehérje dúsításából, tisztításából és az azt követő LC-MS analitikából.

Az eredmények részben bemutatott, és nagyszámú korábbi eredmény is a búza albuminok és globulinok vizsgálatára irányult, és detektált allergéneket az  $\alpha$ -amiláz inhibitor család molekulatömeg- és izoelektromos pont tartományában. Ez az inhibitor család nagyszámú publikáció szerint a pékasztma elnevezésű foglalkozási allergia kialakulásában játszik döntő szerepet, ezért a víz- és só-oldható fehérjék közé tartozó inhibitor család szelektív dúsítását követő tömegspektrometriás módszer lehetőséget ad ezeknek az allergéneknek a detektálására (meghatározására). A kutatómunka továbbvitelét ebbe az irányba Gomez et al.(1989) munkája a búza tetramer  $\alpha$ -amiláz inhibitorok gélkromatográfiás elválasztásáról, Weiss et al. (1993) munkája a víz- és sóoldható fehérjék között kétdimenziós elektroforézissel detektált allergén fehérjékről és két, általunk kidolgozott búzafehérje elválasztási módszer tették lehetővé.

## Célkitűzés

Gabonafehérjék allergén jellegének meghatározása, előrejelzése elsősorban új élelmiszerek esetében, peptid markerek kimutatása és azonosítása.

## Eredmények ismertetése

A gabonafehérjék allergén jellegének meghatározása kétdimenziós elektroforézis, immunblot és tömegspektrometriás módszerek alkalmazásával történt a pályázat első két évében. A gélmentes, oldatban lévő fehérjék preparatív izoelektromos elválasztására alkalmas Rotofor készülékkel módszerfejlesztést végeztek (Gergely et al., 2004).

Hősoknak kitett abiotikus stressz toleráns és abiotikus stressz érzékeny árpafajták proteomikai vizsgálatára kétdimenziós elektroforézist és nagy teljesítményű tömegspektrometriás technikákat alkalmaztak. Az S-adenozilmetionin szintáz mennyiségének növekedését mutatták ki a stressz toleráns árpafajtában, valamint a kis hőszokk fehérjék (16,9 kDa, 17,8 kDa) mennyiségének növekedését mindkét árpafajtában (Süle et al. (2004).

Különböző búzafajták lisztjeiből kioldott víz- és sóoldható fehérjéket (albuminok és globulinok) kétdimenziós elektroforézissel választották el és immunológiai detektálás és peptid térkép alapján PR (pathogenesis related) fehérjeként egy kitináz, egy inhibitor fehérjét és egy hőszokk fehérjét azonosítottak. Mindhárom fehérje IgE-keresztreaktivitást mutatott gabonaallergiás betegek szérumaival, ami megerősíti azt az állítást, hogy az élelmiszer allergének szerkezete hasonlít, vagy megegyezik a PR fehérjékével (Hajós et al. 2004).

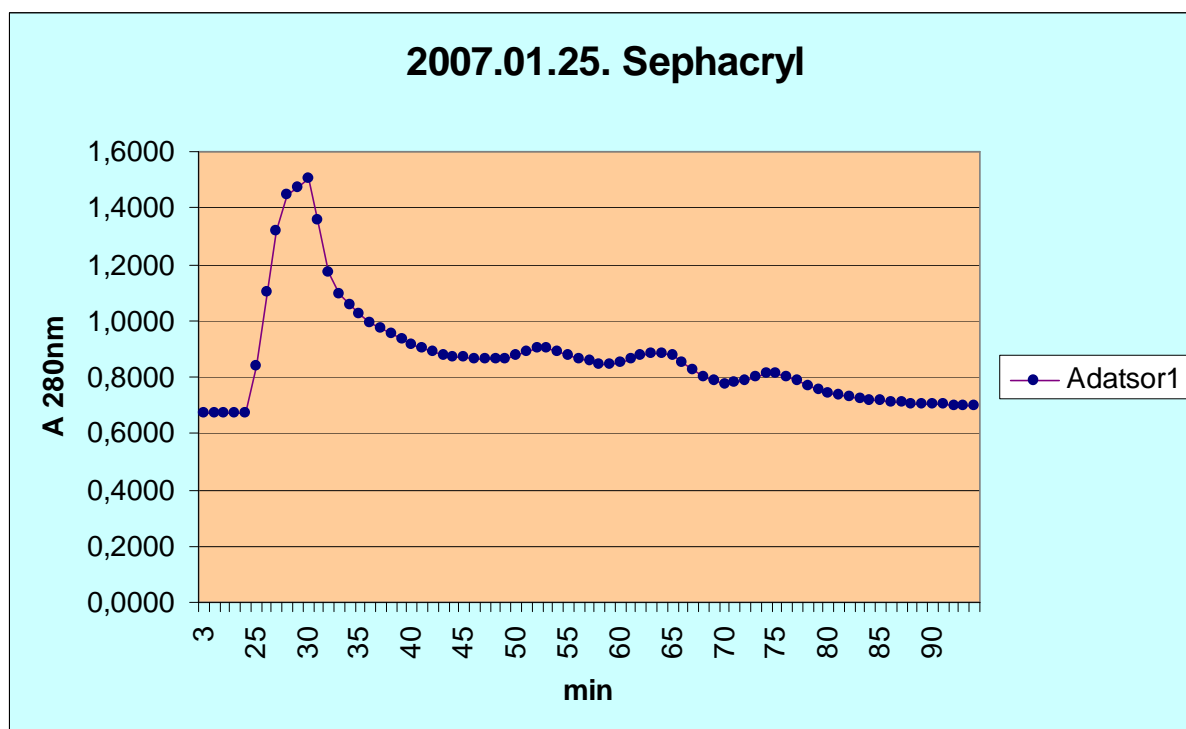
Szárazság stressznek kitett szélessávú herbiciddel szemben rezisztens transzgen és szülői búzavonalak fehérje expresszióját tanulmányozták proteomikai módszerekkel. A stressz legnagyobb mértékben a kis molekulatömegű, feltehetően stressz indukált fehérjék szintézisét befolyásolta. A búza víz- és sóoldható frakciója számos védő és stresszel összefüggésbe hozható fehérjét tartalmaz, amelyek közül inhibitor és inhibitor prekursor fehérjéket (13 db) azonosítottunk. A transzgen búzavonalakban dominált az alfa-amiláz/tripszin inhibitor CM1 prekursor, alfa-amiláz inhibitor, endogén alfa-amiláz/szubtilizin inhibitor (WASI), és a 27 K fehérje (Horváth-Szancics et al. (2006).

A pályázat utolsó évében, Dr. Hajós Gyöngyi eltávoztása után, a kétdimenziós elektroforézist a proteomika szintjén megvalósítani képes (elmélet, gyakorlat, kiértékelés, adatbázis kezelés) két fiatal munkatárs közül az egyik kilépett, a másik nem dolgozhatott akrilammal. A proteomikai megközelítés hiányában és a rendelkezésre álló feltételrendszer ismeretében a peptid markerekre alapozott analitika egy adott megvalósítása elérhető célnak tűnt. Ebben a lineáris epitóppal rendelkező allergént markerező rövid szekvencia helyett a Shefcheck et al. (2006) által az élelmiszer allergének jelenlétének detektálására alkalmas, tömegspektrometriás módszerekkel kiválasztott, adott esetben a lineáris epitóp egy részét tartalmazó szekvenciából állítják elő a marker peptidet. Fenti szerzők a mogyoró egyik fő allergén fehérjéjét (Ara h 1) azonosították az általuk fejlesztett módszerrel, amely szerintük más élelmiszer-mátrixokra is alkalmazható.

Élelmiszer allergén búzafehérjék detektálására Lim et al. (1998) dolgoztak ki automatikus áramlási immunanalitikai eljárást, mivel a búzaliszt allergének pontos azonosítása és jellemzése előfeltétel az új diagnosztikai és terápiás koncepciók fejlesztéséhez, valamint az allergénmentes búzaliszt használatához a klinikai gyakorlatban és az élelmiszeriparban. Búza allergének meghatározására azóta sem áll rendelkezésre egyszerű, vagy gyors módszer.

Az eddigi eredmények szinte kivétel nélkül a búza víz- és sóoldható fehérjei között, a kis molekulatömegű alfa-amiláz/proteáz inhibitor tartományban határozzák meg az allergéneket és más szerzők viszonylag nagyszámú publikációja alapján ide hozzávetőleg 70 IgE-kötő fehérje tartozik, amelyeket pék asztmában szenvedő betegek szérumaival detektáltak (több adat szerint az alfa-amiláz inhibitorok nem csak inhalatív, hanem táplálkozási allergének is). Ezek közül már sokat azonosítottak és szekvenciájuk ismert, illetve adatbankból visszakereshető, tehát ha a víz- és sóoldható fehérjékből valamilyen szelektív és reprodukálható módszerrel dúsítani lehet a kis molekulatömegű inhibitorokat, akkor LC-MS technikával a búza allergén fehérjéiként detektálhatók.

A búza alfa-amiláz/tripszin inhibitorait Gomez et al. (1989) Sephadex G-100 töltetű oszlopon választották szét. A víz- és sóoldható fehérjéket 150 mM NaCl-dal extrahálták, és a szupernatánsból 50 % relatív telítésű ammónium-szulfáttal kicsapott fehérjéket ammónium-acetát oldatban oldották, majd a géllal töltött oszlopra vitték. Ezt az eljárást adaptáltuk Sephadex G-75 töltetű oszlopra (3 fehérjefrakció), illetve Sephacryl 200 (Pharmacia) géllal töltött oszlopra (4 fehérjefrakció, 1. ábra).



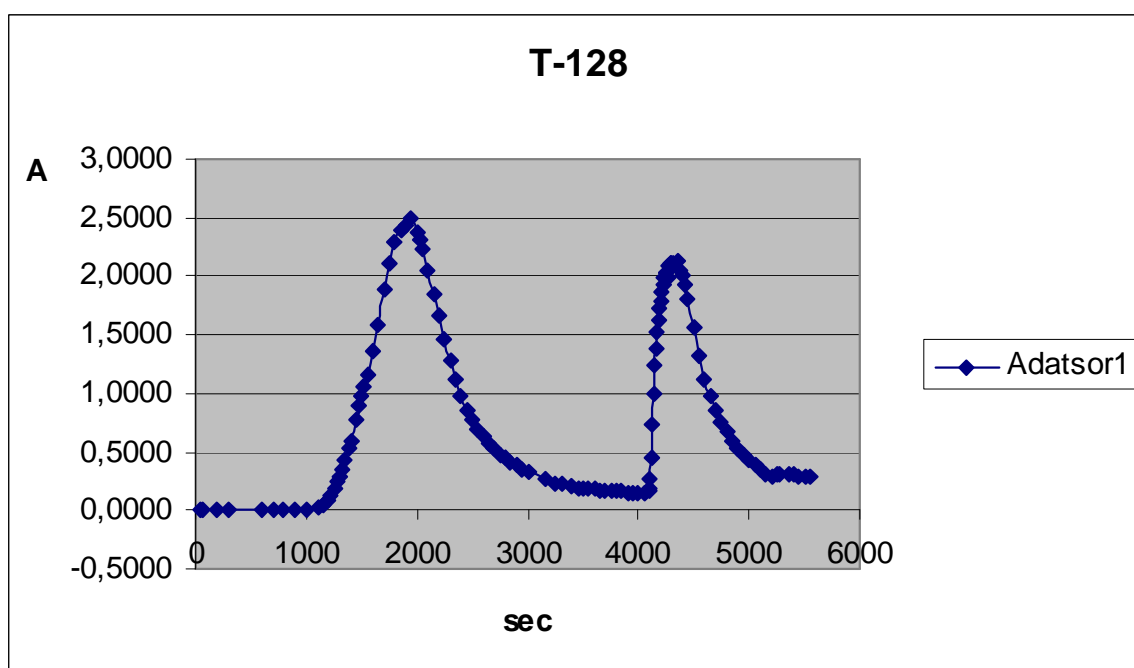
1. ábra

Búzaliszt ('CY-45') inhibitor fehérjeinek elválasztása gélszűréssel Sephacryl 200 oszlopon

A mennyiségi, a töltet, az oszlopméret és az áramlási sebesség különbségeket figyelembe véve a kromatogram nagyon jó fedésben van a hivatkozásban megadottal. Mivel a megengedett maximális áramlási sebességgel dolgoztunk, a fehérjecsúcsok laposak, nagyobb R eléréséhez szükséges kis sebesség viszont 6-8-szorosára növeli az elválasztás időigényét. Több ilyen elválasztás eredményeként megállapítottuk, hogy az elválasztás időigénye, a frakciók nem eléggé éles elválaszthatósága, és a fehérjék kis koncentrációja miatt a gélszűréssel való tisztítás az inhibitorok dúsítása szempontjából nem tartozik a gyors, pontos és reprodukálhatóan végrehajtható lépések közé.

Ezen kívül még több tényező is meghatározza, kromatográfiától függetlenül, a lisztből kioldott fehérjék mennyiségét, minőségét és analizálhatóságát, amelyek között az extraháló oldat összetételének is elsődleges jelentősége van. Weiss et al.(1993) különböző egy- és kétdimenziós elektroforetikus technikákkal tanulmányozták a pékasztmában szerepet játszó, IgE –kötő búza albuminokat és globulinokat, és a klasszikus Osborne frakcionálásban alkalmazott NaCl oldat helyett az elektroforézissel kompatibilisebb 50 mM Trisz- HCl pH (8,8) oldattal extrahálták a víz- és sóoldható fehérjéket. Azt találták, hogy az albuminok/globulinok többé-kevésbé egyenletesen töltik ki a kétdimenziós gél pI (pH 4,5 – 8,0) és molekulatömeg (15000-100000 Da) tartományát.

A kétdimenziós fehérjetérképen a kis molekulatömegű inhibitor fehérjék pozíciói, továbbá a bázisos pH-jú extraháló puffer alkalmazása lehetővé teszi egy olyan anioncserélő kromatográfiás módszer kidolgozását, amellyel az inhibitorok részleges tisztítása érhető el. Ezt oly módon bizonyítottuk, hogy 50 mM Trisz-HCl pH (8,5) pufferrel kioldott víz- és sóoldható fehérjéket DEAE-cellulózzal töltött oszlopon frakcionáltunk.

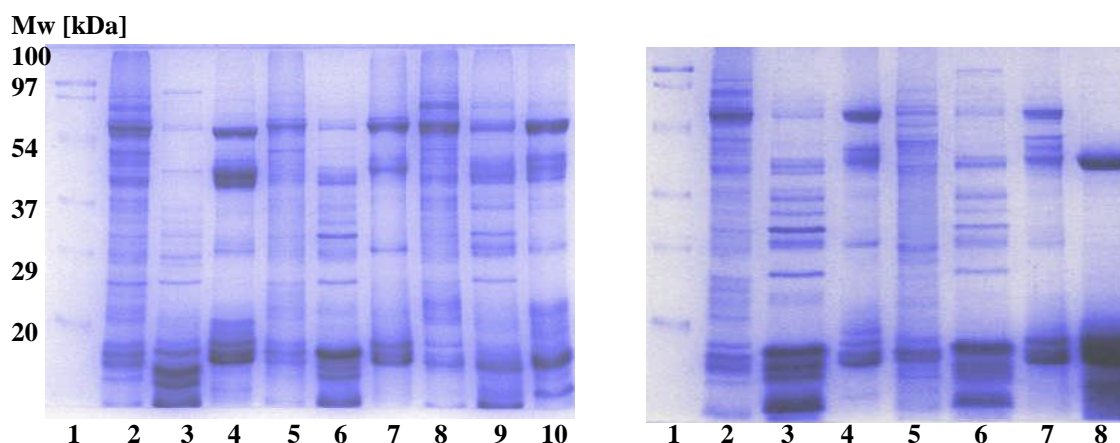


2. ábra

Búzaliszt (T-128) víz- és sóoldható fehérjéinek kromatográfiája DEAE-cellulózon

A kromatogramon látható első csúcs a start pufferrel (50 mM Trisz-HCl (pH 8,5)) kioldott és az ioncserélő cellulózon nem kötődött frakciót reprezentálja, míg a második csúcs az oszlopról 0,15 M NaCl-ot tartalmazó start pufferrel eluálódott fehérjéket reprezentál. Ezt az eljárást nagyszámú búza mintára alkalmaztuk, és minden esetben azt találtuk, hogy a NaCl-oldattal eluálódott második csúcsban található fehérjék alfa-amiláz inhibitor aktivitása meghaladja a DEAE-cellulózhoz nem kötődött fehérjék aktivitását. Az alfa-amiláz inhibitor aktivitást Murao et al. (1981) módszerével mértük (1. táblázat).

Az inhibitor aktivitáson kívül a frakciók allergén aktivitását antigén specifikus ellenanyaggal és búzaliszt allergia klinikai gyanújával igazolt humán szérumokkal, immunblot technikával vizsgáltuk. Az immunizáláshoz szükséges antigén kereskedelmi forgalomban vásárolt, búza eredetű alfa-amiláz inhibitorból (Nutricepts, USA) DEAE-kromatográfiával tisztított inhibitor frakció (2. csúcs, TrimW-2) volt, mért inhibitor aktivitása 92 %.



3. ábra

Különböző búzafajták víz- és sóoldható fehérjéinek elválasztása SDS-elektroforézissel

1. Mw
2. *T. aestivum*, GK Tisza, 2004 - extrakt
3. *T. aestivum*, GK Tisza, 2004 - 1. frakció
4. *T. aestivum*, GK Tisza, 2004 - 2. frakció
5. *T. spelta*, ÖKO-10, 2004 - extrakt
6. *T. spelta*, ÖKO-10, 2004 -1. frakció
7. *T. spelta*, ÖKO-10, 2004 - 2. frakció
8. *T. durum*, D-78, 2004 - extrakt
9. *T. durum*, D-78, 2004 -1. frakció
10. *T. durum*, D-78, 2004 -2. frakció

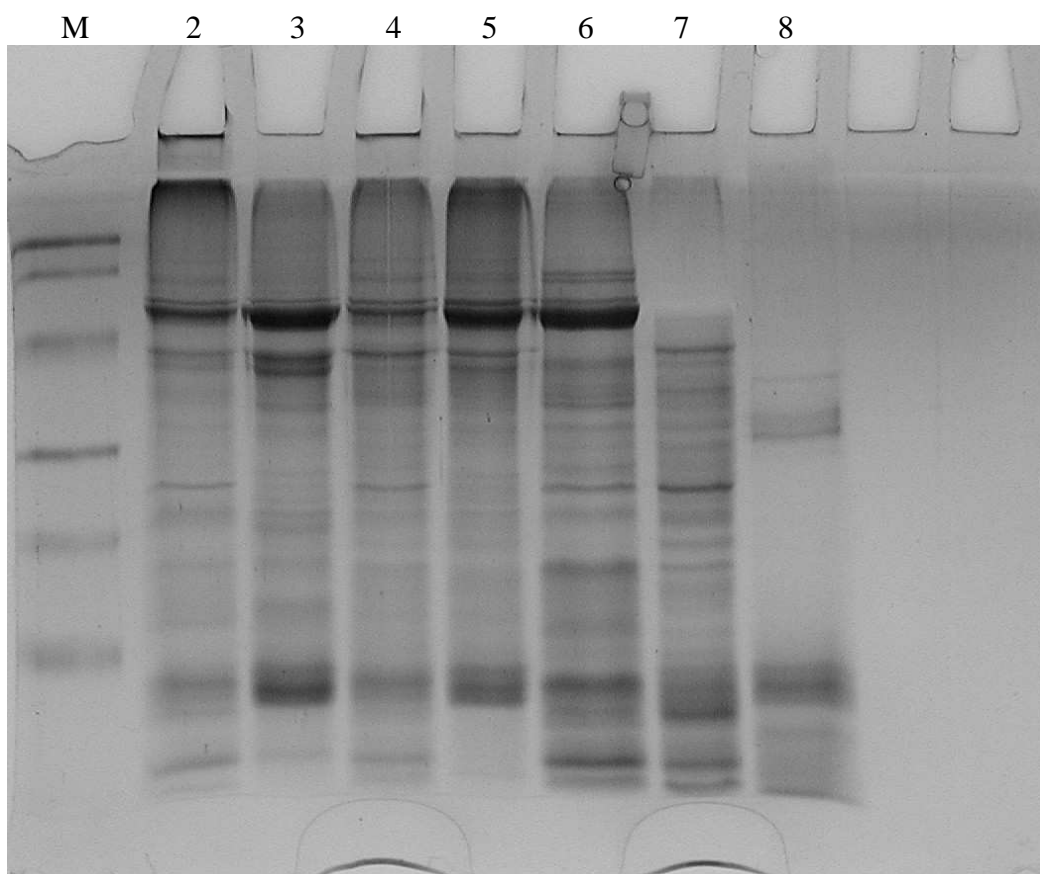
1. Mw
2. *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 - extrakt
3. *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 - 1. frakció
4. *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 - 2. frakció
5. *T. aestivum*, CY-45 Grandstar, 2001- extrakt
6. *T. aestivum*, CY-45 Grandstar, 2001- 1. frakció
7. *T. aestivum*, CY-45 Grandstar, 2001- 2. frakció
8. TrimW-2. frakció

A 3. ábrán jól követhető, hogy a kiindulási fehérjekivonathoz képest az 1. és 2. frakció kis molekulatömegű fehérjefrakciói egyaránt dúsultak (de molekulatömegeik eltérők), és az 1. táblázatban feltüntetett, Murao et al.(1981) módszerével mért inhibitor aktivitás adatok szerint a 0,15 M NaCl-t tartalmazó pufferrel eluált 2. frakciók enzim gátló hatása (a tisztított kereskedelmi készítmény mellett) a legnagyobb. Három különböző humán szérummal reagáltatva a gélről blottolt fehérjéket két fő immunreaktív, 16 kDa és 47 kDa molekulatömegű sávot detektáltunk a TrimW-2 frakcióban, és minden búzafajta víz- és sóoldható frakciója tartalmazott 16 kDa, 45 kDa és 63 kDa IgE-reaktív epitópot.

Bár a DEAE-cellulóz kromatográfiával tisztított inhibitor frakció jóval kevesebb fehérjét tartalmaz, mint a kiindulási extrakt és a folyamat időigénye elfogadható, – a víz- és sóoldható fehérjék kioldása 80 perc, ioncserélő kromatográfia 90 perc – az időigény redukálása céljából egy fehérjetisztításra ritkán alkalmazott szervesen adszorbenst is kipróbáltunk. A cink-hidroxid nagy fehérjekötő képességgel rendelkezik, aminek mechanizmusa kevésbé ismert, mint például a kisózásé. A rendelkezésre álló régi hivatkozások figyelembevételével cink-hidroxid csapadékot állítottunk elő, majd adott arányban a pufferrel készített búzafehérje kivonathoz adtuk, 10 percig 4°C-on kevertettük, utána 20 percen át állni hagytuk, és centrifugálás után mértük az alfa-amiláz inhibitor aktivitását (1. táblázat), illetve SDS-elektroforézissel vizsgáltuk fehérje összetételét (4. ábra). Jól látható, hogy az anioncserélő cellulózon megkötődött kis molekulatömegű fehérjék, illetve a cinkhidroxid csapadékhoz nem kötődött fehérjék inhibitor aktivitása nagy, tehát ezek zömmel allergén fehérjék.

1. Táblázat. Víz- és sóoldható fehérjék alfa-amiláz inhibitor aktivitása.

Fehérjefrakció	Inhibitor aktivitás %
Tisza búza extrakt	27
Bánkúti búza 1. frakció	11
Bánkúti búza 2. frakció	37
Alfa-amiláz inhibitor (Nutricepts)	83
1. frakció (Nutricepts)	73
2. frakció (TrimW-2, Nutricepts)	92
Tisza búza, Zn(OH) <sub>2</sub> frakció II.	86



4 ábra

Víz- és sóoldható fehérjefrakciók SDS-elektroforézise  
(M- fehérjemarkerek, 97, 66, 45, 30, 20,1, 14,4 kDa ; 2. sáv – Bánkúti extrakt,  
3. sáv – Bánkúti frakció 2, 4. sáv – Tisza extrakt, 5. sáv – Tisza extrakt 2.  
6. sáv – Cink-hidroxiddal kezelt Tisza extrakt I.  
7. sáv – Cink-hidroxiddal kezelt Tisza extrakt II.

A 4. ábrán jól követhető a cinkhidroxidos kezelés víz- és sóoldható fehérjékre gyakorolt hatása, ami a kifejlesztett módszerek közül a leggyorsabban és legteljesebben választja el a kis molekulatömegű inhibitor fehérjéket a többi albumintól és globulintól, más szóval az allergén célfehérje csoportot lényegében percek alatt elkülöníti a többi fehérjétől. Az allergén alfa-amiláz inhibitorok elválasztásának hatása a többi albumintól és globulintól a tömegspektrometriás eredményekben is megjelenik, amint azt a 2. táblázat adatai tükrözik.

2. Táblázat Tisza búza fehérjekivonatban és cink-hidroxid adszorbenssel kezelt fehérjekivonatban LC-MS/MS eljárással azonosított fehérjék

Fehérje neve	Peptidszám/lefedettség	Mw/pI	Species	Azonosító szám
LTP prekursor	5/53	11898/8,5	<i>T. aestivum</i>	P24296
LTP2P	5/91	7046/8,2	<i>T. aestivum</i>	P82901
$\alpha$ -amiláz inhibitor 0,28 prekursor	4/28	16799/7,45	<i>T. aestivum</i>	P01083
$\alpha$ -amiláz/tripszin inhibitor 0.19	5/54	13337/6,65	<i>T. aestivum</i>	P01085
$\alpha$ -amiláz/tripszin inhibitor CM 16 prekursor	4/34	15782/5,3	<i>T. aestivum</i>	P16159
Alfa-amiláz/tripszin inhibitor CM 3 prekursor	5/43	18221/7,4	<i>T. aestivum</i>	P17314
LTP2G	3/59	6979/8,2	<i>T. aestivum</i>	P82900
<b>Cink-hidroxiddal kezelt kivonat</b>				
$\alpha$ -amiláz inhibitor 0,28 prekursor	7/49	16799/7,45	<i>T. aestivum</i>	P01083
LTP2P	5/91	7046/8,2	<i>T. aestivum</i>	P82901
LTP prekursor	4/49	11898/8,5	<i>T. aestivum</i>	P24296
Em fehérje	4/40	9962/5,55	<i>T. aestivum</i>	P04568
Wheatwin-2 prekursor	2/22	15867/8,2	<i>T. aestivum</i>	O64393
Type 5 tionin	2/25	13747/4,4	<i>T. aestivum</i>	Q05806

A talált fehérjék molekulatömege 18 kDa-nál kisebb, és közülük az  $\alpha$ -amiláz inhibitorok és a lipid-transzfer fehérjék azonosított allergének. Ezekre a fehérjékre talált egyedi peptidok száma nagy és a velük elért lefedettség következtében nagy valószínűséggel tartalmazzák az epitop átfedő szekvenciáit, ami lehetővé teszi a peptid marker technika alkalmazását a kis molekulatömegű víz- és sóoldható inhibitorfehérjék meghatározására. A multiple reaction monitoring (MRM) üzemmódban működtetett spektrométerrel egy szülői ion fragmentből származó marker peptid (lány ion) kvantitatív mérése is megvalósítható.



## Irodalom

- Baur X., Posch A., Characterized allergens causing bakers` asthma. *Allergy*, *53*, 562/566, (1998).
- Besler M., Trends in Analytical Chemistry, Determination of allergens in foods. *20*, 662-672, (2001)
- Gergely V., Kápolna E., Süle A., Hajós Gy., Dernovics M., Fodor P., Preparative liquid isoelectric focusing (Rotofor IEF) based Se-speciation of Se-enriched *Agaricus bisporus*, *J. Anal. At. Spectrom.*, *19*, 1485-1488, (2004).
- Gomez L., Sanchez-Monge R., Garcia-Olmedo F., Salcedo G., Wheat tetrameric inhibitors of insect  $\alpha$ -amylases: allopoloid heterosis at the molecular level, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *86*, 3242-3246.
- Hajós Gy., Szabó E., Janáky T., Two-dimensional Electrophoresis, MALDI-TOF MS and blotting for identification and characterization of pathogenesis-related proteins in wheat cultivar, *Chromatografia Supplement*, *60*, S257-S259, (2004).
- Horváth-Szancics E., Szabó Z., Janáky T., Pauk J., Hajós Gy., Proteomics as an emergent tool for identification of stress-induced proteins in control and genetically modified wheat lines, *Chromatographia Supplement*, *63*, S143-S147, (2006).
- James J., Sixbey J., Helm R., Bannon G., Burks W., Wheat  $\alpha$ -amylase inhibitor: a second route of allergic sensitization, *J Allergy Clin Immunol*, *99*, 239-244 (1997)
- Lim T., Nakamura N., Matsunaga T., Automated flow immunoassay for detection of food allergen using anion-exchange resin and alkaline phosphatase conjugated immunoglobulin G *Analytica Chimica Acta*, *370*, 207-214, (1998).
- Murao S., Goto A., Matsui Y., Ohyama K., Arai M., Isolation and identification of a hog pancreatic  $\alpha$ -amylase inhibitor (Haim) producing *Streptomyces*, *Agric. Biol. Chem.*, *45*, 2599-2604, (1981)
- Posch A., Weiss W., Wheeler C., Dunn MJ, Gorg A., Sequence analysis of wheat grain allergens separated by two/dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, *16*, 1115-1119, (1995)
- Sander I., Flagge A., Merget R., Halder T., Meyer H., Baur X., Identification of wheat flour allergens by means of 2-dimensional immunoblotting, *J Allergy Clin Immunol*, *107*, 907-913 (2001).
- Sandiford CP., Tee RP, Newman-Taylor AJ., Identification of cross reacting wheat, rye, barley and soya flour allergens using sera from individuals with wheat induced asthma. *Clin Exp Allergy*, *25*, 340-349, (1995)
- Shefchek K., Callahan J., Musser S., Confirmation of peanut proteins using peptide markers in dark chocolate using liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 7953-7959 (2006).
- Süle A., Vanrobaeys, Hajós Gy., Van Beeumen J., Devreese B., Proteomic analysis of small heat shock protein isoforms in barley shoots, *Phytochemistry*, *65*, 1853-1863 (2004).
- Varjonen E., Vainio E., Klimo K, Juntunen-Backman K., Savolainen J., Skin/prick test and RAST responses to cereals in children with atopic dermatitis. Characterization of IgE-binding components in wheat and oats by an immunoblotting method. *Clin Exp Allergy* *25*, 1100-1107 (1995)
- Weichel M., Glaser A., Ballmer-Weber B., Schmid-Grendelmeier P., Cramer R., Wheat and maize thioredoxins: A novel cross reactive cereal allergen family related to bakers asthma, *Allergy Clin Immunol*, *117*, 676-681 (2006)

Weiss W., Vogelmeier C, Görg A., Electrophoretic characterization of wheat grain allergens from different cultivars involved in bakers' asthma, *Electrophoresis*, *14*, 805-815 (1993)

Zapatero L., Martínez M., Alonso E., Salcedo G., Sánchez-Monge R., Barber D., Lombardero M., Oral wheat flour anaphylaxis related to wheat  $\alpha$ -amylase inhibitor subunits CM3 and CM16, *Allergy*, *58*, 956 (2003).