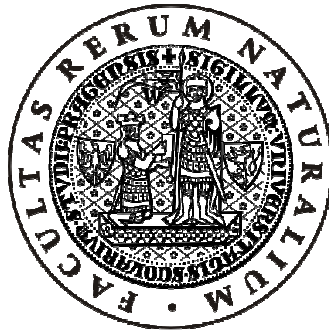


CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE

Faculty of Science

Study program: Immunology



Summary of dissertation

Food allergy to wheat flour proteins

RNDr. Petr Šotkovský

Prague, 2012

Doctoral studies in biomedicine
*Charles University in Prague and
Academy of Sciences of the Czech Republic*

Field: Immunology

Chairmann of

the Supervisory Committee: Doc. RNDr. Vladimír Holáň, DrSc.

Supervising Body: Department of Immunology and Gnotobiology

Institute of Microbiology

Vídeňská 1083, 14220, Prague 4 Krč

Author: RNDr. Petr Šotkovský

Supervisor: Doc. RNDr. Ludmila Tučková, DrSc.

The dissertation is available at the library of Faculty of Science at the Charles University in Prague.

TABLE OF CONTENTS:

ABBREVIATIONS	4
THESIS SUMMARY	6
SOURHN V ČEŠTINĚ	7
1. INTRODUCTION	8
2. HYPOTHESIS AND AIMS	10
3. MATERIAL AND METHODS.....	11
3.1. Patients and controls	11
3.2. Measurements of total and specific serum IgE.....	11
3.3. Wheat sample preparation.....	11
3.4. Liquid-phase isoelectric focusing.....	12
3.5. High-performance liquid chromatography	12
3.6. SDS-PAGE and immunoblotting.....	12
3.7. 2-DE.....	13
3.8. Basophil activation test	13
3.9. Mass spectrometry analysis	13
3.10. ELISA	14
4. RESULTS	14
4.1. Identification of wheat flour proteins recognized by IgE Abs of allergic patients...	14
4.2. Isolation and purification of wheat flour allergens	16
4.3. Mouse model of food allergy	17
5. DISCUSSION	19
6. CONCLUSIONS	22
7. REFERENCES	23
8. PUBLICATIONS	25

ABBREVIATIONS

1-DE	one-dimensional electrophoresis
2-DE	two-dimensional electrophoresis
Abs	antibodies
BSA	bovine serum albumin
CD	cluster of differentiation
CM	chloroform methanol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	endoplasmic reticulum
HPLC	high performance liquid chromatography
IEF	isoelectric focusing
IFN	interferon
IgE	immunoglobulin class E
IL	interleukin
LC	liquid chromatography
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionization
MHC	major histocompatibility complex
MLN	mesenteric lymph nodes
MMCP-1	mouse mast cell protease-1
MS	mass spectrometry
OVA	ovalbumin
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
Q	quadrupole
ROC	receiver operating characteristic

SDS	sodium dodecyl sulphate
sIgE	specific IgE
tTG	tissue transglutaminase
TGF	transforming growth factor
TLP	thaumatin-like protein
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
TOF	time of flight
WDEIA	wheat-dependent exercise induced anaphylaxis
XIP	xylanase inhibitor protein

THESIS SUMMARY

Food allergy is one of the frequent disorders and its incidence in paediatric as well as adult population is continuously rising, having doubled in the last two decades. Although wheat belongs to major food allergens and is a staple food in most diets, we have only little knowledge of wheat proteins causing IgE mediated hypersensitivity reaction. Diagnostic approaches of food allergy to wheat have a high sensitivity, but low specificity. Poor predictability and specificity may be associated with the insufficient purity of wheat extracts used in specific IgE assays or with the lack of major allergens in these extracts.

In the first step, we characterized 19 potential allergens recognised by IgE Abs of allergic patients, using proteomic techniques (1-DE, 2-DE, MALDI-TOF, QTOF and LCQ^{DECA} nLC-MS/MS ion trap technique). We identified these IgE-binding molecules such as: α -amylase inhibitors, β -amylase, profilin, serpin, β -D-glucan exohydrolase and 27K protein. To quantify sIgE in patient's sera we developed ELISA using the whole wheat extract and two commercially available α -amylase inhibitors.

Second, we developed a procedure that allows isolation of wheat allergens from natural sources using Rotofor cell and HPLC. Twenty-seven potential wheat allergens have been successfully identified; of these, the following seven are newly reported in food allergy: endogenous α -amylase/subtilisin inhibitor, trypsin/ α -amylase inhibitor CMX1/CMX3, TLP, XIP, β -glucosidase, class II chitinase and 26 kDa endochitinase. The biological activity of purified allergens was tested using the basophil activation test. We have shown for the first time that purified allergens, such as α -amylase inhibitor 0.19, lipid transfer protein, TLP and wheatwin, can activate patients' basophils, confirming that our purified proteins maintain their biological activity.

Third, we investigated how thermal processing influences the ability of OVA to induce allergic symptoms and immune responses in mouse model of food allergy.

The aim of our studies is to identify the most important wheat allergens in IgE mediated hypersensitivity reaction. We developed new procedures of identification and isolation of allergens in their native form in amounts sufficient both for biological testing (*in vivo* and *in vitro*) and for physicochemical characterization. Such studies will lead to a more detailed knowledge of allergenicity of wheat proteins and to improved specificity of diagnostic tests.

SOUHRN V ČEŠTINĚ

Potravinová alergie je jedním z nejčastějších onemocnění a postihuje jak dětskou, tak dospělou populaci. Její výskyt neustále roste, v posledních dvaceti letech se zdvojnásobil. Ačkoliv pšenice patří mezi hlavní potravinové alergeny a je základní složkou většiny jídel, naše znalosti pšeničných proteinů způsobujících IgE hypersenzitivní reakci je nedostatečná. Diagnostika potravinové alergie na pšenici se vyznačuje vysokou sensitivitou, ale nízkou specificitou. Ta může být spojena s nedostatečnou čistotou používaných extraktů anebo absencí hlavních alergenů v těchto extraktech.

V prvním kroku jsme charakterizovali 19 potenciálních alergenů rozpoznávaných IgE protilátkami ze sér pacientů. Díky proteomickým metodám (1-DE, 2-DE, MALDI-TOF, QTOF a LCQ^{DECA} nLC-MS/MS iontová past) jsme identifikovali např. tyto IgE vázající molekuly: inhibitory α -amylázy, β -amyláza, profilin, serpin, β -D-glukan exohydroláza a 27K protein. Pro kvantifikaci IgE protilátek jsme vyvinuli metodu ELISA, ve které byl použit jak pšeničný extrakt, tak komerčně dostupné inhibitory α -amylázy.

V dalším kroku jsme vyvinuli metodu postupné izolace pšeničných alergenů z přírodních zdrojů, která využívá zařízení Rotofor a HPLC. Tímto přístupem bylo identifikováno 27 potenciálních alergenů, z nichž 7 bylo nově popsáno u potravinové alergie: endogenní inhibitor α -amylázy, inhibitor α -amylázy CMX1/CMX3, TLP, XIP, β -glucosidáza, chitináza třídy II a 26 kDa endochitináza. Pro testování biologické aktivity purifikovaných alergenů byl použit test aktivace bazofilů. Jako první jsme ukázali, že purifikované alergeny jako inhibitor α -amylázy 0.19, lipid transfer protein, TLP a wheatwin aktivují pacientské bazofily. Tímto se potvrdilo, že naše purifikované proteiny si zachovávají svou biologickou aktivitu.

Na myším modelu jsme také zkoumali vliv tepelného opracování vaječného ovalbuminu na jeho schopnost vyvolat odpověď imunitního systému.

Hlavním přínosem těchto prací je identifikace nejdůležitějších pšeničných alergenů schopných vyvolat IgE hypersenzitivní reakci. Vyvinuli jsme nové metody pro identifikaci a izolaci alergenů v jejich přírodní formě a to v množství, které je dostatečné jak pro biologické testy (*in vivo*, *in vitro*), tak pro fyzikálně-chemickou charakterizaci. Tato studie povede ke zpřesnění znalostí o alergenicitě pšeničných alergenů a ke zlepšení specificity diagnostických testů.

1. INTRODUCTION

Food allergy is an important health problem affecting 6 to 8% of children and 2 to 3% of adults, and is increasing in prevalence [Poole et al., 2006; Ostblom et al., 2008; Zicari et al., 2012]. Under physiological conditions, immune system develops oral tolerance, a state of active inhibition of systemic response to the huge amount of antigens regularly ingested. Oral tolerance depends on an intact and immunologically active gastrointestinal mucosal barrier. Despite high acidity in the stomach and enzyme activity, around 2% of ingested food antigens still cross the gastrointestinal barrier and are transported throughout the body in a form that is immunologically intact enough to produce a food allergy [Sampson, 1999]. Food allergies may be classified in a) IgE-mediated, which are mediated by IgE antibodies and are the best-characterized food allergy reactions; b) cell mediated when the cell component of the immune system is responsible of the food allergy and mostly involve the gastrointestinal tract; c) mixed IgE mediated-cell mediated when both IgE and immune cells are involved in the reaction [Sampson, 2003; Cianferoni et al., 2009; Sicherer et al., 2009]. In general, the immunological mechanism in food allergies is IgE-mediated Type-I response characterized by high serum total IgE concentration and by the presence of IgE Abs specific to ordinarily harmless environmental antigens.

Wheat is the most widely consumed food grain in the world and belongs to six major food allergens (milk, egg, wheat, peanut, soya and fish) that account for over 80% of the reaction in food allergies [Ramesh, 2008]. Although cereals are essential in daily nutrition for the majority of people, only little information is available on wheat allergens causing hypersensitivity reactions. Wheat allergy is defined as an adverse immunologic reaction to wheat and may manifest as a classical food allergy to ingested wheat proteins including cutaneous, gastrointestinal, and respiratory symptoms; contact urticaria; and wheat-dependent exercise induced anaphylaxis (WDEIA) [Palosuo, 2003; Johansson et al., 2004; Sapone et al., 2012]. Diagnosis of food allergy to wheat is, however, not simple. The main available *in vivo* methods for the assessment of food allergens are double-blind placebo-controlled food challenge and skin prick tests. Although oral food challenge tests are considered to be the gold standard for the diagnosis, they are time consuming and can induce severe clinical symptoms. Skin prick tests are diagnostic for baker's asthma but not for atopic dermatitis [van Kampen et al., 2009]. In contrast, basophil activation tests are considered a reliable *in vitro* diagnostic technique [Tokuda et al., 2009]. *In vitro* detection of food-specific IgE Abs by

radioimmunoassays (RIAs) or enzymatic immunoassays (ELISA) were designed to detect and even quantify sIgE. Even though these immunological methods are highly sensitive they have low specificity, and a certain degree of cross-reactivity cannot be excluded [Sampson 2001; Tordesillas et al., 2009]. The poor predictability and specificity of all currently known diagnostic approaches may be associated with the purity of the wheat extracts used in the specific IgE assays or to their lack of inclusion of all major allergens. Advances in the field of molecular allergology led to the development of a new concept in allergy diagnosis, component-resolved diagnosis, allowing the identification of the potential disease-eliciting molecules.

Based on differential solubility, wheat proteins can be classified into water/salt-soluble albumins and globulins and water/salt-insoluble gliadins and glutenins. Since cereals are essential in daily nutrition, not all of the wheat allergens have been identified. However, in recent years proteomic analysis of wheat flour proteins revealed a number of IgE reactive components in both water/salt-soluble and insoluble fractions [Görg et al., 2004; Akagawa et al., 2007]. Among the major allergens identified in the water/salt-soluble fraction of wheat flour and capable of sensitization after both ingestion and inhalation are the cereal α -amylase inhibitors and α -amylase/trypsin inhibitors [Armentia A, 1993; James JM, 1997]. The another most important plant panallergens are non-specific lipid transfer proteins, which also act as food allergens, sensitizing individuals by the oral route or inhalation [Lauer et al., 2007; Palacin et al., 2007; Tordesillas et al., 2009]. Although proteomic analysis has identified other water/salt soluble wheat proteins binding to IgE, including β -amylase, thioredoxin and serpins, a proper panel of all purified wheat allergens has not yet been developed and the clinical relevance of these proteins remains to be determined [Pastorello et al., 2007; Tatham et al., 2008]. The information on identified allergens can be found at allergen databases, for example allergome (www.allergome.org).

As studies in allergic individuals are necessarily limited, animal models of food allergy have helped understand the underlying mechanisms of the disease, the potential for new therapeutic targets. In the light of these considerations there has been a growing interest in the design and development of appropriate animal models and their potential integration into safety assessment paradigms [Kimber I, 2003; Brunner et al., 2009; Pali-Scholl I et al., 2010; van der Ventel ML et al., 2011].

2. HYPOTHESIS AND AIMS

The general aim of this thesis was to identify and characterise the most frequently recognised wheat allergens and to analyse their allergenicity in an attempt to improve the understanding of hypersensitivity reactions and the diagnosis of wheat allergy.

Specific aims:

- to identify wheat flour allergens most frequently recognized by patients' IgE antibodies using proteomic techniques (1-DE, 2-DE, MALDI-TOF, QTOF and LCQ^{DECA} nLC-MS/MS ion trap technique)
- to developed a new procedure for isolation and purification of identified IgE-binding wheat allergens in their natural form in amounts that allowed subsequent structural and functional analyses as well as to find new potential allergens using ultrafiltration, isoelectric focusing (Rotofor), and liquid chromatography.
- to investigate the clinical relevance of the newly identified and purified allergens using *in vitro* specific IgE detection (ELISA, Immunoblot) in correlation with the results of skin prick test.
- to test the cellular response of patient's basophils against the extracted proteins and identified allergens in the basophil activation test.
- To analyse the effect of pepsin on the imunogenicity of the extracted wheat proteins to mimic the digestion of wheat containing food.
- to investigate how thermal processing influence ability of ovalbumin to induce allergic symptoms and immune responses in mouse model of food allergy.

3. MATERIAL AND METHODS

3.1. Patients and controls

Sera were obtained from patients with atopic dermatitis, all had a suspect history of wheat allergy and elevated specific IgE Abs (mean, 10.24 U/ mL; range, 0.4–72 U/mL). Food allergy was established by means of a positive skin prick test and specific IgE and/or positive basophil activation test. Skin prick tests were performed with commercial allergen extracts (Alyostal, Stallergenes, France). A positive response was defined as a wheal measuring 3 mm and more in diameter compared with a negative control. Sera from healthy individuals with normal total and wheat-specific IgE Abs were used as negative controls.

3.2. Measurements of total and specific serum IgE

The concentrations of total and wheat-specific IgE were determined by fluorescence enzyme immunoassay (UniCAP, Pharmacia, Sweden or Immulite 2000, DPC, Siemens Medical Solution Diagnosis) according to the manufacturer's instructions. Allergen-specific IgE concentrations above 0.35 kU/L were considered positive.

3.3. Wheat sample preparation

Wheat flour from seven most frequently used cultivars (*Triticum aestivum*): Sulamit, Nela, Alana, Ebi, Banquet, Mladka, Akteur, and cultivar Spalda (*Triticum spelta*) were kindly provided from the Czech University of Agriculture, Prague. Proteins were extracted from wheat flour (4 g) with PBS (40 mL) overnight at 4 °C, ultrasonicated for 15min on ice and centrifuged at 20 000 g for 15 min at 4 °C. Extracted proteins from cultivar Sulamit were also treated with pepsin bound to agarose gel (ICN, Biomedicals, OH). Extracted proteins from cultivar Akteur were sequentially separated using Amicon Ultra 100k, 30k and 10k ultrafiltration devices (Millipore, Billerica, MA, USA) in this order providing gross separation according to the molecular weight of the proteins. The concentrated higher molecular-weight fraction was discarded and the filtrate was ultrafiltered using a 30k filter device with a 30 kDa molecular-weight cut-off. The concentrate was stored (fraction I) and the filtrate was purified using a 10k filter device with a 10 kDa molecular weight cut-off, yielding fraction II (60 min, 2500 g and 20 °C). Protein concentration was determined using a Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (BCA, Pierce, IL, USA).

3.4. Liquid-phase isoelectric focusing

Proteins in fractions I and II were separated according to their pI using a Rotofor preparative cell (Bio-Rad). Proteins from fraction I (15 mL, containing 45 mg protein) were mixed with 0.5% CHAPS and diluted in 55 mL of distilled water containing 5% glycerol, 5% premixed Bio-Lyte pH 5–8, pH 3–10 (Bio-Rad) and ampholyte pH 4–6 (Fluka, Buchs, Switzerland). Proteins in fraction II were diluted similarly, except that premixed ampholytes pH 4–6 and pH 6–9 were used. Both samples were fractionated using a Rotofors device, equipped with a standard focusing chamber (60 mL total volume) with 20 fractionation compartments. A total of 20 fractions were collected, and the pH of each was measured using a microelectrode.

3.5. High-performance liquid chromatography

All 20 fractions were carried out using an HPLC system Gold 125NM solvent Module (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). The sample was centrifuged for 10 min at 12 000 g. The supernatant was applied (containing 2mg protein) to a polymeric reversed-phase PLRP-S 1000A, 8 µm, 250x406mm column (Varian, Palo Alto, CA, USA) and separated at a flow rate of 1mL/min using a linear gradient (solvent A, 0.1% TFA/H₂O; solvent B, 0.1% TFA/acetonitrile). The gradient program started with 95% of solvent A and 5% of solvent B, and changed 5–25% B/5 min, 25–45% B/50 min, 45–70% B/5 min and 70–95% B/0.5 min. The column was washed with 95% solvent B (10 min) and equilibrated at initial conditions for 10 min. Protein samples were evaporated using a vacuum centrifuge (SpeedVac, Jouan, Winchester, VA, USA) and dissolved in PBS.

3.6. SDS-PAGE and immunoblotting

Isolated wheat proteins were analysed by SDS-PAGE (in concentration 1 or 3 mg/mL) using 15% or 5-20% gradient gels under reducing conditions. Separated proteins were stained with Coomassies Brilliant Blue R-250 (CBB). Selected fractions were electrotransferred to nitrocellulose membranes (NC2, SERVA, Heidelberg, Germany) for 1 h at room temperature. The membranes were blocked with PBS containing 0.5% Tween 20 and incubated with serum samples diluted 1:10 in blocking buffer overnight at 4 °C. After washing with PBS–0.1% Tween 20, the strips were incubated with peroxidase- labelled sheep anti-human IgE Abs (1:1000; The Binding Site, Birmingham, UK) for 1 h at room temperature. Blots were developed using SuperSignalWest Pico Trial kits (Pierce) and

luminescence was detected on a Kodak Medical X-ray film (Kodak, Rochester, NY, USA). Data were digitized and subjected to image analysis (AIDA 3.28, Raytest, Straubenhardt, Germany).

3.7. 2-DE

Wheat proteins were precipitated and then solubilized in IEF buffer. Protein concentration in IEF buffer was determined by modified BCA assay. Immobiline DryStrips, 18 cm, with nonlinear pH 3–10 gradient (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) were used. Protein samples (100 mg) were applied to analytical gel. Separation was performed with Multiphor II (Amersham Biosciences). In the second dimension, 9–16% SDS-PAGE gradient was used. Electrophoresis was done on Protean II xi Multi Cell (BioRad, Hercules, CA, USA). Proteins on analytical gels were visualized by silver staining. The analytical gels were digitalized by laser densitometer Personal Densitometer (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). Image analysis was carried out using PDQuest (BioRad).

3.8. Basophil activation test

Flow cytometric basophil activation tests were performed after stimulation of blood cells with isolated wheat allergens or control (PBS, anti-IgE). The blood samples were obtained from the patients, disease controls and healthy donors. Briefly, 100 mL of heparinized whole blood and 10 mL of stimulation buffer were incubated (30 min at 37 °C) containing commercially available wheat extract (1000 IC/mL Stallergens, Antony Cedex, France) or selected allergens (concentration 1 mg/mL) diluted 1 : 10. After incubation, the samples were transferred on ice and stained with mAb anti-(cluster differentiation) CD203/PE (Beckman Coulter) and anti-CD63/FITC (Exbio, Prague, Czech Republic) for 15 min. After washing the cells, we measured the percentage of activated basophils expressing CD63 and CD203c by flow cytometry (FC500, Beckman Coulter).

3.9. Mass spectrometry analysis

The samples were mixed in an Eppendorf tube with the same volume of the matrix solution. One microliter of each mixture was applied to the MALDI sample plate, allowed to air-dry and introduced into the mass spectrometer. Spectra were recorded on MALDI-TOF mass spectrometer Voyager DE STR (Perseptive Biosystems, Farmingham, MA, USA) equipped with delayed extraction. Each mass spectrum was obtained by averaging 100 laser

shots. Proteins were identified using ProteinProspector and MASCOT programs. Proteins not identified by MALDI-TOF MS were analysed by QTOF and LCQ^{DECA} nLC-MS/MS ion trap technique.

3.10. ELISA

For allergen-specific IgE assay Nunc-Immuno Plates (Maxisorp Surface; Nunc, Roskilde, Denmark) were coated overnight at 47 °C with 50 mL of various antigens (20 mg/mL) in PBS and blocked with 1% BSA in PBS containing 0.1% Tween 20. After washing with PBS and PBS containing 0.05% Tween 20, patient's IgE was titrated in serum diluted serially two-fold throughout the plate (in blocking buffer), and incubated overnight at 47 °C. The plates were washed as described above and IgE binding was detected after incubation with peroxidase-labeled sheep antihuman IgE Abs (1:500) for 1 h at room temperature. The reaction was visualized after washing by adding 50 mL of TMB (Sigma) with H₂O₂ substrate per well for 15 min. The reaction was stopped by 50 mL of 2 M sulfuric acid, the resulting yellow color was measured at 450 nm and the results were expressed as corresponding OD.

4. RESULTS

4.1. Identification of wheat flour proteins recognized by IgE Abs of allergic patients

The salt-soluble proteins from the flour of six frequently used wheat cultivars (Sulamit, Nela, Alana, Ebi, Banquet and Mladka) and one ancient cultivar (Spalda) were extracted, separated by 1-DE and detected by IgE immunoblotting using sera of patients with allergy to ingested wheat. Using this approach we have demonstrated a large spectrum of wheat IgE-binding proteins of molecular mass ranging from 10 to 100 kDa. Initially, we documented the impact of various wheat cultivars, extraction procedure, and of the technique of separation on the detectable number of IgE-binding wheat components. The cultivar Sulamit was selected for further experiments because of its most frequent use in food industry (due to the high quality for bakery) and its large spectrum of IgE-binding proteins. Separation by 1-DE and immunoblot technique indicated the existence of three groups of reactive sera from allergic patients. IgE Abs of the first group recognized predominantly proteins of molecular mass above 30 kDa, those of the second group low-molecular mass components

below 30 kDa, and IgE of the third group recognized the whole spectrum of wheat molecules. When the wheat extract was separated under reducing conditions, IgE-binding proteins ranging from 10 to 70 kDa were detected in the sera of all patients tested.

The complexity of the proteins extracted from wheat was documented after resolving the samples by 2-DE. IgE binding molecules were detected after a transfer of separated proteins onto nitrocellulose membrane and subsequent incubation with the patient's sera. Most frequently recognized protein spots of Sulamit extract were identified by MALDI-TOF and QTOF analysis. The technique combining 1-DE separation, immunoblotting, and ion-trap mass spectrometer was employed to complete the spectrum of the wheat components recognized by IgE Abs. These methodological approaches revealed 19 IgE binding proteins including α -amylase inhibitors (CM16, CM17 and 0.19 dimeric), profilin, and Tri a Bd 27K protein. Moreover, we succeeded in identifying new IgE-binding wheat proteins such as β -amylase, β -D-glucan exohydrolase, serpin, α -amylase/trypsin inhibitor CM 3, α -amylase inhibitor CIII and three protein species of 27K protein.

To mimic the digestion of wheat containing food, we have tested the effect of pepsin on the immunogenicity of the extracted wheat proteins. After this treatment the number of IgE binding wheat components was significantly reduced and four proteins were identified as pepsin resistant: 0.19 dimeric α -amylase inhibitor, peroxidase 1, cytosolic cyclophilin and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

All techniques used in our study detected members of α -amylase inhibitor family and confirmed this enzyme as one of the major wheat allergens. Therefore, we developed an ELISA assay for the detection and quantification of sIgE Abs using our wheat extract and/or commercially available α -amylase inhibitors type 1 and 3 as the coupling antigens. The difference between sIgE mean values in healthy donors and allergic patients was statistically significant for all wheat allergens tested.

Moreover, in pilot experiments blood cells, obtained from six patients with clinical symptoms of wheat allergy and positive basophil activation test to a commercial wheat extract, were exposed to the salt extract from wheat cultivar Sulamit and to α -amylase inhibitors type 1 and 3, for comparison. Basophil activation induced by the Sulamit extract was similar to that induced by the commercial wheat extract, ranging from 31 to 97% of activated cells. Cell activation in response to α -amylase inhibitor type 1 was detected in three

out of six patients tested (leading to 23, 30, and 97% of activated cells). The activation by α -amylase inhibitor type 3 was not detected using any of the patient's blood cells.

Proteomic analysis of wheat proteins recognized by IgE antibodies of allergic patients.
Petr Šotkovský, Martin Hubálek, Lenka Hernychová, Petr Novák, Marie Havranová, Ivana Šetinová, Andrea Kitanovičová, Martin Fuchs, Jiří Stulík and Ludmila Tučková.
Proteomics 2008; 8: 1677-91

4.2. Isolation and purification of wheat flour allergens

We developed a new procedure for isolating and purifying relevant IgE-binding proteins from a water/salt-soluble extract of wheat flour in amounts that allowed subsequent structural and functional analyses. Isolation protocol consists of a three steps: ultrafiltration, isoelectric focusing (Rotofor), and liquid chromatography. Extracted salt soluble wheat proteins were sequentially separated on an Amicon ultrafiltration devices (providing gross separation according to molecular weight of proteins) and purified on the Rotofor cell (based on pI gradient in liquid phase) into 20 fractions. Sufficient quantities of proteins were obtained to enable their further fractionation by HPLC. Preparative reverse-phase HPLC was the main step in the purification of relatively large quantities of several water/salt soluble wheat proteins. Purified proteins were analyzed by immunoblotting using sera from 22 patients with atopic dermatitis and components binding to IgE were identified by MALDI-TOF mass spectrometry. This purification scheme yielded 27 IgE binding proteins, including several previously described α -amylase inhibitors, non-specific lipid-transfer proteins, peroxidase, serpins and β -amylase identified by two-dimensional electrophoresis, as well as several new wheat proteins, such as endogenous α -amylase/subtilisin inhibitor, wheatwin, TLP, tritin, XIP, β -glucosidase, class II chitinase and 26 kDa endochitinase.

We previously showed that wheatwin-2 is an IgE immunoreactive protein, and the results presented here showed that wheatwin-1 and wheatwin-2 have sequence homology of 97%. We were able to isolate them as a mixture of both isoforms with high purity. Furthermore, we have shown for the first time that both thaumatin-like protein and wheatwin bind to IgE from patient's sera and can activate patients' basophils to an extent comparable to

that of the well characterized allergens, α -amylase inhibitor 0.19 and lipid-transfer protein. Moreover, our yield of purified natural α -amylase inhibitor 0.19 was higher than that of other purified proteins and we confirmed its reactivity with patients' IgE Abs. This protein had not been isolated in its natural form in sufficient amount and purity before.

To characterize the intensity and frequency with which IgE Abs bind the individual wheat components, 17 purified allergens were immunoblotted with sera from all 22 patients, 10 disease controls and nine healthy controls. All patients sera tested (100%) showed positive IgE reactions with α -amylase inhibitors (0.28, CM16 and CM2), TLP and tritin. Of the 22 sera, 20 or 21 (91% or 95%) reacted with CM17, 0.53, 26 kDa endochitinase, XIP and class II chitinase. The frequency of recognition of other wheat proteins was also high ranging from 54% to 86%. The densitometric evaluation of intensity of IgE binding on immunoblots documented the differences of binding of individual wheat proteins. The IgE of patients reacted with the highest intensity (median 6–8) with the following already known allergens: α -amylase inhibitors 0.53, CM16 and CM2, CM17 and tritin, as well as with the newly identified IgE-binding wheat components TLP, 26 kDa endochitinase and class II chitinase. In contrast, the lowest binding intensity was determined for α -amylase inhibitors CM3 and wheatwin (median 1 and 2, respectively). Moreover, seven sera of disease controls (70%) recognized endogenous α -amylase inhibitor and tritin. Other proteins were recognized by < 50% sera or did not react. Nevertheless, the intensity of IgE binding calculated for disease controls was low (median 0–2). None of the sera from the nine healthy donors reacted with any of the isolated proteins.

A new approach to the isolation and characterization of wheat flour allergens. Šotkovský P, Sklenář J, Halada P, Cinová J, Šetinová I, Kainarová A, Goliáš J, Havlásková K, Honzová S and Tučková L. Clin Exp Allergy 2011; 41(7): 1031-43

4.3. Mouse model of food allergy

In this study we showed that irreversible changes in secondary structure of egg allergen ovalbumin (OVA) caused by thermal processing significantly affect its digestion by gut enzymes and decrease its allergenicity in the mouse model of food allergy. Effect of

increased temperature (70°C and 95°C) on OVA secondary structure was characterized by circular dichroism and by the kinetics of pepsin digestion with subsequent HPLC.

BALB/c mice were sensitized intraperitoneally and challenged with repeated gavages of OVA or OVA heated to 70°C (h-OVA). Levels of allergen-specific serum antibodies were determined by ELISA (IgA and IgGs) or by β -hexosaminidase release test (IgE). Specific activities of digestive enzymes were determined in brush border membrane vesicles of jejunal enterocytes. Cytokine production and changes in regulatory T cells in mesenteric lymph nodes and spleen were assessed by ELISA and flow cytometry. Heating of OVA to 70°C caused mild irreversible changes in secondary structure compared to boiling to 95°C (b-OVA), but both OVA treatments led to markedly different digestion kinetics and Tregs induction ability *in vitro*, compared to native OVA.

Although both heated and native OVA induced allergic diarrhea in BALB/c mice, the disease symptoms appeared much earlier and with a higher frequency in OVA fed mice than in those fed with h-OVA. Allergic diarrhea appeared in about 70% of mice already after the 5th i.g. dose of OVA, but only in 20% of those fed with h-OVA. After 7 i.g. doses, the disease symptoms were found in more than 90 % of OVA fed animals, but only in 35 % of those fed with h-OVA. At the end of the experiment (10 i.g. doses), the diarrhea was found in all mice fed with OVA, but only in 70% of mice fed with h-OVA.

To determine the effect of thermal processing of the allergen on the level and specificity of anti-OVA antibodies, the serum levels of IgE, IgG1, IgG2a and IgA against either OVA or h-OVA were determined in the course of the experiment. The level of IgE anti-OVA Abs was higher in response to native OVA than to h-OVA. In contrast, OVA-specific IgG2a was significantly higher after h-OVA feeding. The levels of the other two isotypes (IgG1 and IgA) were increased compared to controls but the differences corresponding to the two OVA forms were diminished towards the end of experiment. At the end of the experiment, we characterized the specificity and the degree of cross-reactivity of anti-OVA antibodies using ELISA with OVA, h-OVA or b-OVA bound as an antigen.

Increase of allergen sIgE is essential for mast cell activation and development of allergic diarrhea symptoms. We determined the level of MMCP-1 enzyme as the marker of mast cell activation and degranulation. In this case, the reducing effect of thermal processing was clearly demonstrated; the h-OVA induced only half the level of serum MMCP-1 compared to the native OVA.

Local and systemic cell responses to OVA and h-OVA were evaluated in all three groups of animals as *in vitro* cytokine production by MLN and splenocytes after exposure to corresponding allergens. The levels of TNF- α , IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13 were higher in culture media obtained from MLN exposed to native OVA. The differences in cytokine secretion were less pronounced in the experiments with splenocytes cultures. Only the production of IFN- γ was higher after exposure to h-OVA as compared to OVA.

Further, we analysed the changes in Tregs in spleen and MLNs of OVA-, h-OVA- and PBS-treated mice at the end of the experiment. In spleen we observed a decrease in Tregs in h-OVA treated mice, as compared to OVA- and PBS-treated mice. Only a non-significant increase was found in MLNs of h-OVA treated mice. To characterize the effect of heating and enzymatic digestion on T cell subpopulations, especially on regulatory T cell differentiation in more detail, splenocytes from naive (untreated) BALB/c mice were cultured *in vitro* either with OVA, h-OVA or b-OVA as well as with their peptic digests. The *in vitro* stimulation of splenocytes with undigested heated proteins led to a slight increase in proportion of CD4⁺Foxp3⁺ Treg cells compared to native form of OVA. Interestingly, 20 min peptic digests of heated forms of OVA induced increased proportion of Tregs, but this ability decreased again after 40 min of digestion.

Heat-induced structural changes affect OVA-antigen processing and reduce allergic response in mouse model of food allergy. Goliáš J, Schwarzer M, Wallner M, Kverka M, Kozáková H, Šrůtková D, Klimešová K, Šotkovský P, Palová-Jelínková L, Ferreira F and Tučková L. PLoS One. 2012; 7(5): e37156.

5. DISCUSSION

Recent research has provided clear progress in the understanding of wheat allergy, and has also revealed the problems to be resolved in the future. The reasons for the increase in food allergy prevalence are not well known, but, the short period of time over which the increase occurred, suggests that environmental factors are more likely to be relevant as part of the hygiene hypothesis [Bach, 2002; Schaub et al., 2006]. Extensive analysis of allergenic molecules is generally time-consuming, indicating the need for rapid and easy methods of

allergen separation. Greater knowledge will help in the precise diagnosis and treatment of food allergies. Importantly, additional studies will be necessary to elucidate the profiles of the allergens in both the water/salt-soluble and insoluble fractions involved in each clinical type depending on the patient age, sensitization routes, symptoms, and the allergen state during exposure.

Proteomic analysis has proved to be a useful tool for the identification of the causative food allergens and for increasing the specificity of diagnostic tests. Using this approach we have demonstrated a large spectrum of wheat proteins recognized by IgE Abs in the sera of allergic patients. The 2-DE technique has been a critical tool for the separation and analysis of proteins in complex systems. Hundreds to a few thousand proteins can be separated on the basis of IEF according to the pI of the proteins in the first dimension, and their relative molecular mass in the second dimension (SDS-PAGE). These IgE-binding proteins were subsequently identified by MALDI-TOF and QTOF technique. Using these methodological approaches we identified 14 IgE-binding proteins. The spectrum of identified proteins was supplemented with further 5 molecules using 1-DE separation and ion-trap mass spectrometry detection technique. These methodological approaches revealed IgE binding proteins including previously reported α -amylase inhibitors (CM16, CM17 and 0.19 dimeric) [Kitta et al., 2006; Weichel et al., 2006], profilin (of high sequence identity with birch pollen allergen) [Rihs et al., 1994], and Tri a Bd 27K protein [Yamashita et al., 2002]. Moreover, we succeeded in identifying new IgE-binding wheat proteins such as β -amylase, β -D-glucan exohydrolase, serpin, α -amylase/trypsin inhibitor CM 3, α -amylase inhibitor CIII and three protein species of 27K protein.

We developed a new procedure for isolating and purifying wheat flour allergens using Rotofor and HPLC. Rotofor fractionation of these wheat proteins based on pI gradient was an efficient initial purification step and can be utilized for protein loads ranging up to tens of milligrams in contrast to 2-DE. The main step in the purification of relatively large quantities of several water/salt soluble wheat proteins was preparative reverse-phase HPLC. The purified proteins were subsequently separated by SDS-PAGE and identified by MALDI-TOF mass spectrometry. This purification scheme yielded 27 IgE binding proteins, including several previously described α -amylase inhibitors, non-specific lipid-transfer proteins, peroxidase, serpins and β -amylase identified by 2-DE [Pastorello et al., 2007; Sotkovsky et al., 2008], as well as several new wheat proteins, such as endogenous α -amylase/subtilisin

inhibitor, wheatwin, TLP, tritin, XIP, β -glucosidase, class II chitinase and 26 kDa endochitinase.

All techniques used in our studies detected members of α -amylase inhibitor family and confirmed this enzyme as one of the major wheat allergens. We found that the most frequently recognized inhibitors were 0.28 and a mixture of CM16 and CM2 α -amylase inhibitors. However, the reactivity of the serum samples with other inhibitors, such as 0.19 α -amylase inhibitor, 0.19 dimeric, CM17, CM3 and endogenous α -amylase/subtilisin inhibitor was also statistically significant. Although the endogenous α -amylase/subtilisin inhibitor has not been reported as an allergen [Tatham, 2008], we observed a reactivity of this purified protein with IgE Abs from 19 out of 22 patients. Moreover, our yield of purified natural α -amylase inhibitors 0.19 was higher than that of other purified proteins [Sotkovsky et al., 2011]. This protein has been described as one of the major allergens of patients with baker's asthma as well as those with food allergy to wheat [Amano et al., 1998; Weichel et al., 2006], but it had not been isolated in its natural form in sufficient amount and purity. Recently, α -amylase inhibitors 0.19 and CM3 has been identified as strong activators of innate immune responses by engaging the TLR4–MD2–CD14 complex [Junker et al., 2012].

Despite the fact that α -amylase inhibitors were already known as allergens [Kusabana-Nakayama et al., 2001; Zapatero et al., 2003], a clinical study of quantitative estimation of IgE Abs against α -amylase inhibitors in the sera of allergic patients was missing. We developed new ELISA assay for the detection and quantification of sIgE Abs against wheat extract from the most frequently used cultivar Sulamit and/or commercially available α -amylase inhibitors type 1 and 3 as the coupling antigens.

We also succeeded in isolating and purifying new wheat allergens associated with food allergy, such as TLP and wheatwin. TLP isolated from wheat has been shown to be an allergen in patients with baker's respiratory allergy [Lehto et al., 2010] but not so far in patients with food allergy. Moreover, we identified and purified wheat lipid transfer protein that is also a major allergen associated with baker's asthma [Lauer et al., 2007]. In addition, we purified other new IgE-binding wheat components, such as XIP, class II chitinase and 26 kDa endochitinase, which were not previously identified as allergens in individuals with food allergy, although xylanase inhibitor protein was identified in patients with baker's asthma but not purified [Lehto et al., 2010]. Moreover, we have shown for the first time that purified allergens such as α -amylase inhibitor 0.19, lipid-transfer protein, TLP and wheatwin can

activate patients' basophils, thus showing that our purified proteins have biological activity and that the basophil activation test is useful in diagnosing this condition [Sotkovsky et al., 2011].

In our recent study with mouse model of food allergy [Golias et al., 2012], we showed that minor irreversible changes in OVA secondary structure caused by thermal processing changes its both digestion and antigenic epitopes formation lead to activation of different T cell subpopulations, induce shift towards Th1 response and ultimately reduces its allergenicity. Moreover, it would be of great importance to apply this model for verification of hygiene hypothesis using animals kept under conventional and/ or germ-free condition and subsequently colonized with various bacterial strains. Furthermore, this model will be useful for other allergens components identified from different natural sources.

6. CONCLUSIONS

Nowadays, proteomics plays a vital role in many scientific disciplines, enabling discovery of disease biology and mechanisms, new drug targets, food quality evaluation and much more. Application of proteomic techniques to the study of food quality has recently revealed its power in pointing out differences in food proteomes relevant for nutrition and diseases. IgE-reactive proteome analysis of wheat components provides not only an overall map of the allergenic proteins, but also useful information for further systematic research on wheat allergens and for individual desensitising treatments and therapeutic development. Innovative analytical methods and novel applications of available techniques are required to face the food allergenicity problems in an integrated manner. Due to the diversity of the naturally occurring samples and the physicochemical properties of proteins, sample preparation knowledge has been not yet well established. The research for food allergy and the implications for the clinical utility depend on a better understanding of the molecular nature of allergen components and those structures which are important for the antibody recognition and effector cell activation. This is especially true for the immunotherapy with a reduced risk of inducing adverse reactions, such as anaphylaxis [Factor et al., 2012; Kulis et al., 2012]. Moreover, identifying whether the sensitization is primary (species specific) or a result of cross-reactivity to proteins with similar protein structures makes it easier for the clinician to judge the risk of reaction on exposure to different allergen sources. The

development of allergen components in pure form has made it possible to resolve many of these problems. The main area of application for purified natural or recombinant allergen components is in the precise identification of the allergies that cause the disease [Borres et al., 2011]. Allergen extracts will be needed for the diagnosis of unusual allergies and in the cases of unusual sensitization patterns to common allergen sources, however, approaches based on well-defined individual molecules of either natural or recombinant origin are likely to supplement those based on food extracts in the future. Therefore, a library as Allergome comprising well-characterised authentic natural and recombinant allergens was formed. The protocols published in this library and the detailed physicochemical characteristics of the allergens will allow other researchers to produce batches of native allergens of similar quality. The availability of such information will improve the comparability of studies utilising purified allergens in future. The information about our contribution to identification of allergens can be found at Allergome databases. In particular, these high-quality purified food allergens will contribute to improve conventional food allergy diagnostics as well as to new technologies such as protein biochips. In the near future, allergenomic approaches could be used as a standard technique for *in vitro* separation and identification of allergens from foods including novel and/or reduced allergen products.

7. REFERENCES

- Akagawa M, Handoyo T, Ishii T, Kumazawa S, Morita N, Suyama K. Proteomic analysis of wheat flour allergens. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 6863–70.
- Amano M, Ogawa H, Kojima K, Kamidaira T, Suetsugu S, Yoshihama M et al. Identification of the major allergens in wheat flour responsible for baker's asthma. *Biochem J* 1998; 330: 1229-34.
- Armentia A, Sanchez Monge R, et al. In vivo allergenic activities of eleven purified members of a major allergen family from wheat and barley flour. *Clin Exp Allergy* 1993;23(5):410-5
- Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002; 347: 911-20.
- Borres MP, Ebisawa M, Eigenmann PA. Use of allergen components begins a new era in pediatric allergology. *Pediatr Allergy Immunol* 2011; 22(5): 454-61.
- Brunner R, Wallmann J, Szalai K, Karagiannis P, Altmepfen H, et al. Aluminium per se and in the anti-acid drug sucralfate promotes sensitization via the oral route. *Allergy* 2009; 64: 890–897.
- Cianferoni A, Spergel JM. Food allergy: review, classification and diagnosis. *Allergol Int* 2009; 58: 457-66.
- Factor JM, Mendelson L, Lee J, Nouman G, Lester MR. Effect of oral immunotherapy to peanut on food-specific quality of life. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2012; 109(5): 348-352.

- Golias J, Schwarzer M, Wallner M, Kverka M, Kozakova H, Srutkova D, Klimesova K, Sotkovsky P, Palova-Jelinkova L, Ferreira F and Tuckova L. Heat-induced structural changes affect OVA-antigen processing and reduce allergic response in mouse model of food allergy. *PLoS One*. 2012; 7(5): e37156.
- Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004; 4: 3665-85.
- Johansson SGO, Bieber T, Dahl R, Friedmann P, Lanier V, Lockey R, Motala C et al. Revised nomenclature for allergy for global use: report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 832–36.
- Junker Y, Zeissig S, Kim SJ, Barisani D, Wieser H, Leffler DA, Zevallos V, Libermann TA, Dillon S, Freitag TL, Kelly CP, Schuppan D. Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. *J Exp Med* 2012; 17; 209(13): 2395-408.
- James JM, Sixbey JP, Helm RM, Bannon GA, Burks AW. Wheat α -amylase inhibitor: A second route of allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 239-44.
- Jutel M, Jaeger L, Suck R, Meyer H, Fiebig H, Cromwell O. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 608–13.
- van Kampen V, Merget R, Rabstein S, Sander I, Bruening T, Broding HC et al. Comparison of wheat and rye flour solutions for skin prick testing: a multi-centre study (Stad 1). *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 1896-902.
- Kimber I, Dearman RJ, Penninks AH, Knippels LM, Buchanan RB, Hammerberg B, Jackson HA, Helm RM. Assessment of protein allergenicity on the basis of immune reactivity: animal models. *Environ Health Perspect*. 2003 Jun; 111(8): 1125-30.
- Kitta, K., Ohmishi-Kameyama, M., Moriyama, T., Ogawa, T. et al. Detection of low-molecular weight allergens resolved on two-dimensional electrophoresis with acid-urea polyacrylamide gel. *Anal Biochem* 2006; 351: 290–297.
- Kulis M, Wesley Burks A. Oral immunotherapy for food allergy: Clinical and preclinical studies. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012; 22 [Epub ahead of print].
- Kusaba-Nakayama, M., Ki, M., Kawada, E., Sato, M. et al. Intestinal absorbability of wheat allergens, subunits of wheat α -amylase inhibitor, expressed by bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001; 65: 2448-55.
- Lauer I, Miguel-Moncin MS, Abel T, Foetisch K, Hartz C, Fortunato D et al. Identification of a plane pollen lipid transfer protein (Pla a 3) and its immunological relation to the peach lipid transfer protein, Pru p 3. *Clin Exp Allergy* 2007; 37: 261–9.
- Lehto M, Airaksinen L, Puustinen A, Tillander S, Hannula S, Nyman T et al. Thaumatin-like protein and baker's respiratory allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010; 104: 139-46.
- Ostblom E, Lilja G, Pershagen G, van Hage M, Wickman M. Phenotypes of food hypersensitivity and development of allergic diseases during the first 8 years of life. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 1325-32.
- Palacin A, Quirce S, Armentia A, Fernandez-Nieto M, Pacios LF, Asensio T et al. Wheat lipid transfer protein is a major allergen associated with baker's asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 1132–8.
- Pali-Scholl I, Herzog R, Wallmann J, Szalai K, Brunner R, et al. Antacids and dietary supplements with an influence on the gastric pH increase the risk for food sensitization. *Clin Exp Allergy* 2010; 40: 1091–1098.
- Palosuo K. Update on wheat hypersensitivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003; 3: 205–9.
- Pastorello EA, Farioli L, Conti A, Pravettoni V, Bonomi S, Iametti S et al. Wheat IgE-mediated food allergy in European patients: α -amylase inhibitors, lipid transfer proteins and low molecular weight glutenins. Allergenic molecules recognized by double-blind, placebo-controlled food challenge. *Int Arch Allergy Immunol* 2007; 144: 10–22.
- Poole JA, Barriga K, Leung DYM, Hoffman M, Eisenbarth GS, Rewers M et al. Timing of initial exposure to cereal grains and the risk of wheat allergy. *Pediatrics* 2006; 117: 2175-82.
- Ramesh S. Food allergy overview in children. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008; 34: 217–30.
- Rihs HP, Rozynek P, May-Taube K, Welticke B et al. Polymerase chain reaction based cDNA cloning of wheat profilin: A potential plant allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 105: 190–4.
- Sampson HA. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103(5 part 1):717-28.

- Sampson HA: Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 891–6.
- Sampson HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: S540-7.
- Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PH, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Rostami K, Sanders DS, Schumann M, Ullrich R, Villalta D, Volta U, Catassi C, Fasano A. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med* 2012; 7: 10:13.
- Schaub B, Lauener R, von Mutius E. The many faces of the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 969-77.
- Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Annu Rev Med* 2009; 60: 261-77.
- Sotkovsky P, Hubalek M, Hernychova L, Novak P, Havranova M, Setinova I et al. Proteomic analysis of wheat proteins recognized by IgE antibodies of allergic patients. *Proteomics* 2008; 8: 1677-91.
- Sotkovsky P, Sklenar J, Halada P, Cinova J, Setinova I, Kainarova A, Golias J, Pavlaskova K, Honzova S, Tuckova L. A new approach to the isolation and characterization of wheat flour allergens. *Clin Exp Allergy* 2011; 41(7): 1031-43.
- Tatham AS, Shewry PR. Allergens in wheat and related cereals. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 1712-26.
- Tokuda R, Nagao M, Hiraguchi Y, Hosoki K, Matsuda T, Kuono K et al. Antigen-induced expression of CD203c on basophils predicts IgE-mediated wheat allergy. *Allergol Int* 2009; 58:193-9.
- Tordesillas L, Pacios LF, Palacin A, Quirce S, Armentia A, Barber D et al. Molecular basis of allergen cross-reactivity: Non-specific lipid transfer proteins from wheat flour and peach fruit as models. *Mol Immunol* 2009; 47: 534-40.
- van der Ventel ML, Nieuwenhuizen NE, Kirstein F, Hikuam C, Jeebhay MF, et al. Differential responses to natural and recombinant allergens in a murine model of fish allergy. *Mol Immunol* 2011; 48: 637-46.
- Weichel M, Vergoossen NJ, Bonomi S, Scibilia J, Ortolani C, Ballmer-Weber BK et al. Screening the allergenic repertoires of wheat and maize with sera from double-blind, placebo-controlled food challenge positive patients. *Allergy* 2006; 61:128–35.
- Yamashita H, Nanba Y, Onishi M, Kimoto M. et al. Identification of a wheat allergen, Tri a BD 36K, as a peroxidase. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002; 66: 2487–90.
- Zapatero M, Martínez MI, Alonso E, Salcedo G et al. Oral wheat flour anaphylaxis related to wheat α -amylase inhibitor subunits CM3 and CM16. *Allergy* 2003; 58: 956.
- Zicari AM, Indinnimeo L, De Castro G, Zappalà D, Tancredi G, Bonci E, Celani C, Duse M. Food allergy and the development of asthma symptoms. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2012; 25(3): 731-40.

8. PUBLICATIONS

Publications *in extenso* related to the present dissertation:

Šotkovský P, Hubálek M, Hernychová L, Novák P, Havranová M, Šetinová I, Kitanovičová A, Fuchs M, Stulík J and Tučková L. Proteomic analysis of wheat proteins recognized by IgE antibodies of allergic patients. *Proteomics* 2008; 8: 1677-91.

IF= 4,505

Šotkovský P, Sklenář J, Halada P, Cinová J, Šetinová I, Kainarová A, Goliáš J, Havlásková K, Honzová S and Tučková L. A new approach to the isolation and characterization of wheat flour allergens. *Clin Exp Allergy* 2011; 41(7): 1031-43

IF= 5,030

Goliáš J, Schwarzer M, Wallner M, Kverka M, Kozáková H, Šrůtková D, Klimešová K, **Šotkovský P**, Palová-Jelínková L, Ferreira F and Tučková L. Minor heat-induced structural changes affect OVA-antigen processing and reduce allergic response in mouse model of food allergy. *PLoS One*. 2012; 7(5): e37156.

IF= 4,090

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Imunologie



Autoreferát disertační práce

Potravinová alergie na proteiny pšeničné mouky

RNDr. Petr Šotkovský

Praha, 2012

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Program: Imunologie

Předseda oborové komise: Doc. RNDr. Vladimír Holáň, DrSc.

Školící pracoviště: Oddělení imunologie a gnotobiologie
Mikrobiologický ústav AV ČR v.v.i.
Vídeňská 1083, 14220, Praha 4 Krč

Autor: RNDr. Petr Šotkovský

Školitel: Doc. RNDr. Ludmila Tučková, DrSc.

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

OBSAH:

ZKRATKY.....	4
THESIS SUMMARY	6
SOURHN V ČEŠTINĚ	7
1. ÚVOD.....	8
2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE.....	10
3. MATERIÁL A METODIKA.....	11
3.1. Pacienti a kontroly.....	11
3.2. Měření celkového a specifického IgE.....	11
3.3. Příprava vzorků pšenice.....	11
3.4. Isoelektrická fokusace ve vodné fázi.....	12
3.5. Vysokotlaká kapalinová chromatografie.....	12
3.6. SDS-PAGE a imunobloting.....	12
3.7. 2-DE.....	13
3.8. Test aktivace bazofilů.....	13
3.9. Hmotnostní spektrometrie.....	13
3.10. ELISA	14
4. VÝSLEDKY.....	14
4.1. Identifikace proteinů pšeničné mouky rozpoznávaných patientskými IgE protilátkami.....	14
4.2. Izolace a purifikace alergenů pšeničné mouky.....	16
4.3. Myší model potravinové alergie.....	17
5. DISKUZE.....	19
6. ZÁVĚRY.....	21
7. POUŽITÁ LITERATURA.....	22
8. PUBLIKACE.....	25

ZKRATKY

1-DE	jednorozměrná elektroforéza
2-DE	dvourozměrná elektroforéza
BSA	hovězí sérový albumin
CD	cluster of differentiation
CM	chloroform methanol
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	endoplasmatické retikulum
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
IEF	isoelektrická fokusace
IFN	interferon
IgE	imunoglobulin třídy E
IL	interleukin
LC	kapalinová chromatografie
MALDI	laserová ionozace pomocí matrix
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MLN	mesenterické mízní uzliny
MMCP-1	proteasa-1 myši žírné buňky
MS	hmotnostní spektrometrie
OVA	ovalbumin
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PBS	fosfátem pufovaný roztok
PCR	polymerázová řetězová reakce
Q	quadrapol
ROC	receiver operating characteristic
SDS	dodecylsulfát sodný

sIgE	specifické IgE
tTG	tkáňová transglutamináza
TGF	transformující růstový faktor
TLP	thaumatin-like protein
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor nekrotický faktor
TOF	doba letu
WDEIA	na pšenici závislá cvičením indukovaná anafylaxe
XIP	xylanázový inhibitor

THESIS SUMMARY

Food allergy is one of the frequent disorders and its incidence in paediatric as well as adult population is continuously rising, having doubled in the last two decades. Although wheat belongs to major food allergens and is a staple food in most diets, we have only little knowledge of wheat proteins causing IgE mediated hypersensitivity reaction. Diagnostic approaches of food allergy to wheat have a high sensitivity, but low specificity. Poor predictability and specificity may be associated with the insufficient purity of wheat extracts used in specific IgE assays or with the lack of major allergens in these extracts.

In the first step, we characterized 19 potential allergens recognised by IgE Abs of allergic patients, using proteomic techniques (1-DE, 2-DE, MALDI-TOF, QTOF and LCQ^{DECA} nLC-MS/MS ion trap technique). We identified these IgE-binding molecules such as: α -amylase inhibitors, β -amylase, profilin, serpin, β -D-glucan exohydrolase and 27K protein. To quantify sIgE in patient's sera we developed ELISA using the whole wheat extract and two commercially available α -amylase inhibitors.

Second, we developed a procedure that allows isolation of wheat allergens from natural sources using Rotofor cell and HPLC. Twenty-seven potential wheat allergens have been successfully identified; of these, the following seven are newly reported in food allergy: endogenous α -amylase/subtilisin inhibitor, trypsin/ α -amylase inhibitor CMX1/CMX3, TLP, XIP, β -glucosidase, class II chitinase and 26 kDa endochitinase. The biological activity of purified allergens was tested using the basophil activation test. We have shown for the first time that purified allergens, such as α -amylase inhibitor 0.19, lipid transfer protein, TLP and wheatwin, can activate patients' basophils, confirming that our purified proteins maintain their biological activity.

Third, we investigated how thermal processing influences the ability of OVA to induce allergic symptoms and immune responses in mouse model of food allergy.

The aim of our studies is to identify the most important wheat allergens in IgE mediated hypersensitivity reaction. We developed new procedures of identification and isolation of allergens in their native form in amounts sufficient both for biological testing (*in vivo* and *in vitro*) and for physicochemical characterization. Such studies will lead to a more detailed knowledge of allergenicity of wheat proteins and to improved specificity of diagnostic tests.

SOUHRN V ČEŠTINĚ

Potravinová alergie je jedním z nejčastějších onemocnění a postihuje jak dětskou, tak dospělou populaci. Její výskyt neustále roste, v posledních dvaceti letech se zdvojnásobil. Ačkoliv pšenice patří mezi hlavní potravinové alergeny a je základní složkou většiny jídel, naše znalosti pšeničných proteinů způsobujících IgE hypersenzitivní reakci je nedostatečná. Diagnostika potravinové alergie na pšenici se vyznačuje vysokou senzitivitou, ale nízkou specificitou. Ta může být spojena s nedostatečnou čistotou používaných extraktů anebo absencí hlavních alergenů v těchto extraktech.

V prvním kroku jsme charakterizovali 19 potenciálních alergenů rozpoznávaných IgE protilátkami ze sér pacientů. Díky proteomickým metodám (1-DE, 2-DE, MALDI-TOF, QTOF a LCQ^{DECA} nLC-MS/MS iontová past) jsme identifikovali např. tyto IgE vázající molekuly: inhibitory α -amylázy, β -amyláza, profilin, serpin, β -D-glukan exohydroláza a 27K protein. Pro kvantifikaci IgE protilátek jsme vyvinuli metodu ELISA, ve které byl použit jak pšeničný extrakt, tak komerčně dostupné inhibitory α -amylázy.

V dalším kroku jsme vyvinuli metodu postupné izolace pšeničných alergenů z přírodních zdrojů, která využívá zařízení Rotofor a HPLC. Tímto přístupem bylo identifikováno 27 potenciálních alergenů, z nichž 7 bylo nově popsáno u potravinové alergie: endogenní inhibitor α -amylázy, inhibitor α -amylázy CMX1/CMX3, TLP, XIP, β -glucosidáza, chitináza třídy II a 26 kDa endochitináza. Pro testování biologické aktivity purifikovaných alergenů byl použit test aktivace bazofilů. Jako první jsme ukázali, že purifikované alergeny jako inhibitor α -amylázy 0.19, lipid transfer protein, TLP a wheatwin aktivují pacientské bazofily. Tímto se potvrdilo, že naše purifikované proteiny si zachovávají svou biologickou aktivitu.

Na myším modelu jsme také zkoumali vliv tepelného opracování vaječného ovalbuminu na jeho schopnost vyvolat odpověď imunitního systému.

Hlavním přínosem těchto prací je identifikace nejdůležitějších pšeničných alergenů schopných vyvolat IgE hypersenzitivní reakci. Vyvinuli jsme nové metody pro identifikaci a izolaci alergenů v jejich přírodní formě a to v množství, které je dostatečné jak pro biologické testy (*in vivo*, *in vitro*), tak pro fyzi chemickou charakterizaci. Tato studie povede ke zpřesnění znalostí o alergenicitě pšeničných alergenů a ke zlepšení specificity diagnostických testů.

1. ÚVOD

Potravinová alergie je závažné onemocnění postihující 6 až 8% dětí a 2-3% dospělých, její výskyt neustále roste [Poole et al., 2006; Ostblom et al., 2008; Zicari et al., 2012]. Za normálních fyziologických podmínek vytváří imunitní systém orální toleranci, což je aktivní inhibice systémové odpovědi na velké množství požitých alergenů a na komenzální organismy které aktivují imunitní systém v potlačení strávených patogenů. Orální tolerance závisí na neporušené a imunologicky aktivní střevní bariéře. I přes velmi kyselé prostředí žaludku a přes trávicí enzymy prochází zhruba 2% strávených potravinových antigenů přes gastrointestinální bariéru a tyto antigeny jsou transportovány v těle ve formě, která je za normálních okolností neškodná a nedochází tak k rozvoji potravinové alergie [Sampson,1999]. Potravinové alergie můžeme klasifikovat na a) zprostředkované IgE protilátkami, tato reakce je u potravinových alergií nejlépe charakterizována; b) zprostředkované buňkami; c) kombinované, kdy jsou do reakce zahrnuty jak IgE protilátky tak i buňky imunitního systému [Sampson, 2003; Cianferoni et al., 2009; Sicherer et al., 2009]. Obecně je hlavním imunologickým mechanismem u potravinových alergií reakce typu I, která je charakterizována vysokou hladinou celkového IgE a specifického IgE proti normálně neškodným antigenům.

Pšenice je ve světě nejvíce konzumovanou obilninou a patří mezi 6 hlavních potravinových alergenů (mléko, vajíčka, pšenice, arašídý, sója a ryby), které jsou zodpovědné za 80% reakcí u potravinových alergií [Ramesh, 2008]. Ačkoliv jsou obilniny základní složkou stravy pro většinu lidí, informace ohledně pšeničných alergenů způsobujících hypersenzitivní reakce jsou nedostatečné. Alergie na pšenici je definována jako poškozující imunologická reakce po kontaktu s alergeny pšenice a může se vyskytovat jako po pozření pšenice klasická potravinová alergie s kožními, trávicími a respiračními symptomy; kontaktní kopřivka; a na pšenici závislá cvičením indukovaná anafylaxe (WDEIA) [Palosuo, 2003; Johansson et al., 2004; Sapone et al., 2012]. Diagnostika potravinové alergie na pšenici není nicméně jednoduchá. Hlavní dostupné *in vivo* metody jsou dvojitě slepá placebem kontrolovaná studie a kožní prick testy. Ačkoliv jsou orální provokační testy považovány v diagnostice za zlatý standard, jsou časově náročné a mohou způsobit vážné klinické symptomy. Kožní prick testy jsou vhodné pro pacienty s pekařským astmatem, nikoliv pro ty s atopickou dermatitidou [van Kampen et al., 2009]. Naproti tomu je test aktivace bazofilů brán jako vhodná diagnostická metoda *in vitro* [Tokuda et al., 2009]. Pro detekci a

kvantifikaci specifických IgE protilátek *in vitro* byly vyvinuty radioimunologické (RIA) a enzymatické (ELISA) metody. Ačkoliv jsou tyto imunologické metody vysoce senzitivní, mají však nízkou specificitu a nelze také vyloučit určitý stupeň křížové reakce [Sampson 2001; Tordesillas et al., 2009]. Nízká prediktabilita a specificita všech dosud známých testů může být spojena s čistotou pšeničných extraktů používaných při testování specifického IgE nebo také s nízkým obsahem hlavních alergenů. Molekulární alergologie napomáhá svými výhodami v rozvoji nového konceptu diagnostiky alergií (tzv. component-resolved diagnosis) a slouží k identifikaci potenciálních molekul způsobujících alergické reakce.

Na základě různé rozpustnosti může pšeničné proteiny rozdělit na ve vodě/solných roztocích rozpustné albuminy a globuliny na ve vodě/solných roztocích nerozpustné gliadiny a gluteniny. Obiloviny jsou sice základní potravina, nicméně ne všechny pšeničné alergeny byly identifikovány. Nicméně v posledních letech objevila proteomová analýza řadu IgE reaktivních komponent ve vodě/solných roztocích jak rozpustných tak nerozpustných [Görg et al., 2004; Akagawa et al., 2007]. Mezi hlavní alergeny identifikované ze pšeničné mouky ve vodné/solné frakci patří inhibitory α -amylázy/trypsinu, které mohou způsobit senzitivizaci po strávení i inhalaci [Armentia A, 1993; James JM, 1997]. Dalším důležitým rostlinným potravinovým panalergenem je nespecifický lipid transfer protein, který se do těla dostává jak trávicím tak dýchacím systémem [Lauer et al., 2007; Palacin et al., 2007; Tordesillas et al., 2009]. I když proteomová analýza identifikovala další ve vodě/solných roztocích rozpustné pšeničné proteiny jako např. β -amyláza, thioredoxin a serpiny, seznam všech purifikovaných pšeničných alergenů není dosud k dispozici a otázka jejich klinické relevance zůstává nezodpovězena [Pastorello et al., 2007; Tatham et al., 2008]. Informace o dosud identifikovaných alergenech lze najít v alergenových databázích, jako je např. databáze Allergome (www.allergome.org).

Protože jsou studie na alergických jedincích limitované, zvířecí modely potravinové alergie napomáhají pochopení mechanismu této choroby. Vzdělává proto zájem o vytvoření vhodného zvířecího modelu a jeho zavedení do praxe [Kimber I, 2003; Brunner et al., 2009; Pali-Scholl I et al., 2010; van der Ventel ML et al., 2011].

2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této práce bylo identifikovat a charakterizovat nejčastěji rozpoznávané pšeničné alergeny, analyzovat jejich alergenicitu, přispět k většímu pochopení hypersenzitivních reakcí a zlepšit diagnostiku pšeničné alergie.

Specifické cíle práce:

- pomocí proteomických technik (1-DE, 2-DE, MALDI-TOF, QTOF a LCQ^{DECA} nLC-MS/MS iontová past) identifikovat pšeničné alergeny nejčastěji rozpoznávané IgE protilátkami ze sér pacientů.
- vyvinout novou metodu pro izolaci a purifikaci identifikovaných IgE reaktivních pšeničných alergenů v jejich přírodní formě a v množství umožňující následné strukturální a funkční analýzy, stejně tak jako najít nové alergeny za použití ultrafiltrace, izoelektrické fokusace (Rotofor) a kapalinové chromatografie.
- zkoumat klinickou relevanci nově identifikovaných a purifikovaných alergenů použitím stanovení sIgE *in vitro* (ELISA, Immunoblot) v korelaci s výsledky kožních prick testů.
- testovat buněčnou odpověď patientských bazofilů s extrahovanými proteiny a identifikovanými alergeny v testu aktivace bazofilů.
- analyzovat efekt pepsinu na imunogenicitu extrahovaných pšeničných proteinů a simulovat tím trávení potravin obsahujících pšenici.
- na myším modelu potravinové alergie zkoumat vliv tepelného opracování ovalbuminu na jeho schopnost indukovat alergické symptomy a imunitní odpověď.

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Pacienti a kontroly

Séra byla získána od pacientů s atopickou dermatidou. Všichni pacienti měli příznaky alergie na pšenici a měli zvýšenou hladinu sIgE (střední hodnota 10.24 U/mL; rozsah, 0.4–72 U/mL). Potravinová alergie byla stanovena na základě pozitivních kožních prick testů, sIgE a pozitivního testu aktivace bazofilů. Kožní testy se prováděly s komerčními alergenovými extrakty (Alyostal, Stallergenes, Francie). Jako pozitivní odpověď je považováno zarudlé místo po vpichu o průměru 3 mm a větší oproti negativní kontrole. Jako negativní kontroly byla použita séra zdravých dárců s normálními hodnotami celkového IgE a sIgE.

3.2. Měření celkového a specifického IgE

Koncentrace celkového a sIgE na pšenici byla stanovena pomocí enzymového fluorescenčního imunotestu (UniCAP, Pharmacia, Švédsko nebo Immulite 2000, DPC, Siemens Medical Solution Diagnosis) podle doporučení výrobce. Hladina sIgE nad hodnotou 0.35 kU/L byla považována za pozitivní

3.3. Příprava vzorků pšenice

Z České Zemědělské Univerzity v Praze byly získány vzorky mouky ze sedmi nejčastěji používaných kultivarů pšenice (*Triticum aestivum*): Sulamit, Nela, Alana, Ebi, Banquet, Mladka, Akteur a kultivar Špalda (*Triticum spelta*). Proteiny byly extrahovány ze pšeničné mouky (4 g) pomocí PBS (40 mL) přes noc při 4 °C, ultrasonikovány 15min na ledu a centrifugovány při 20 000 g 15 min při 4 °C. Extrahované proteiny z kultivaru Sulamit byly také opracovány pepsinem navázaným na agarózovém gelu (ICN, Biomedicals, OH). Extrahované proteiny z kultivaru Akteur byly následně nahrubo separovány pomocí ultrafiltračních zařízení Amicon Ultra 100k, 30k a 10k (Millipore, Billerica, MA, USA) v tomto pořadí podle molekulární hmotnosti proteinů. Koncentrovaná vysokomolekulární frakce byla odstraněna a filtrát byl dále zpracován pomocí 30k filtru s hodnotou cut-off 30 kDa. Koncentrát byl uchován (frakce I) a filtrát byl dále purifikován pomocí 10k filtru s hodnotou cut-off 10 kDa a uložen jako frakce II (60 min, 2500 g and 20 °C). Koncentrace proteinů byla měřena Proteinovým kitem (BCA, Pierce, IL, USA).

3.4. Isoelektrická fokusace ve vodné fázi

Proteiny frakce I a II byly separovány podle jejich hodnoty pI použitím Rotoforové preparativní cely (Bio-Rad). Proteiny frakce I (15 mL, 45 mg proteinů) se smíchaly s 0.5% CHAPS a byly naředěny na 55 mL destilovanou vodou obsahující 5% glycerol, 5% směs Bio-Lyte pH 5–8, pH 3–10 (Bio-Rad) a amfolyt pH 4–6 (Fluka, Buchs, Švýcarsko). Proteiny frakce II byly ředěny podobně až na směs amfolytů (v tomto případě pH 4–6 and pH 6–9). Oba vzorky byly frakcionovány pomocí Rotoforu se standardním obsahem 60 mL a 20 frakcionačními odděleními. Takto se připravilo 20 frakcí, u nichž se změnilo pH pomocí mikroelektrody.

3.5. Vysokotlaká kapalinová chromatografie

Všech 20 frakcí bylo následně zpracováno pomocí HPLC (system Gold 125NM solvent Module Beckman Coulter, Miami, FL, USA). Vzorky byly centrifugovány 10 min při 12 000 g. Supernatant byl aplikován (2 mg proteinů) na kolonu s polymerní reverzní fází (PLRP-S) 1000A, 8 µm, 250x406mm (Varian, Palo Alto, CA, USA) a dále byl separován průtokem 1mL/min v lineárním gradientu (roztok A, 0.1% TFA/H₂O; roztok B, 0.1% TFA/acetonitrile). Program gradientu začal s 95% roztoku A a 5% roztoku B a měnil se takto: 5–25% B/5 min, 25–45% B/50 min, 45–70% B/5 min and 70–95% B/0.5 min. Kolona se promyla 95 % roztokem B (10 min) a equilibrovala na počáteční stav. Vzorky byly vysušeny na vakuové centrifuze (SpeedVac, Jouan, Winchester, VA, USA) a rozpuštěny v PBS.

3.6. SDS-PAGE a imunobloting

Izolované proteiny byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (koncentrace 1 nebo 3 mg/mL) v 15% nebo gradientovém (5-20%) gelu za redukčních podmínek. Separované proteiny se barvily Coomassies Brilliant Blue R-250 (CBB). Vybrané frakce byly přeneseny na nitrocelulóзовou membránu (NC2, SERVA, Heidelberg, Germany) (1 hod, laboratorní teplotě). Membrána se blokovala PBS s 0.5% Tween 20 a inkubovala s patientským sérem ředěným 1:10 v blokačním pufru přes noc při 4 °C. Po promytí PBS–0.1% Tween 20 byly stripy membrány inkubovány s peroxidázou značenou ovčí anti-lidskou IgE sekundární protilátkou (1:1000; The Binding Site, Birmingham, UK) jednu hodinu za laboratorní teploty. Reakce se vyvolala pomocí SuperSignalWest Pico Trial kitu (Pierce). Luminiscence se detekovala na Kodak Medical X-ray filmy (Kodak, Rochester, NY, USA). Data byla digitalizována a vyhodnocena programem AIDA 3.28 (Raytest, Straubenhardt, Germany).

3.7. 2-DE

Pšeničné proteiny byly precipitovány a následně rozpuštěny v IEF pufru. Jejich koncentrace byla stanovena modifikovaným testem BCA. Vzorky proteinů (100 mg) bylo použito pro nanesení na analytický gel (Immobiline DryStrips, 18 cm, nelineární pH 3–10 gradient, Amersham Biosciences, Uppsala, Švédsko). Ve druhém rozměru byl použit gradientový gel 9-16%. Elektroforéza byla puštěna na přístroji Protean II xi Multi Cell (BioRad, Hercules, CA, USA). Proteiny z analytického gelu byly barveny stříbrem. Gely byly digitalizovány pomocí laserového denzitometru (Personal Densitometer, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). Vyhodnocené bylo provedeno pomocí programu PDQuest (BioRad).

3.8. Test aktivace bazofilů

Test aktivace bazofilů se provedl na průtokovém cytometru po stimulaci krevních buněk s izolovanými pšeničnými protein a kontrolou (PBS, anti-IgE). Vzorky krve byly získány od pacientů s pšeničnou alergií, pacientů s jinými typy alergie a zdravými dárci. Zkráceně, 100 mL heparinizované krve se inkubovalo (30 min při 37 °C) s 10 mL stimulačního pufru obsahujícím (v poměru 1:10) komerčně dostupný pšeničný extrakt (1000 IC/mL Stallergens, Antony Cedex, Francie) a nebo vybrané pšeničné alergeny (koncentrace 1mg/mL). Po inkubaci byly vzorky přeneseny na ledu a inkubovány 15 min s CD203/PE (Beckman Coulter) a anti-CD63/FITC (Exbio, Prague, Czech Republic). Po odmytí buněk se průtokovým citometrem (FC500, Beckman Coulter) měřilo procento aktivovaných bazofilů exprimujících CD63 and CD203c.

3.9. Hmotnostní spektrometrie

Vzorky byly smíchány ve zkumavkách ve stejném objemu s matrix. Jeden mikrolitr z každé směsi byl aplikován na MALDI vzorkovou destičku, vysušen a vložen do hmotnostního spektrometru. Spektra byla zaznamenávána na přístroji MALDI-TOF Voyager DE STR (Perseptive Biosystems, Farmingham, MA, USA). Každé ze spekter bylo získáno sty laserovými výstřely. Proteiny se identifikovaly pomocí programu ProteinProspector a MASCOT. Proteiny, které se neidentifikovaly na MALDI-TOF byly analyzovány na QTOF a LCQ^{DECA} nLC-MS/MS iontová past.

3.10. ELISA

Pro stanovení alergen-specifického IgE se Mikrotitrační destičky (Maxisorp Surface; Nunc, Roskilde, Denmark) přes noc při 47 °C pokryly různými alergeny (50 mL o koncentraci 20 mg/mL v PBS). Blokace se provedla 1% BSA v PBS obsahujícím 0.1% Tween 20. Po promytí s PBS a PBS obsahujícím 0.05% Tween 20 bylo v dubletech napipetováno patientské sérum s IgE protilátkami a inkubováno přes noc při 47 °C. Destičky se promyly, jak bylo popsáno výše a reakce IgE protilátek byla detekována po hodinové inkubaci s peroxidázou značenou ovčí protilidskou IgE protilátkou (1:500) při laboratorní teplotě. Reakce se vizualizovala po promytí a přidání 50 mL TMB (Sigma) s H₂O₂ a inkubaci 15 min. Reakce se zastavila přidáním 50 mL 2 M roztoku kyseliny sírové. Výsledné žluté zabarvení se měřilo při 450 nm a výsledky se vyjádřily jako příslušná hodnota optické denzity.

4. VÝSLEDKY

4.1. Identifikace proteinů pšeničné mouky rozpoznávaných patientskými IgE protilátkami

Ve vodě/solných roztocích rozpustné proteiny z mouky ze šesti pšeničných kultivarů (Sulamit, Nela, Alana, Ebi, Banquet a Mladka) a z jednoho starého kultivaru (Špalda) byly extrahovány, separovány na 1-DE a detekovány IgE protilátkami ze sér alergických pacientů na imunoblotu. Tímto přístupem jsme popsali velké spektrum pšeničných IgE vázajících proteinů s molekulovou hmotností od 10 do 100 kDa. Na začátku jsme dokumentovali vliv různých pšeničných kultivarů, extrakčních postupů a technik separace na detekci IgE vázajících pšeničných komponent. Kultivar Sulamit byl vybrán pro další experimenty vzhledem k jeho častému použití v potravinářství (je vysoce kvalitní pro pekařské potřeby) a velkému spektru IgE vázajících proteinů. Separace na 1-DE a metoda imunoblot indikovala tři skupiny sér alergických pacientů. V první skupině byly IgE protilátkami rozpoznávány hlavně proteiny s molekulovou hmotností nad 30 kDa, ve druhé skupině proteiny pod 30 kDa a ve třetí skupině celé spektrum pšeničných proteinů. Za redukčních podmínek reagovaly IgE protilátky s proteiny s molekulovou hmotností mezi 10 až 70 kDa u všech testovaných pacientů.

Spektrum identifikovaných pšeničných alergenů bylo doplněno po 2-DE analýze. IgE reaktivní molekuly byly detekovány po separaci a přenosu na nitrocelulóзовou membránu po inkubaci s patientskými séry. Nejčastěji rozpoznávané proteinové spoty z extraktu Sulamitu byly identifikovány na přístrojích MALDI-TOF a QTOF. Technika kombinující 1-DE separaci, imunoblot a iontovou past doplnila spektrum pšeničných komponent rozpoznávaných IgE protilátek. Tento metodologický přístup odhalil 19 IgE vázajících proteinů jako např. inhibitory α -amylázy (CM16, CM17 a dimerní 0.19), profilin, a protein Tri a Bd 27K.

Pro simulaci podmínek trávení potravin obsahujících pšenici jsme testovali vliv pepsinu na imunogenicitu extrahovaných pšeničných proteinů. Počet IgE reaktivních komponent se významně snížil po tomto opracování, čtyři proteiny byly identifikovány jako pepsin rezistentní: dimerní inhibitor α -amylázy 0.19, peroxidáza 1, cyklofilin a glyceraldehyd-3-fosfat dehydrogenáza.

Všechny techniky v naší studii detekovaly řadu členů rodiny inhibitorů α -amylázy a potvrdily tyto enzymy jako hlavní pšeničné alergeny. Proto jsme vyvinuli metodu ELISA pro detekci a kvantifikaci sIgE protilátek s použitím našich pšeničných extraktů a komerčně dostupných inhibitorů α -amylázy typ 1 a 3 jako antigenů. Rozdíl mezi střední hodnotou sIgE u zdravých dárců a alergických pacientů byl statisticky významný pro všechny pšeničné alergeny.

V pilotní studii byly krevní bazofily získané z krve pacientů, kteří měli klinické symptomy pšeničné alergie, kultivovány s pšeničným extraktem kultivaru Sulamit a inhibitory α -amylázy typu 1 a 3. Aktivace bazofilů indukovaná extraktem ze Sulamitu byla podobná indukci po kultivaci s komerčním extraktem (rozmezí bylo 31 až 97% aktivovaných bazofilů). Buněčná aktivace po kultivaci s inhibitorem α -amylázy typu 1 byla detekována u tří ze šesti testovaných pacientů (aktivace byla u 23, 30, a 97% buněk). Po kultivaci s inhibitorem α -amylázy typu 3 nedošlo u žádných testovaných pacientů k aktivaci bazofilů.

Proteomic analysis of wheat proteins recognized by IgE antibodies of allergic patients. Petr Šotkovský, Martin Hubálek, Lenka Hernychová, Petr Novák, Marie Havranová, Ivana Šetinová, Andrea Kitanovičová, Martin Fuchs, Jiří Stulík and Ludmila Tučková. Proteomics 2008; 8: 1677-91

4.2. Izolace a purifikace alergenů pšeničné mouky

Vyvinuli jsme nový postup pro izolaci a purifikaci IgE vázajících proteinů z vodného/solného extraktu z pšeničné mouky a to v množství, které umožňuje další analýzy. Izolace se skládá ze tří hlavních kroků: ultrafiltrace, isoelektrická fokusace (Rotofor), a kapalinová chromatografie. Podrobněji, extrahované proteiny byly nejprve separovány na ultrafiltračních zařízeních Amicon (rozdělení podle molekulové hmotnosti) a následně purifikovány na přístroji Rotofor (na základě gradientu pI ve vodné vázi) do 20 frakcí. Dostatečné množství proteinů bylo získáno další frakcionací na HPLC. Hlavním krokem při purifikaci relativně velkého množství různých ve vodě/solných roztocích rozpustných pšeničných proteinů bylo preparativní HPLC s reverzní fází. Purifikované proteiny byly analyzovány na imunobotu se séry 22 pacientů s atopickou dermatitidou. Komponenty vázající IgE byly identifikovány na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru. Tímto purifikačním postupem jsme získali 27 IgE vázajících proteinů jako např. již dříve popsané inhibitory α -amylázy, lipid transfer protein, peroxidázu, serpiny a β -amylázu, ale také několik nových pšeničných proteinů: endogenní inhibitor α -amylázy/subtilizinu, wheatwin, TLP, tritin, XIP, β -glukosidáza, chitináza třídy II a endochitináza 26 kDa.

V předchozí práci jsme ukázali, že je wheatwin-2 IgE imunoreaktivní protein. Výsledky v této práci ukazují, že wheatwin-1 a wheatwin-2 mají sekvenční homologii 97% a že jsme schopni je izolovat ve vysoké čistotě jako směs obou izoform. Jako první jsme také ukázali, že protein wheatwin a TLP vážou nejen pacientské IgE protilátky, ale také aktivují bazofily z krve pacientů, a to ve srovnání s dobře charakterizovanými alergeny: inhibitor α -amylázy 0.19 a lipid transfer protein. Výtěžek purifikace inhibitoru α -amylázy 0.19 byl přitom největší ze všech námi purifikovaných proteinů. Navíc jsme potvrdili jeho reaktivitu s pacientskými IgE protilátkami. Tento protein ještě nikdy nebyl izolován z přírodních zdrojů v dostatečném množství a čistotě.

Pro zjištění intenzity a frekvence vazby IgE protilátek s jednotlivými pšeničnými komponentami bylo 17 purifikovaných alergenů testováno na imunoblotu se séry všech 22 pacientů, 10 pacientů s jinými alergiemi než pšeničnými a 9 zdravých dárců. U všech pacientů (100%) byla pozitivní reakce IgE protilátek s inhibitory α -amylázy (0.28, CM16 a CM2),

TLP a tritin. 20 nebo 21 pacientů (91% nebo 95%) reagovalo na inhibitory α -amylázy CM17, 0.53, 26 kDa endochitinázu, XIP a chitinázu třídy II. Frekvence rozpoznávání další pšeničných proteinů byla také vysoká pohybující se mezi 54% až 86%. Denzitometrické měření intenzity vazby IgE protilátek na imunoblotu dokumentuje rozdíly ve vazbě u jednotlivých pšeničných proteinů. Pacientské IgE protilátky reagovaly s největší intenzitou (střední hodnota 6-8) s již známými alergeny (inhibitory α -amylázy 0.53, CM16 a CM2, CM17 a tritin), ale také s nově identifikovanými pšeničnými komponentami (TLP, 26 kDa endochitináza a chitinázu třídy II). Naproti tomu byla nejnižší vazebná intenzita změřena u inhibitorů α -amylázy CM3 a wheatwin (střední hodnota 1 a 2). Sedm sér od pacientů s jinými alergiemi (70%) rozpoznávalo endogenní inhibitor α -amylázy a tritin. Další proteiny byly rozpoznávány méně než 50% pacientů nebo byla reakce negativní. Nicméně intenzita IgE vazby u pacientů s jinými alergiemi byla nízká (střední hodnota 0-2). U žádného séra zdravých dárců nebyla reakce IgE s izolovanými proteiny pozorována.

A new approach to the isolation and characterization of wheat flour allergens. Šotkovský P, Sklenář J, Halada P, Cinová J, Šetinová I, Kainarová A, Goliáš J, Havlásková K, Honzová S and Tučková L. Clin Exp Allergy 2011; 41(7): 1031-43

4.3. Myší model potravinové alergie

V této studii jsme ukázali, že ireverzibilní změny v sekundární struktuře vaječného alergenu OVA způsobené tepelným opracováním významně ovlivnily trávení tohoto alergenu enzymy a snížili jeho alergenicitu u myšího modelu potravinové alergie. Vliv zvýšené teploty (70°C a 95°C) na OVA byl charakterizován cirkulárním dichroizmem a kinetikou pepsinového trávení s následnou analýzou na HPLC.

Myši BALB/c byly intraperitoneálně senzitivovány opakovaným podáním OVA a zahřátého OVA na 70°C (h-OVA). Hladina sIgE byla měřena metodou ELISA (IgA a IgG) nebo β -hexosaminidázovým testem (IgE). Aktivita trávicích enzymů byla měřena ve vezikulách kartáčového lemu jejunálních enterocytů. Produkce cytokinů a změny u regulačních T- lymfocytů v mezenterních mízních uzlinách a sleziny byly stanoveny metodou ELISA a průtokovou cytometrií. Zahřátí OVA na 70°C způsobilo mírné ireverzibilní změny

v sekundární struktuře ve srovnání se zahřátím na 95°C (b-OVA), nicméně obě opracování vedla k výrazné změně v trávení a schopnosti indukovat regulační T lymfocyty *in vitro* ve srovnání s neopracovaným OVA.

I když tepelně opracovaný i neopracovaný OVA indukoval u BALB/c myši alergický průjem, symptomy se objevily daleko dříve a s větší frekvencí u myši krmených OVA než h-OVA. Alergický průjem se objevil u 70% myši po podání páté dávky OVA, ale jen u 20% myši krmených h-OVA. Po sedmé dávce byly symptomy u více než 90% myši krmených OVA, ale jen u 35% krmených h-OVA. Na konci experimentu (10. Dávka) měly průjem všechny myši krmené OVA, ale jen 70% myši krmených h-OVA.

Pro stanovení vlivu tepelného opracování byly v průběhu experimentu měřeny hladiny IgE, IgG1, IgG2a a IgA protilátek proti OVA nebo h-OVA. Hladina anti-OVA IgE byla vyšší u nativního OVA než u h-OVA. Naproti tomu hladina IgG2 protilátek byla vyšší u h-OVA. Hladiny dalších dvou izotypů protilátek (IgG1 a IgA) byla zvýšená oproti kontrolám, ale rozdíly mezi nimi byly minimální. Na konci experimentu jsme zkoumali metodou ELISA specifitu a stupeň křížové reaktivity u protilátek proti OVA, h-OVA a b-OVA.

Zvýšení hladiny sIgE je důležité pro aktivaci žírných buněk a rozvoj alergických symptomů. Stanovovali jsme hladinu enzymu MMCP-1 jako ukazatele aktivace a degranulace žírných buněk. V tomto případě byl efekt tepelného opracování jasně prokázán: h-OVA indukoval pouze polovinu množství MMCP-1 oproti nativnímu OVA.

Lokální a systémová buněčná odpověď na OVA a h-OVA byla vyhodnocena u všech tří skupin zvířat v testech *in vitro* jako cytokinová produkce MLN a splenocytů po kultivaci s jednotlivými alergeny. Hladina TNF- α , IL-4, IL-5, IL-10 a IL-13 byla vyšší u kultur obsahujících MLN s nativním OVA. Rozdíly v produkci cytokinů byly méně výrazné u experimentů se splenocyty. Pouze produkce IFN- γ byla vyšší po expozici h-OVA než po OVA.

Dále jsme analyzovali změny u regulačních T-lymfocytů ze sleziny a MLN myši po aplikaci OVA, h-OVA a PBS. Ve slezině jsme pozorovali pokles těchto T-lymfocytů u myši, kterým byl podáván h-OVA ve srovnání s těmi s OVA a PBS. U MLN z myši s aplikovaným h-OVA nebyl nárůst signifikantní. Pro charakterizaci vlivu tepelného a enzymatického opracování na populaci T-lymfocytů (hlavně na diferenciaci regulačních T-lymfocytů) byly z nových BALB/c myši *in vitro* kultivovány splenocyty s OVA, h-OVA, b-OVA a s jejich peptidy po natrávení. Stimulace *in vitro* vedla u tepelně opracovaných proteinů ke zvýšení CD4⁺Foxp3⁺ regulačních T-lymfocytů ve srovnání s nativním OVA. Natrávené

peptidy z tepelně opracovaného OVA indukovaly po 20 minutovém enzymovém působení zvýšené množství regulačních T-lymfocytů, nicméně tato schopnost klesla po 40 minutovém natrávení.

Heat-induced structural changes affect OVA-antigen processing and reduce allergic response in mouse model of food allergy. Goliáš J, Schwarzer M, Wallner M, Kverka M, Kozáková H, Šrůtková D, Klimešová K, Šotkovský P, Palová-Jelínková L, Ferreira F and Tučková L. PLoS One. 2012; 7(5): e37156.

5. DISKUZE

Dnešní výzkum udělal velký pokrok v porozumění pšeničné alergie, ale také objevil problém, které bude potřeba v budoucnu řešit. Důvody, proč vzrůstá počet pacientů s alergiemi, nejsou dostatečně vysvětleny, nicméně se zdá, že velkou roli hrají faktory prostředí jako součást tzv. hygienické hypotézy [Bach, 2002; Schaub et al., 2006]. Rozsáhlá analýza alergenních molekul je časově náročná, proto jsou zapotřebí jednoduché metody separace alergenů. Lepší znalost alergenových molekul pomůže v diagnostice a léčbě potravinových alergií. Naprosto zásadní jsou další studie, které pomohou objasnit klinickou relevanci alergenů jak ve vodě/solných roztocích rozpustných tak nerozpustných v závislosti na věku pacientů, způsobu senzitivace, symptomů a stavu alergenů po vniknutí do organismu.

Proteomická analýza ukázala, že je užitečným nástrojem pro identifikaci potravinových alergenů a pro zvýšení specificity diagnostických testů. Tímto přístupem jsme demonstrovali velké spektrum pšeničných proteinů rozpoznávaných IgE protilátkami ze sér alergických pacientů. Technika 2-DE hraje klíčovou roli v separaci a analýze proteinů v komplexních systémech. Stovky až tisíce proteinů lze separovat na základě IEF v prvním rozměru podle pI každého proteinu a podle molekulové hmotnosti ve druhém rozměru (SDS-PAGE). Proteiny vázající IgE lze následně identifikovat pomocí MALDI-TOF a QTOF hmotnostní spektrometrie. Pomocí tohoto metodologického postupu jsme identifikovali 14 IgE vázajících molekul. Spektrum identifikovaných proteinů bylo doplněno o 5 dalších molekul ze separace na 1-DE identifikace pomocí hmotnostního spektrometru s iontovou pastí. Těmito metodami jsme identifikovali IgE vázající proteiny jako např. již dříve popsané

inhibitory α -amylázy (CM16, CM17 a dimerní 0.19 [Kitta et al., 2006; Weichel et al., 2006], profilin (s velkou sekvenční homologií s pylovým alergenem břízy) [Rihs et al., 1994], a protein Tri a Bd 27K [Yamashita et al., 2002]. Navíc jsme uspěli v identifikaci nových IgE vázajících pšeničných proteinů: β -amyláza, β -D-glukan exohydroláza, serpin, inhibitor α -amylázy/trypsinu CM 3, inhibitor α -amylázy CIII a tři izoformy proteinu 27K.

Vyvinuli jsme novou metodu pro izolaci a purifikaci alergenů z pšeničné mouky, která využívá zařízení Rotofor a HPLC. Rotoforová frakcionace pšeničných proteinů na základě hodnoty pI byla dostatečná pro počáteční purifikaci a lze ji použít pro vzorky s obsahem desítek miligramů proteinů, na rozdíl od 2-DE. Hlavním krokem v purifikaci relativně velkého množství různých ve vodě/solných roztocích rozpustných pšeničných proteinů byla preparativní HPLC s reverzní fází. Purifikované proteiny byly následně separovány pomocí SDS-PAGE a identifikovaná hmotnostní spektrometrií (MALDI-TOF). Tímto přístupem jsme získali 27 IgE vázajících proteinů, mezi kterými byly již dříve popsány inhibitory α -amylázy, lipid transfer protein, peroxidáza, serpiny a β -amyláza [Pastorello et al., 2007; Sotkovsky et al., 2008], ale i několik nových pšeničných proteinů jako např. endogenní inhibitor α -amylázy/subtilizinu, wheatwin, TLP, tritin, XIP, β -glukosidázu, chitinázu třídy II a endochitinázu 26 kDa.

Všechny techniky použité v našich studiích detekovaly zástupce rodiny inhibitorů α -amylázy a potvrdily tyto enzymy jako jeden z hlavních pšeničných alergenů. Nejčastěji rozpoznávaným inhibitorem α -amylázy byl 0.28 a směs CM16 a CM2. Nicméně reakce IgE protilátek s dalšími inhibitory α -amylázy byla také statisticky významná (0.19, dimerní 0.19, CM17, CM3 a endogenní inhibitor α -amylázy/subtilizinu). Ačkoliv nebyl endogenní inhibitor α -amylázy/subtilizinu popsán jako alergen [Tatham, 2008], v naší studii jsme pozorovali reakci tohoto proteinu s IgE protilátkami u 19 z 22 pacientů. Největšího výtěžku purifikace jsme dosáhli u inhibitoru α -amylázy 0.19 [Sotkovsky et al., 2011]. Tento protein byl popsán jako jeden z hlavních alergenů jak u pacientů s pekařským astmatem, tak u těch s potravinovou alergií [Amano et al., 1998; Weichel et al., 2006], nicméně nebyl nikdy izolován a z přírodních zdrojů v dostatečném množství a čistotě. Nejnovější poznatky popisují inhibitor α -amylázy 0.19 a CM3 jako silné aktivátory vrozené imunitní odpovědi zapojením komplexu TLR4–MD2–CD14 [Junker et al., 2012].

Přestože byly inhibitory α -amylázy známy jako alergeny [Kusaba-Nakayama et al., 2001; Zapatero et al., 2003], chyběla kvantitativní studie popisující reakci těchto enzymů s

IgE protilátkami ze sér pacientů. Proto jsme vyvinuli novou metodu ELISA pro detekci a kvantifikaci sIgE proti proteinům pšeničného extraktu (kultivar Sulamit) a komerčně dostupným inhibitorům α -amylázy typ 1 a 3.

Uspěli jsme také v izolaci a purifikaci nových pšeničných alergenů spojených s potravinovou alergií: TLP a wheatwin. TLP izolovaný z pšenice již byl popsán jako alergen u pacientů s respirační alergií (pekařské astma) [Lehto et al., 2010], ale nikoliv u pacientů s potravinovou alergií. Identifikovali a purifikovali jsme také lipid transfer protein, který je také asociován s pekařským astmatem [Lauer et al., 2007]. Navíc jsme purifikovali další nové IgE vázající komponenty, které nebyly dříve identifikovány jako alergeny u potravinové alergie: XIP, chitináza třídy II a endochitináza 26 kDa. XIP byl identifikován pouze u pacientů s pekařským astmatem, avšak nebyl purifikován [Lehto et al., 2010]. Navíc jsme jako první ukázali schopnost inhibitoru α -amylázy, lipid transfer proteinu, TLP a wheatwinu aktivovat pacientské bazofily. Tím jsme ukázali, že námi purifikované proteiny mají biologickou aktivitu a test aktivace bazofilů je užitečným nástrojem v diagnostice [Sotkovsky et al., 2011].

V naší studii s myším modelem potravinové alergie [Golias et al., 2012] jsme ukázali, že nevratné změny v sekundární struktuře OVA po tepelném opracování vedou k aktivaci různých subpopulací T-lymfocytů, mohou vést k Th1 odpovědi a tím snížit alergenicitu tohoto proteinu. V dalších studiích je velmi důležité použít tento model pro ověření hygienické hypotézy s použitím bezmikrobních zvířat a následně je kolonizovat různými kmeny bakterií. Navíc bude tento model užitečný pro testování dalších alergenových komponent identifikovaných z různých přírodních zdrojů.

6. ZÁVĚRY

V dnešní době hraje proteomika důležitou roli v různých vědeckých odvětvích, umožňuje zjišťovat příčiny chorob, napomáhá v cílené léčbě, hodnotí kvalitu potravin atd. Aplikace proteomických technik do studií zabývajících se kvalitou potravin nabírá v posledních letech na síle tím, že rozlišuje potraviny vhodné pro naši výživu. Analýza zabývajících se IgE reaktivními pšeničnými komponentami nám nedává pouze seznam alergenů, ale poskytuje užitečné informace pro další výzkum těchto alergenů ve vztahu např. k léčbě či

terapeutickému vývoji. Inovativní analytické metody a nové aplikace dostupných technik jsou vyžadovány pro celkový pohled na potravinové alergie. Vzhledem k diverzitě přírodních vzorků a fyzikálně-chemickým vlastnostem proteinů nebyly dosud dostatečně popsány postupy přípravy proteinů. Výzkum potravinové alergie a jeho důsledky v klinické praxi závisí na detailnějším poznání alergenových komponent a jejich struktury, což je důležité ve vztahu k reakci protilátek a aktivace efektorových buněk. Toto je zvláště pravdivé u imunoterapie a s ní spojené riziko poškozující reakce jako je anafylaxe [Factor et al., 2012; Kulis et al., 2012]. Navíc zjištění, zdali je senzitivace primární (druhově specifická) anebo je výsledkem křížové reaktivity s proteiny s podobnou strukturou, napomáhá klinikům v posuzování míry rizika reakce s proteiny z různých alergenových zdrojů. Používání alergenových komponent v jejich čisté formě může vyřešit řadu těchto problémů. Hlavním polem působnosti alergenů ať už z přírodních zdrojů anebo rekombinantních je v přesném určení původu alergické reakce [Borres et al., 2011]. Alergenové extrakty budou potřeba v diagnostice neobvyklých alergií, nicméně přístupy založené na přesně definovaných individuálních molekulách (přírodní nebo rekombinantní) vhodně v budoucnu doplní diagnostiku alergií. Proto databáze jako je Allergome, které obsahují dobře charakterizované alergeny, se budou rozvíjet. Informace o fyzikálně-chemických vlastnostech alergenů publikované v těchto databázích umožní vědcům jejich větší produkci a to se stejnou kvalitou. Dostupnost takovýchto informací povede v budoucnu ke zlepšení srovnatelnosti studií používajících purifikované alergeny. Informace o našich příspěvcích k identifikaci alergenů lze právě najít v databázi Allergome. Zejména vysoce kvalitní purifikované potravinové alergeny přispějí ke zlepšení konvenční diagnostiky potravinové alergie, stejně tak nové technologie jako jsou proteinové biočipy. Již brzy se v alergologii stanou tyto přístupy standardními technikami v separaci a identifikaci potravinových alergenů.

7. POUŽITÁ LITERATURA

Akagawa M, Handoyo T, Ishii T, Kumazawa S, Morita N, Suyama K. Proteomic analysis of wheat flour allergens. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 6863–70.

Amano M, Ogawa H, Kojima K, Kamidaira T, Suetsugu S, Yoshihama M et al. Identification of the major allergens in wheat flour responsible for baker's asthma. *Biochem J* 1998; 330: 1229-34.

Armentia A, Sanchez Monge R, et al. In vivo allergenic activities of eleven purified members of a major allergen family from wheat and barley flour. *Clin Exp Allergy* 1993;23(5):410-5

- Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002; 347: 911-20.
- Borres MP, Ebisawa M, Eigenmann PA. Use of allergen components begins a new era in pediatric allergology. *Pediatr Allergy Immunol* 2011; 22(5): 454-61.
- Brunner R, Wallmann J, Szalai K, Karagiannis P, Altmepfen H, et al. Aluminium per se and in the anti-acid drug sucralfate promotes sensitization via the oral route. *Allergy* 2009; 64: 890–897.
- Cianferoni A, Spergel JM. Food allergy: review, classification and diagnosis. *Allergol Int* 2009; 58: 457-66.
- Factor JM, Mendelson L, Lee J, Nouman G, Lester MR. Effect of oral immunotherapy to peanut on food-specific quality of life. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2012; 109(5): 348-352.
- Golias J, Schwarzer M, Wallner M, Kverka M, Kozakova H, Srutkova D, Klimesova K, Sotkovsky P, Palova-Jelinkova L, Ferreira F and Tuckova L. Heat-induced structural changes affect OVA-antigen processing and reduce allergic response in mouse model of food allergy. *PLoS One*. 2012; 7(5): e37156.
- Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004; 4: 3665-85.
- Johansson SGO, Bieber T, Dahl R, Friedmann P, Lanier V, Lockey R, Motala C et al. Revised nomenclature for allergy for global use: report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 832–36.
- Junker Y, Zeissig S, Kim SJ, Barisani D, Wieser H, Leffler DA, Zevallos V, Libermann TA, Dillon S, Freitag TL, Kelly CP, Schuppan D. Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. *J Exp Med* 2012; 17; 209(13): 2395-408.
- James JM, Sixbey JP, Helm RM, Bannon GA, Burks AW. Wheat α -amylase inhibitor: A second route of allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 239-44.
- Jutel M, Jaeger L, Suck R, Meyer H, Fiebig H, Cromwell O. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 608–13.
- van Kampen V, Merget R, Rabstein S, Sander I, Bruening T, Broding HC et al. Comparison of wheat and rye flour solutions for skin prick testing: a multi-centre study (Stad 1). *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 1896-902.
- Kimber I, Dearman RJ, Penninks AH, Knippels LM, Buchanan RB, Hammerberg B, Jackson HA, Helm RM. Assessment of protein allergenicity on the basis of immune reactivity: animal models. *Environ Health Perspect*. 2003 Jun; 111(8): 1125-30.
- Kitta, K., Ohmishi-Kameyama, M., Moriyama, T., Ogawa, T. et al. Detection of low-molecular weight allergens resolved on two-dimensional electrophoresis with acid-urea polyacrylamide gel. *Anal Biochem* 2006; 351: 290–297.
- Kulis M, Wesley Burks A. Oral immunotherapy for food allergy: Clinical and preclinical studies. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012; 22 [Epub ahead of print].
- Kusaba-Nakayama, M., Ki, M., Kawada, E., Sato, M. et al. Intestinal absorbability of wheat allergens, subunits of wheat α -amylase inhibitor, expressed by bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001; 65: 2448-55.
- Lauer I, Miguel-Moncin MS, Abel T, Foetisch K, Hartz C, Fortunato D et al. Identification of a plane pollen lipid transfer protein (Pla a 3) and its immunological relation to the peach lipid transfer protein, Pru p 3. *Clin Exp Allergy* 2007; 37: 261–9.
- Lehto M, Airaksinen L, Puustinen A, Tillander S, Hannula S, Nyman T et al. Thaumatin-like protein and baker's respiratory allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010; 104: 139-46.
- Ostblom E, Lilja G, Pershagen G, van Hage M, Wickman M. Phenotypes of food hypersensitivity and development of allergic diseases during the first 8 years of life. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 1325-32.
- Palacin A, Quirce S, Armentia A, Fernandez-Nieto M, Pacios LF, Asensio T et al. Wheat lipid transfer protein is a major allergen associated with baker's asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 1132–8.
- Pali-Scholl I, Herzog R, Wallmann J, Szalai K, Brunner R, et al. Antacids and dietary supplements with an influence on the gastric pH increase the risk for food sensitization. *Clin Exp Allergy* 2010; 40: 1091–1098.
- Palosuo K. Update on wheat hypersensitivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003; 3: 205–9.
- Pastorello EA, Farioli L, Conti A, Pravettoni V, Bonomi S, Iametti S et al. Wheat IgE-mediated food allergy in European patients: α -amylase inhibitors, lipid transfer proteins and low molecular weight glutenins. Allergenic molecules recognized by double-blind, placebo-controlled food challenge. *Int Arch Allergy Immunol* 2007; 144: 10–22.

- Poole JA, Barriga K, Leung DYM, Hoffman M, Eisenbarth GS, Rewers M et al. Timing of initial exposure to cereal grains and the risk of wheat allergy. *Pediatrics* 2006; 117: 2175-82.
- Ramesh S. Food allergy overview in children. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008; 34: 217–30.
- Rihs HP, Rozynek P, May-Taube K, Welticke B et al. Polymerase chain reaction based cDNA cloning of wheat profilin: A potential plant allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 105: 190–4.
- Sampson HA. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103(5 part 1):717-28.
- Sampson HA: Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 891–6.
- Sampson HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: S540-7.
- Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PH, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Rostami K, Sanders DS, Schumann M, Ullrich R, Villalta D, Volta U, Catassi C, Fasano A. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med* 2012; 7: 10:13.
- Schaub B, Lauener R, von Mutius E. The many faces of the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 969-77.
- Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Annu Rev Med* 2009; 60: 261-77.
- Sotkovsky P, Hubalek M, Hernychova L, Novak P, Havranova M, Setinova I et al. Proteomic analysis of wheat proteins recognized by IgE antibodies of allergic patients. *Proteomics* 2008; 8: 1677-91.
- Sotkovsky P, Sklenar J, Halada P, Cinova J, Setinova I, Kainarova A, Golias J, Pavlaskova K, Honzova S, Tuckova L. A new approach to the isolation and characterization of wheat flour allergens. *Clin Exp Allergy* 2011; 41(7): 1031-43.
- Tatham AS, Shewry PR. Allergens in wheat and related cereals. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 1712-26.
- Tokuda R, Nagao M, Hiraguchi Y, Hosoki K, Matsuda T, Kuono K et al. Antigen-induced expression of CD203c on basophils predicts IgE-mediated wheat allergy. *Allergol Int* 2009; 58:193-9.
- Tordesillas L, Pacios LF, Palacin A, Quirce S, Armentia A, Barber D et al. Molecular basis of allergen cross-reactivity: Non-specific lipid transfer proteins from wheat flour and peach fruit as models. *Mol Immunol* 2009; 47: 534-40.
- van der Ventel ML, Nieuwenhuizen NE, KIRSTEIN F, HIKUAM C, JEEBHAY MF, et al. Differential responses to natural and recombinant allergens in a murine model of fish allergy. *Mol Immunol* 2011; 48: 637-46.
- Weichel M, Vergoossen NJ, Bonomi S, Scibilia J, Ortolani C, Ballmer-Weber BK et al. Screening the allergenic repertoires of wheat and maize with sera from double-blind, placebo-controlled food challenge positive patients. *Allergy* 2006; 61:128–35.
- Yamashita H, Nanba Y, Onishi M, Kimoto M. et al. Identification of a wheat allergen, Tri a BD 36K, as a peroxidase. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002; 66: 2487–90.
- Zapatero M, Martínez MI, Alonso E, Salcedo G et al. Oral wheat flour anaphylaxis related to wheat α -amylase inhibitor subunits CM3 and CM16. *Allergy* 2003; 58: 956.
- Zicari AM, Indinnimeo L, De Castro G, Zappalà D, Tancredi G, Bonci E, Celani C, Duse M. Food allergy and the development of asthma symptoms. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2012; 25(3): 731-40.

8. PUBLIKACE

Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace:

Šotkovský P, Hubálek M, Hernychová L, Novák P, Havranová M, Šetinová I, Kitanovičová A, Fuchs M, Stulík J and Tučková L. Proteomic analysis of wheat proteins recognized by IgE antibodies of allergic patients. *Proteomics* 2008; 8: 1677-91.

IF= 4,505

Šotkovský P, Sklenář J, Halada P, Cínová J, Šetinová I, Kainarová A, Goliáš J, Havlásková K, Honzová S and Tučková L. A new approach to the isolation and characterization of wheat flour allergens. *Clin Exp Allergy* 2011; 41(7): 1031-43

IF= 5,030

Goliáš J, Schwarzer M, Wallner M, Kverka M, Kozáková H, Šrůtková D, Klimešová K, **Šotkovský P**, Palová-Jelínková L, Ferreira F and Tučková L. Minor heat-induced structural changes affect OVA-antigen processing and reduce allergic response in mouse model of food allergy. *PLoS One*. 2012; 7(5): e37156.

IF= 4,090