



UPPSALA
UNIVERSITET

Albuminer, Globuliner och ω_5 -gliadiner, de mest IgE-bindande proteinerna och orsaken till veteallergi



Emma Thorén

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2014
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammandrag

Veteallergi är ett stort problem världen över och orsakas av att immunoglobulin E-antikroppar från kroppens försvar, binder in till de vanligtvis ofarliga glutenproteinerna i vete. Detta immunsvaret kan resultera i en mängd olika symtom, där anafylaktisk chock är bland de allvarligaste och kan vara direkt livshotande. Gluten består av en mängd olika proteiner med olika egenskaper och det har visats att vissa av dessa proteiner är kraftigare allergener än andra. Olika proteingrupper har även kunnat kopplas till olika symtom. De vatten- och saltlösliga albumin- och globulinproteinerna har visats vara kraftiga allergener hos individer med atopiskt eksem och ω_5 -gliadiner en kraftig allergen hos individer med anafylaxi eller nässelutslag, i samband med en allergisk reaktion från vete. HMW-gluteniner har däremot inte visats vara en strak allergen, men är bland de viktigaste för att ge vete sina sammanhållande egenskaper i bakning. Forskning pågår om hur och i vilken utsträckning glutenproteinerna orsakar allergi, något vi behöver en ökad kunskap om för att bättre tackla problemet med veteallergi. Identifieringen av sambandet mellan ω_5 -gliadiner och anafylaxi har bidragit till forskning där man försöker få bort denna proteintyp helt i vete och detta resulterade i ett vete med 30 % minskad reaktion till IgE-antikroppar och ökade bakegenskaper. Dessa positiva resultat lägger en bra grund för ett nytt möjligt forskningsområde som kan hjälpa till att underlätta livet för veteallergiker världen över.

Inledning

Vete började odlas för omkring 10 000 år sedan och är idag ett av de tre mest odlade sädeslagen världen över. Ända sedan vetet blev en del av jordbruket har det förädlats och idag finns över 25 000 olika typer av vanligt vete (*Triticum aestivum*) som är anpassade till olika klimat. Vete utgör även en avgörande del av basfödan för miljoner människor världen över. Veteallergi är en av de åtta stora matallergierna och är ett stort problem eftersom vete är en viktig och välanvänd råvara (Shewry 2009).

Veteallergi kan uttryckas i en mängd olika symtom vissa allvarligare än andra. Några vanliga symtom är eksem, astma och anafylaxi och med vilken styrka symtomen uttrycks är individuellt. De allergiska symtomen kan uppstå enskilt eller i kombination (Sicherer 2000). Det allvarligaste är om en reaktion på vete leder till en anafylaktisk chock. Individen får då en kombination av astma och blodtrycksfall vilket kan vara dödligt om det inte behandlas omgående.

Orsaken bakom veteallergi är att immunoglobulin E antikroppar (IgE-antikroppar) från kroppens försvar, binder in till olika komponenter av proteingruppen gluten som finns i vete (Battais 2005, Matsuo 2005). Gluten kan delas in i minst nio olika grupper av proteiner beroende på storlek och löslighet (Larré *et al.* 2011, Wieser 2007, Shewry *et al.* 1986). En ökad förståelse om hur och till vilka proteiner IgE-antikroppar tenderar att binda in, är användbart inom många allergirelaterade forskningsområden. Det har bland annat använts i försök att förädla fram vetetyper utan de mest allergiframkallande proteinerna, men som behåller sina bakegenskaper (Wang och Skoczowski 2014). Ett sådant vete är något som skulle vara andvändbart då gluten är den komponent som till stor del ger vetemjöl dess bakegenskaper och ett vetemjöl utan enbart de mest allergiframkallande proteinerna skulle kunna vara ett alternativ till de helt glutenfria alternativen.

Syftet med den här uppsatsen är att koppla samman olika veteallergirelaterade symtom med olika glutenproteinkomponenter och i vilka andra forskningsområden den kunskapen kan vara hjälpsam.

Frågeställningen bakom den här uppsatsen är:

- Vilka glutenproteinkomponenter är mest reagent med immunoglobulin E antikroppar?

För att få svar på detta kommer följande saker undersökas:

- Vilka proteiner som ingår i gluten.
- Glutenallergi och vilka symtom den ger.
- Vilka proteiner som kan kopplas till dessa symtom.
- Slutligen om man genom växtförädling kan få fram ett vete som saknar de mest allergiframkallande proteinerna.

Gluten och gluteninducerade allergier

Den största delen av vetets proteininnehåll utgörs av glutenproteiner och det är glutenets olika komponenter som till stor del styr degens egenskaper (Wieser 2007, Shewery 2009). Gluten kan även för vissa vara ett kraftigt allergiframkallande ämne som kan ge symtom både genom inandning, förtäring eller hudkontakt. Många förväxlar ofta veteallergi med glutenintolerans men det är två skilda veterelaterade åkommor. Veteallergi innebär att kroppens immunoglobulin E-antikroppar binder in till proteinerna från vetet vilket kan resultera i en mängd olika symtom. Glutenintolerans beror på att immunförsvarets T celler attackerar glutenproteinerna när de kommer till tunntarmen, vilket resulterar i utsöndring inflammatoriska cytokininer som plattar ut och förstör tunntarmens epitelceller (Shewry 2009).

Immunoglobulin E inducerade allergier.

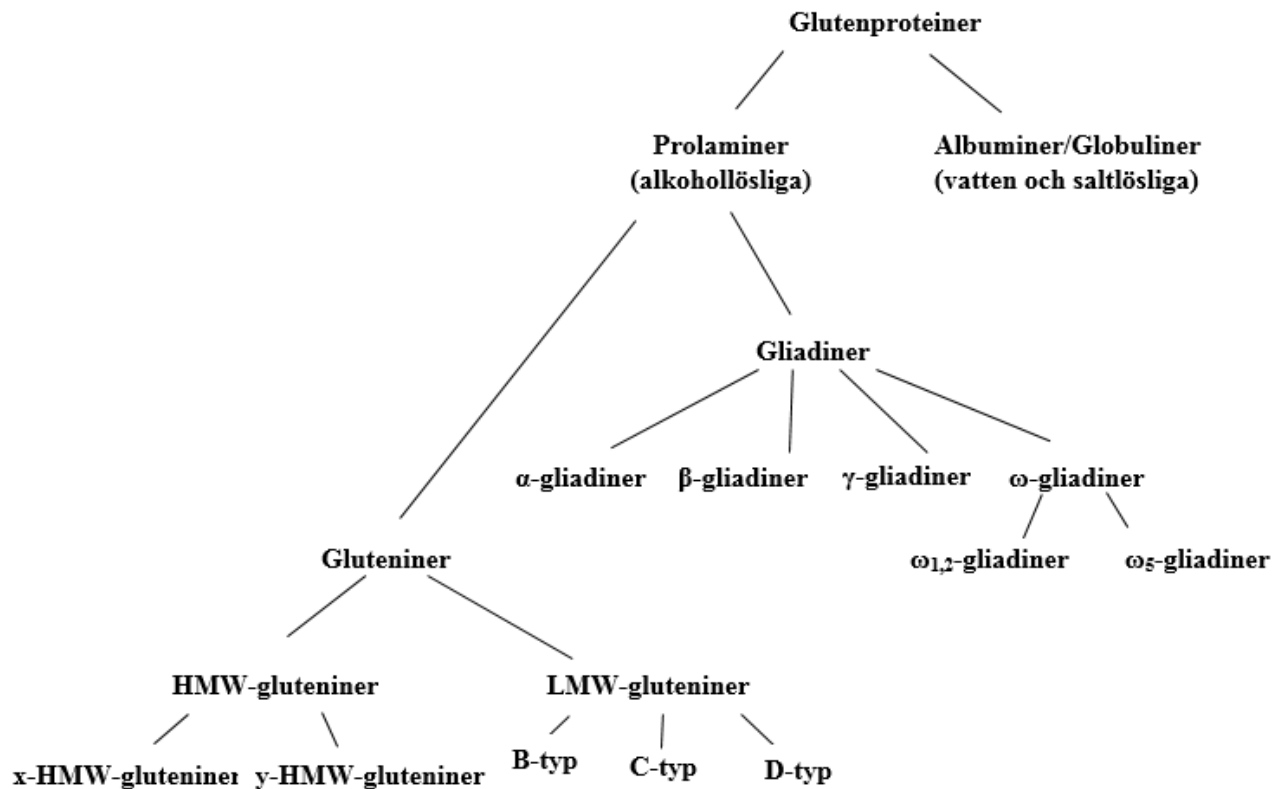
En allergisk reaktion kan delas in i fyra olika klasser (klass I, II, III och IV) beroende på hur kraftig immunförsvaret reagerar, där I är en svag reaktion och IV en kraftig reaktion (Żukiewicz-Sobczak *et al.* 2013). IgE-inducerad veteallergi är vanligast att få redan som litet barn och det växer ofta bort när barnet blir äldre (Keet *et al.* 2009). Keet *et al.* (2009) visade att det finns ett samband mellan patientens IgE-antikroppstopp (tidpunkten i individens liv när den har som mest IgE-antikroppar) och sannolikheten att den kommer bli tolerant mot gluten senare i livet. Individer med ett lågt antal IgE-antikroppar vid denna topp har större sannolikhet att bli tolerant tidigare i livet än en individ med ett högt antal IgE-antikroppar.

Precis som de flesta matallergierna är veteallergi inducerad av immunoglobulin E-antikroppar (IgE-antikroppar) och är inte en sjukdom som orsakas av en specifik allergen och uttrycks med liknande klassiska symtom hos de som drabbas. Veteallergi kan uttryckas i många olika organ och ge en mängd olika symtom och framförallt kan symtomen skilja mycket mellan olika individer med veteallergi (Sicherer 2000). De organ som vanligen drabbas är huden, mag- och tarmkanalen och luftvägarna (Inomata 2009). De vanligaste hudrelaterade åkommorna är atopiskt eksem, angioödem och nässelutslag. Astma och allergisk rinit är vanliga luftvägsrelaterade åkommor och anafylaxi är en inte helt ovanlig men en av de mest livshotade åkommorna (Sicherer 2000). Dessa sjukdomar uttrycker sig på väldigt olika sätt. Eksem är en sjukdom som ger torr och kliande hud och atopisk innebär att den är kopplad till IgE-antikroppar samt att den till stor del är ärftlig. Angioödem är en sjukdom som ger kraftig svullnad vanligast i ansiktet och runt könsorganen. Nässelutslag (urticaria) ger rodnande upphöjda svullnader på huden som liknar de som uppstår när man bränt sig på brännässlor. Astmans vanligaste symtom är andningssvårigheter orsakad av en förträngning i lungornas bronker. Allergisk rinit (allergisk snuva) orsakar snuva och nysningar. Anafylaxi klassas som generell överkänslighet med en snabb reaktion. En anafylaktisk reaktion kan ha olika svårighetsgrad och symtomen kan variera från hudrodnad, klåda, svullnad och andnöd. I

värsta fall kan det resultera i en anafylaktisk chock (kraftigast form av anafylaktiska reaktion) som är en kombination av astma och blodtrycksfall och det kan vara livshotande. Dessa definitioner av symtomen är av svensk sjukdom allmänt vedertagna (Nationalencyklopedin som angivits under respektive uppslagsord). Veteberoende-träningsinducerad anafylaxi (WDEIA från engelskans wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis) är en typ av anafylaktisk sjukdom som skiljer sig från de andra symtomen tidigare nämnda. En individ med WDEIA kan i viss mån äta vete utan att få någon allergisk reaktion om individen inte utför fysiskt arbete efteråt. Men kombinationen av fysiskt arbete efter förtäring av kost innehållande vete kan leda till så allvarliga symtom som anafylaktisk chock (Inomata 2009).

Glutenproteinets olika komponenter

Vetets olika komponenter är något som studerats i över 250 år och den första beskrivningen av glutenextraktion beskrevs av Beccar år 1745 återgivet i Shewry & Halford (2002) och Shewry *et al.* (1986). Men den som ordentligt började dela in glutenproteiner i olika grupper var Osborne (1859-1929) och han kallas ofta fadern till växtproteiners kemi (Shewry & Halford 2002, Shewry *et al.* 1986). Osborne delade in proteinerna i grupper efter deras förmåga att lösa sig i olika ämnen. Klasserna som han etablerade används till stor del även idag men de har förändrats till viss del när kunskapen om proteinerna ökat. Osbornes klassifikation delar in Glutenproteinerna i vattenlösliga (albuminer), saltlösliga (globuliner), alkohollösliga (prolaminer) och syra/alkalilösliga (glutelinier). Prolaminerna delades senare in i två grupper av gliadiner och gluteniner och där nu även proteinerna från den tidigare gruppen glutelinier ingår (Figur 1) (Shewry *et al.* 1986).



Figur 1. Klassfördelning av glutenproteiner.

Albuminer och globuliner

Albuminer och globuliner slås ofta ihop till en grupp av vatten-, saltlösliga proteiner (Figur 1). Genom en 2D gelelektrofores kan albumin- och globulin separeras till en mängd olika proteiner som är dåligt beskrivna och kategoriserade (Larré *et al.* 2011, Merlino *et al.* 2009).

Gliadiner

Woychik *et al.* (1960) klassificerade in prolaminerna i klasserna α -, β -, γ - och ω -gliadiner och den klassificeringen har behållits sedan dess. Woychik *et al.* (1960) gjorde detta genom att separera dem med gelelektrofores i avseende på storlek och fann då ett antal snabbgående band (α -, β - och γ -gliadin) och ett långsamtgående band (ω -gliadin). Idag slår man ibland samman α - och β -gliadinerna till en gemensam grupp (α/β -typ) och ω -gliadinerna har delats in i två undergrupper ($\omega_{1,2}$ - och ω_5 -gliadiner) (Figur 1) (Wieser 2007). Gluteiner är monomerer och karakteriseras av att de till största del består av glutamin, prolin och fenylalanin. α -, β - och γ -gliadin gliadinerna innehåller även en del cystein vilket medför att de klassas som svavelrika medan ω -gliadin nästan helt saknar cystein och kategoriseras med de svavelfattiga proteinerna (Shewry & Halford 2002).

Gluteniner

Med hjälp av natriumlaurylsulfat-polyakrylamidgelelektrofores (SDS-page) delas gluteninerna in i två olika grupper. En för proteiner med hög molekylvikt (60 000-136 000) kallad HMW-gluteniner (från engelskans high molecular weight) och en för proteiner med låg molekylvikt (~44 000) kallad LMW-gluteniner (från engelskans low molecular weight). Gluteiners subenheter bildar polymerer som kan ha en molekylvikt på flera miljoner (Shewry *et al.* 1986). HMW-gluteniner utgör ca 10 % av glutenproteinerna och delas ibland in i x- och y-HMW- gluteninkomponenter (Figur 1). Dessa skiljs åt i struktur och aminosyrasammansättningen och genom deras molekylära vikt där xHMW-gluteiner är de

större (vanligen 83 000-88 000) och γ -HMW-gluteiner är de mindre (vanligen 67 000-74 000) (Shewry *et al.* 1986). HMW-gluteninens aminosyrasekvens kan delas in i tre huvuddelar, N-änden innehållande mestadels α -helixar och innehåller tre cystein, en lång mittbit som utgörs av mestadels korta repetitiva sekvenser och β -flak och en kortare C-ände med en cystein och mestadels α -helixar. x- och y-HMW-gluteninerna är mycket lika men y-HMW-gluteniner har en längre N-ände och enbart två olika repetitiva sekvenser i mittpartiet medan x-HMW-gliadiner har tre (Shewry *et al.* 1992).

LMW-Gluteniner kan delas in i B-, C- och D-typer (Figur1). Den främsta skillnaden mellan dessa grupper är molekylvikten. D-typen har störst molekylvikt och gränsar till HMW-gluteninerna, B-typen näst högs och C-typen lägst. Kemiskt är LMW-gluteninerna mer lika gliadinerna än HMW-gluteninerna men placerades antagligen in i gluteningruppen på grund av sin höga molekylvikt och att de innehåller mer cystein än gliadinerna (D'Ovidio & Masci 2004). B- och C-typen innehåller 2-3% cystein vilket medför att man klasser dom som svavelrika en viktig egenskap för proteinets struktur och förmåga att bilda till andra proteiner. D-typen är däremot cysteinfattig (Shewry & Halford 2002). C- och D-typen och i viss mån B-typen av LMW-gluteniner har visats vara α -, β - och ω -gliadiner som har förmågan att bilda polymerer och kallas därför ibland modifierade gliadiner, gliadinlika eller α -, β - och ω -gluteiner (D'Ovidio & Masci 2004).

Proteinkomponenters inverkan på bakegenskaper.

Att vetemjöls proteininnehåll påverkar dess bakegenskaper är sedan länge känt. Barak *et al.* publicerade (2013) ett försök med att mäta bakegenskaper på mjöl från 15 olika vetesorter med olika proteininnehåll. De mätte mjölsorternas vattenabsorbans, tiden det tog för mjölet att bilda deg, stabilitet och mjukhet. Därefter gjorde de nudlar av degen som kokades och sedan uppmättes hårdhet, vidhäftningsförmåga, elasticitet och sammanhållningsförmåga. Därefter gjorde de analysvarians-test (ANOVA) för att se om de kunde hitta ett samband mellan dessa bakegenskaper och proteinsammansättningen. De kunde med signifikans visa att nudlarnas hårdhet och sammanhållningsförmåga påverkas av mängden glutenin. Även en viss positiv korrelation kunde visas för dessa egenskaper och mängden gliadiner men ingen signifikans kunde påvisas. Gluteniner verkar enligt Baraks *et al.* (2013) försök ha den största inverkan på degens bakegenskaper något som stämmer överens med tidigare studier (Shewry 2009)

IgE-bindande glutenproteinkomponenter

Att veteallergi orsakas av ett immunsvaret av IgE-antikroppar som binder in till proteinkomponenter är sedan länge känt. Men det är ännu oklart i vilken utsträckning och till vilka proteinkomponenter IgE-antikropparna binder in. Detta är ett område som det forskas mycket om (Battais *et al.* 2005a, Matsuo *et al.* 2005).

Vilka proteinkomponenter framkallar allergiska symtom?

Många studier har gjorts där man försöker koppla samman vilka proteiner som binder in mest IgE-antikroppar och vilka symtom de ger. Två av de största gjordes av Battais *et al.* (2003, 2005a). Battais *et al.* publicerade 2003 en artikel där de beskrev ett försök med serum med både IgE och IgG antikroppar från 28 patienter med olika symtom av vete allergi. De extraherade åtta komponenter av glutenprotein (albuminer, globuliner, HMW gluteniner, LMW gluteniner samt α -, β -, γ - och ω -proteiner) och använde Immunoblotting (IB), Enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) och Radioallergosorbent-test (RAST) för att testa vilka av proteinerna som antikropparna band in till. Studien gjorde ingen skillnad på

patienterna i frågan om ålder, kön eller symtom. Andelen individer med proteinbindande antikroppar är sammanställd i tabell 1.

Tabell 1. Andelen individer (%) med proteinbindande antikroppar i tre olika test. De inkluderade testen är Immunoblotting (IB), Enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) och Radioallergosorbent-test (RAST) Data är bearbetad från resultaten ur Battais *et al.* (2003).

Test	HMW glutenin (%)	LMW glutenin (%)	α -gliadin (%)	β -gliadin (%)	γ -gliadin (%)	ω -gliadiner (%)		Albumin/ globulin (%)
						Snabba ω -gliadin (%)	Långsamma ω -gliadin (%)	
Patienter:								
IgE								
RAST ¹	26	60	60	60	55	48		ND
IB ²	15	52	27	20	27	20	0	67
IgG								
ELISA ³	16	40	64	64	36	32		ND
Kontroller:								
IgE								
RAST ⁴	0	0	0	0	0	0		0
IB ⁵	0	0	0	0	0			0
IgG								
ELISA ⁶	0	11	16	16	0	0		0

¹n=27; ²n=27; ³n=25; ⁴n=23; ⁵n=23; ⁶n=19

Under RAST testet delades även proteinkomponenterna in i klasser 1-6 beroende på mängden antikroppar som band in till proteinerna där 1 är svag reaktion med få antikroppar och 6 är en kraftig reaktion med många antikroppar. Gliadinerna och LMW-gluteniner hamnade i klasserna 3-6 och HMW-gluteniner i klasser 2-3. Resultaten från dessa tester visade att den enda komponentgrupp som enbart svagt band in IgE antikroppar från patienterna med glutenallergi var HMW-gluteniner. Alla de andra grupperna gav en tydlig reaktion på serumen och antas därför vara kraftigt allergener. IgG-antikropparna gav liknande resultat som IgE-antikroppar och antas därför reagera på ungefär samma sätt hos personer med veteallergi. Dock visade det sig att IgG-antikroppar även kunde binda in till vissa prolaminer i serum från kontrollpersoner utan glutenallergi men med en mycket lägre procentsats. Utförligare studier krävs för att säkerställa IgG-antikropparnas roll hos personer med vete allergi.

Eftersom ingen proteinkomponentgrupp tydligt kunde kopplas till glutenallergin gjorde Battais *et al.* (2005a) en mer utförlig studie för att öka kunskapen om detta område. Den här gången utökades testgruppen till 60 personer med olika symtom av veteallergi. Försöket gick ut på att testa uppsättningen IgE-antikroppar som binder in till proteinkomponenter hos personer av olika åldrar och med olika symtom. Därefter gjordes statistiska tester (ANOVA, χ^2 -test) för att se om de kunde hitta samband mellan proteinkomponentklass, ålder och symtom. Även antalet proteingrupper som extraherades utökades med $\omega_{1,2}$ - och ω_5 -gliadiner och lipid-transport proteiner (LTPs). LTPs är en del av albumin/globelin-proteinerna (Larré *et al.* 2011, Merlino *et al.* 2009). Den här gången användes enbart Fluorimetrisk enzymkopplad immunadsorberande analys (F-ELISA) för att bestämma vilka proteiner som är antikroppsbindande. Andelen individer med proteinbindande IgE-antikroppar för barn, vuxna och de olika symtomen är sammanställt i tabell 2.

Tabell 2. Andelen individer (%) med proteinbindande antikroppar med hänsyn på ålder (barn och vuxna) och symtom (anafylaxi, nässelutslag, atopiskt eksem och astma). Data är bearbetad från resultaten ur Battais *et al.* (2005a).

Proteinkomponenter:	60 serum (%)	31 barn (%)	29 vuxna (%)	Anafylaxi (%)	Nässelutslag (%)	Atopiskt Eksem (%)	Atopiskt eksem + astma (%)
Övergripande Albuminer/ Globuliner ^{1,2}	90	87	93	100	91	85	92
LTP	28	35	21	33	18	31	33
Prolaminer	67	55	79	100	82	57	42
α -gliadiner ¹	23	39	7	22	0	35	25
β -gliadiner ¹	18	29	7	22	9	19	25
γ -gliadiner ¹	13	23	3	11	9	19	8
ω_5 -gliadiner ²	37	26	48	100	55	23	8
$\omega_{1,2}$ -gliadiner	22	29	14	22	27	23	16
LMW gluteniner	30	29	31	67	27	23	25
HMW gluteniner	28	26	31	33	18	27	25

¹ 95% signifikans mellan ålder och frekvensen proteinbindande antikroppar kunde påvisas med χ^2 -test

² 95% signifikant mellan symtom och frekvensen proteinbindande antikroppar påvisades med χ^2 -test

21 personer utan veteallergi användes som kontroller och ingen av dessa påvisade antikroppar mot de olika glutenproteinkomponenterna. En skillnad i antikroppar mot olika proteinkomponenter kunde påvisas mellan vuxna och barn. Signifikans med ett 95 % konfidensintervall mellan albuminer/globuliner, α -gliadiner, β -gliadiner och γ -gliadiner och ålder kunde påvisas (tabell 2). Barn hade en högre frekvens antikroppar mot albuminer/globuliner än vuxna (barn 84 %, vuxna 59 %). Barnen hade även ett jämnare spann för antikroppar mot olika prolaminer (23-29 %, med undantag av α -gliadiner med 39 %) medan de vuxna visade låg frekvens för alla prolaminer utan ω_5 -gliadiner. Även en skillnad mellan symtom och frekvensen antikroppar som band in till de olika proteinerna och med en signifikans på 95 % för albuminer och globuliner samt för ω_5 -gliadiner. Mest utmärkande var att 100 % av serumet från patienter med anafylaxi har IgE-antikroppar mot ω_5 -gliadiner. Även LMW gluteniner (67 %) och albuminer/globuliner (56 %) hade en stark korrelation till IgE-antikroppar från patienter med anafylaxi. Patienter med nässelutslag hade liknande IgE-antikroppar som de med anafylaxi men med svagare korrelation. Serum från patienter med Atopiskt eksem eller atopiskt eksem plus astma hade liknande IgE-antikroppar men skilde sig från de med anafylaxi eller nässelutslag. För de med atopiskt eksem (med eller utan astma) är högsta korrelationen med albuminer/globuliner (85 %, 92 %).

ANOVA gjordes på alla patienter för att se vilka serum som hade positiv korrelation till de olika proteinkomponenterna. Frekvensen av patienter med positiv korrelation är sammanställt i tabell 3.

Tabell 3. Frekvensen av serum med positiv korrelation till olika proteinkomponenter beräknat med ANOVA. Data är bearbetad från resultaten ur Battais *et al.* (2005a).

Symtom	α -gliadin (%)	β -gliadin (%)	γ -gliadin (%)	ω_5 -gliadin (%)	$\omega_{1,2}$ -gliadin (%)	LMW glutenin (%)	HMW glutenin (%)	LTP (%)	Albumin /globulin (%)
Anafylaxi	22	22	11	100	22	54	27	27	45
Nässelutslag	0	9	9	55	27	27	18	18	45
Atopiskt eksem	35	19	19	23	23	19	27	31	81
Atopiskt eksem + astma	25	25	8	8	16	25	25	33	92

Resultaten i tabell 3 stämmer överrens med värdena från tabell 2. Alla serum från patienter med anafylaxi hade positiv korrelation med ω_5 -gliadiner (100 %) och hälften med LMW gluteiner. Albuminer/globuliner har hög korrelation i alla grupper men särskilt för serum från patienter med atopiskt eksem eller atopiskt eksem och astma (81 %, 92 %). Så slutligtvis med dessa experiment kunde Battais *et al.* (2005a) påvisa ett samband mellan IgE-antikroppar och olika proteiner och de har lyckats hitta proteinkomponenter som är kraftiga allergener för olika glutenallergirelaterade symtom. De visar även att ålder kan påverka vilka IgE-antikroppar patienterna har men för att säkerställa detta behövs utförligare studier då symtomen skilde mycket mellan åldrarna. Av de 31 barn som testades led 30 av den av atopiskt eksem eller kombinerat atopiskt eksem och astma och enbart ett av barnen hade upplevt anafylaxi. Hos de 29 vuxna var fördelningen helt annorlunda, 11 leda av nässelutslag, 8 av anafylaxi, 8 av atopiskt eksem/kombinerat atopiskt eksem och astma samt 2 med andningsrelaterade symtom. Symtomgrupp med atopiskt eksem eller kombinerat atopiskt eksem och astma var alltså starkt överrepresenterad av barn och grupperna med anafylaxi och nässelutslag av vuxna.

Andra studier motsäger att barn skulle vara mindre känsliga för ω_5 -gliadiner. Daengsuwan *et al.* (2004) testade sju barn (6 månader-13 år) med anafylaxi samt tidigare erfarit anafylaktisk chock och kunde identifiera IgE-antikroppar mot ω_5 -gliadiner i samtliga sju individer. Palosuo *et al.* (2001) visade att ω_5 -gliadiner är en kraftig allergen även hos barn genom att jämföra reaktionen hos 40 barn i ett bubbelblint födotest, där barnen utsattes för kost innehållande vete, och mängden ω_5 -gliadinbindande IgE-antikroppar individen hade. 84 % av barnen som visade direkta symtom vid det dubbelblinda födotestet hade IgE-antikroppar som reagerade på ω_5 -gliadiner. Inga antikroppar kunde hittas hos barn med fördröjda eller avsaknad av symtom i födotestet. Barnen med direkt reaktion på kosten med vete uppvisade en mängd olika symtom där av hudrodnad som nässelutslag, andningsbesvär och buksymtom. Båda dessa studier stärker hypotesen att skillnaden mellan ålder i Battais *et al.* (2005a) försök till stor del berodde på den ojämna uppdelningen i symtom mellan åldersklasserna. Palosuo *et al.* (2001) visar också ett samband mellan ω_5 -gliadiner och hur kraftiga allergiska symtom individer uttrycker då IgE-antikroppar enbart kunde identifieras hos individerna med direkta symtom.

IgE-bindande epitoper

Glutenepitoper, som andra epitoper, är sekvenser på främmande ämnen (antigener) som antikroppar binder in till. I proteiner som glutenproteinerna består epitoper vanligtvis av en aminosyrasekvens av 3-7 aminosyror (Björn *et al.* 2005). En ökad kunskap om IgE-bindande epitoper i glutenproteiner kan vara till stor hjälp i förståelsen om hur glutenallergi fungerar på en molekylär nivå. Battais *et al.* (2005b) publicerade den första studien med målet att identifiera IgE-epitoper i ett flertal glutenproteiner från patienter i olika åldrar med en mängd olika symtom. En mängd olika peptidsekvenser identifierades både som var unika för individer och som återfanns hos flera. Dessa sekvenser var omkring 10 aminosyror långa. I dessa 10 aminosyror var det vanligast att några få aminosyror på kanterna av sekvensen skildes åt medan aminosyrorna i mitten var konsekventa och utgjorde ett segment. Dessa segment var 6-7 aminosyror långa och blev klassade som positiva epitoper för IgE-antikroppar. Detta på grund utav att det återkom ofta hos flera av individerna. Totalt 12 återkommande repetitiva sekvenser hittades i de olika gliadinerna som kunde identifieras som positiva epitoper för IgE-bindande proteiner. Dessa är sammanställda i tabell 4.

Tabell 4. Återkommande sekvenser i identifierade IgE-bindande epitoper. Data bearbetad från resultaten publicerade av Battais *et al.* (2005b) och Matsuo *et al.* (2006).

$\alpha\beta$ -gliadiner	γ -gliadiner	ω_2 -gliadiner	ω_5 - gliadiner
QQFPGQQ ¹	QQQLPQ ¹	QQPIPQQ ¹	QQLPQQQ ^{1,2}
	QQLVPQ ¹	QQPIPQQ ¹	QQFPQQQ ^{1,2}
	QQSFPQ ¹	QQPTPIQ ¹	QQSPEQQ ^{1,2}
		QQPEPQQ ¹	QQIPQQ ^{1,2}
			QQPPQQ ²
			YQQYPQQ ²
			QSPEQQQ ²
			QQFHQQ ²

¹ Epitopsekvenser identifierade av Battais *et al.* (2005b)

² Epitoper identifierade av Matsuo *et al.* (2006), sekvenserna enbart identifierade i ω_5 -gliadiner

I Battais *et al.* (2005b) studie användes 11 patienter varav 6 barn (5 med atopiskt eksem och 1 med anafylaktisk chock) och 5 vuxna (2 med nässelutslag och 3 med Veteberoende-träningsinducerad anafylaxi). Den vuxna individen med nässelutslag var enbart allergisk mot deamiderat gliadin (saknar en amingrupp). Fyra kontrollpersoner påvisade ingen reaktion på IgE-antikroppar. Fyra av de fem barnen med atopiskt eksem kunde inga epitopsekvenser identifieras men för den sista kunde fem epitopsekvenser identifieras i $\alpha\beta$ -gliadinerna och en i γ -gliadinerna. De fyra vuxna patienterna med nässelutslag eller WDEIA (inte medräknat individen enbart allergisk mot deamiderat gliadin) samt barnet med anafylaktisk chock uppvisade ett stort antal av epitopsekvenser som återkom upprepade gånger på flera fragment av ω_5 -gliadinerna. Fem återkommande överlappande sekvenser hos dessa epitoper kunde identifieras (Tabell 4) Fyra av dessa fem individer visade även ett antal epitoper hos $\alpha\beta$ -gliadinerna och i dessa kunde en överlappande sekvens identifieras (Tabell 4). Även en mängd epitoper hittades i ω_2 -gliadiner och γ -gliadiner. Dessa resultat stöder resultaten i Battais *et al.* (2005a) studie att ω_5 -gliadinerna är de största antigenerna hos individer med anafylaxi och nässelutslag eftersom flest epitoper kunde identifieras i ω_5 -gliadinerna för dessa individer. Även att gliadiner överlag inte är kraftiga allergener hos individer med atopiskt eksem då inga epitoper kunde hittas i fyra av fem fall stämmer överens med resultaten i Battais *et al.* (2005b) studie. Matsuo *et al.* (2005) utökade Battais *et al.* (2005b) studie med tre individer med WDEIA och lyckades inte bara stärka resultaten från Battais *et al.* (2005b) genom att bekräfta de 4 epitoper som raden hittats för ω_5 -gliadinerna utan även identifiera 4 nya IgE-bindande epitoper (Tabell 4)

Utveckling av mindre allergiframkallande matvete

Eftersom det har visats att vissa proteinkomponenter är mer allergiframkallande än andra (Battais *et al.* 2003, Battais *et al.* 2005b) kan det vara en fördel att minska mängden av dessa proteiner i matvete. Detta är något som har gjorts med olika tekniker, för några exempel se Wang & Skoczowski (2014), Gil-Humanes *et al.* (2008) och Altenbach & Allen (2011).

Eliminering av olika gliadinergrupper genom genmodifiering.

Gil-Humanes *et al.* (2008) tystade den gen som uttrycker γ -gliadin genom RNA-interferens. De skapade en RNA interferensplasmid (pghp8.1) med delvis överensstämmande sekvenser med genen som koder för γ -gliadiner. Tillsammans med en annan plasmid innehållande in gen kallad *bar* skapades sju transgena vetetyper ur två vanliga veten med olika genotyper (BW208 och BW2003). Fyra transgener tillhörande BW208 som hade denna som kontroll och tre transgener tillhörande BW2003 med den som kontroll. Dom transgena plantorna var fertila och kornens morfologi och vikt skilde sig inte avsevärt från kontrollplantorna.

Proteininnehållet analyserades sedan med matrix assister laser desorption ionization (MALDI)

masspektrometri. I BW208 varianterna hade γ -gliadinerna minskat med 55-80% och i BW2003 varianterna hade γ -gliadinerna minskat med 33-43%. Tre av fyra transgener från BW208 hade en minskning av det totala antalet gliadiner ($-(16.2-25.7)$) medan en hade en ökning (18,5) och en av tre visade en minskning i de transgena BW2003 ($-15,7$), en av tre en ökning (3,8) och en fastställdes aldrig. Minskningen av γ -gliadiner medärvdes även till nästa generation.

Altenbach & Allen (2011) använde samma teknik som Gil-Humanes *et al.* (2008) för att tysta genen som uttrycker ω_5 -gliadiner i ett amerikanskt matvete (Butte 86). Altenbach & Allen (2011) designade en RNA interferensplasmid vars sekvens stämde överens med alla gener som uttrycker ω_5 -gliadiner. Sedan utfördes fem olika transformationsexperiment innehållande totalt ca 3000 embryon från Butte 86. Från de fem experimenten fick de fram totalt 82 planteringsbara skott varav 54 innehöll den plasmidinförda genen. Utseendemässigt gick inte de transgena plantorna att skilja från kontrollplantorna. SDS-page analys gjordes för att analysera proteininnehållet i plantor från alla fem experiment. I alla fem fallen hade alla band innehållande ω_5 -gliadiner påtagligt eller helt försvunnit men inget tydde på att några av de andra proteingrupper förändrats. Den införda genen nedärvdes även till nästa generation i 57-93% av tre testade fall. Analyser av proteininnehållet visade att generna i mindre utsträckning var tystade i generation två.

Både Altenbach & Allen (2011) och Gil-Humanes *et al.* (2008) lyckades med sina mål att genom RNA-interferens tysta specifika gener. Deras arbete kan i framtiden ligga i grunden för vidare forskning om veteallergi den bakomliggande mekanismen. Men utförligare analyser behöver i båda fallen göras på vetets egenskaper och hur det förändras i senare generationer.

Eliminering av ω -gliadiner genom växtförädling

Växtförädling är en tidskrävande metod men ett alternativ till metoder där man använder sig av genmodifiering vilket till stor del inte är tillåtet i bland annat EU. ω_5 -gliadiner har visats vara den största allergenen av glutenproteinkomponenterna hos individer med anafylaxi (Battais *et al.* 2005a). Detta är därför den proteinkomponent som är mest intressant att försöka få bort ur vete och sen testa om symtomen från anafylaxi minskar. Wang & Skoczowski (2014) utvecklade genom växtförädling fram ett vete där inga ω -gliadiner uttrycks. Detta gjordes genom korsning av två vinterveten, en med tystade gener för ω_5 -gliadiner och den andra med tystade gener för $\omega_{1,2}$ -gliadiner. Avkommorna analyserades och både individer med alla gener för ω -gliadiner tystade och individer där inga gener för ω -gliadiner var tystade. De ω -gliadiner utan tystade gener användes som kontroller. Men det var inte enbart ω -gliadiner som förändrats, γ -gliadinerna hade minskat med 13 % och α/β -gliadinerna hade ökat med nästan 30 %. Den totala mängden gliadiner hade ökat med 8 % gentemot kontrollgruppen. ELISA användes för att mäta gliadinernas förändring i förmåga att binda in IgE-antikroppar hos 10 försökspersoner. Antalet IgE-antikroppar som band in till olika proteiner hade minskat mellan 26.5-35.7 % hos individerna och en statistisk signifikant skillnad ($P < 0,001$) kunde påvisas med ett t-test. Slutligen gjorde Wang J och Skoczowski (2005) ett natriumdodecylsulfat (SDS) sedimentationstest för att se om vetets karaktärer försämrades. Sedimentationstest är en metod som man länge använt för att mäta mjölets karaktärer och kvaliteter (Zeleny *et al.* 1960). Testet visade att mjölet från vete utan ω -gliadiner hade signifikant högre sedimentationsvolym än mjölet från vete innehållande samtliga ω -gliadiner. Detta tyder på att mjölet utan ω -gliadiner är av bättre kvalitet. Sammanfattningsvis resulterade Wang & Skoczowskis försök i ett vete med ca 30 % minskad förmåga att binda in IgE-antikroppar och med något bättre bakegenskaper.

Diskussion

Identifiering av IgE-bindande proteiner

Albuminer, globuliner och ω_5 -gliadiner har visats vara kraftiga allergener hos individer med veteallergi (Battais *et al.* 2005a). Som det framgår i tabell 2 och 3 tycks dessa proteinkomponenter inducera olika symtom. Albuminer och globuliner är de proteingrupper som binder in mest IgE-antikroppar av alla proteinkomponenter hos individer med atopiskt eksem eller kombinerad atopiskt eksem och astma (Battais *et al.* 2005a). ω_5 -gliadin var den proteingrupp som band in mest IgE-proteiner i patienter med anafylaxi eller nässelutslag. Det mest utmärkande var att 100 % av patienterna med anafylaxi hade IgE-antikroppar mot ω_5 -gliadin. Inga proteiner var helt utan reaktion så det går inte utesluta något av proteinerna från att vara allergiframkallande (tabell 2) (Battais *et al.* 2005a). I försöket ur Battais *et al.* (2003) publikation kunde de inte se några klara samband mellan symtom och IgE-bindande proteiner, vilket till största del berodde på att de inte gjorde någon skillnad på symtomen. Men trots att uppdelningen av symtomen resulterade i att vissa proteinkomponenter är större allergener än andra så kunde inga uteslutas. Detta indikerar att sammansättningen proteinbindande IgE-antikroppar är väldigt individuell.

Anafylaxi skiljer sig från de andra symtomen eftersom man egentligen inte kan säga att det är ett specifikt symtom. Det är snarare en kombination av de andra symtomen med skillnaden att reaktionen sker hastigt och med stor kraft. Därav kan man koppla samman ω_5 -gliadin till snabba och kraftiga reaktioner på vete. Detta är antagligen anledningen till att ω_5 -gliadin är den proteingrupp som många forskare valt att göra utförligare studier på i samband med veteallergi (Palosuo *et al.* 2001, Daengsuwan *et al.* 2004, Wang & Skoczowski 2014). Som tidigare nämnts var det enbart barn med direkta symtom och inte fördröjda symtom som hade antikroppar mot ω_5 -gliadiner (Palosuo *et al.* 2001). Detta stöder teorin att ω_5 -gliadiner är en proteingrupp som kan genererar kraftiga allergiska reaktioner.

Styrkan på en allergiska reaktion beror på antalet IgE-antikroppar som binder in till det ämne som orsakar den allergiska reaktionen (Żukiewicz-Sobczak *et al.* 2013). Därför är det inte bara väsentligt att mäta vilka av proteinkomponenterna som binder in IgE-antikroppar utan även mängden IgE-epitoper komponenterna har. Som det framgår i tabell 3 har fler IgE-epitoper identifieras på ω_5 -gliadin än de andra gliadinerna, något som kan vara orsaken till sambandet mellan ω_5 -gliadiner och de kraftiga allergiska symtomen (Battais *et al.* 2005b). Även detta stärker teorin att ω_5 -gliadiner är största allergenen av gliadinerna men liknande studier behövs för att kunna jämföra med gluteninerna, albuminerna och globulinerna.

Man måste även ta i hänsyn att proteiners 3D-struktur avgör hur många av dessa positioner som är tillgängliga för IgE-antikroppar att binda till. Detta är något som kan ligga bakom att HMW-gluteniner inte tycks binda in IgE-antikroppar så bra, då de är stora polymerer med en komplex 3D struktur (Battais *et al.* 2003). Möjligheten finns då att de inte har lika många IgE-bindande sekvenser tillgängliga för IgE-antikropparna som gliadinerna (monomerer). Som tidigare nämnts tycks LMW-gluteniner reagera liknande ω_5 -gliadinerna på IgE-antikroppar (Battais *et al.* 2005a). Att LMW-gluteniner har liknande förmåga att binda in IgE-antikroppar är inte förvånande med tanke på att de är väldigt lika i proteinsammansättningen. Den största skillnaden mellan LMW-gluteniner och gliadinerna är att LMW-gluteninerna bildar polymerer (D'Ovidio & Masci 2004), vilket kan vara en av faktorerna som gör att de binder in IgE-antikroppar i färre av individerna i Battais *et al.* (2005a) test än ω_5 -gliadinerna.

Eftersom veteallergi är vanligast hos barn och ofta försvinner i vuxen ålder, kan man tänka sig att det finns en skillnad i uppsättningen IgE-antikroppar hos vuxna och barn. Något som Battais *et al.* (2005a) kunde påvisa då de såg ett statistiskt samband mellan ålder och IgE-bindande antikroppar. Dock ska man se kritiskt på dessa resultat då fördelningen av symtom var väldigt ojämn mellan åldersgrupperna. Skillnaderna i vilka proteiner som band in IgE-antikroppar mellan barn och vuxna kan därför lika gärna berott på de olika symtomen som åldern och resultaten tyder på att skillnaden i symtomen spelar in. De vuxna hade flest individer med nässelutslag eller anafylaxi vilka är de symtom som visade på flest IgE-antikroppar mot just ω_5 -gliadin som var en av de tre proteingrupperna där signifikans kunde påvisas. Hos barnen där 30 av 31 hade atopiskt eksem eller kombinerad atopiskt eksem och astma, är det inte så konstigt om ett samband kunde hittades hos albuminer och globuliner, då det finns en tydlig koppling mellan de proteingrupperna och dessa symtom. Mer utförliga studier krävs för att kunna uttala sig om förhållandet mellan IgE-bindande proteiner och ålder.

Fördelar och nackdelar med vete utan specifika proteinkomponenter

Problemet med helt glutenfritt mjöl är att det har väldigt reducerade bakegenskaper. Som tidigare nämnts är Gluteniner de proteiner som till största del påverkar vetets bakegenskaper (Barak *et al.* 2013). De är även några av de minst allergiframkallande proteinkomponenterna, något som indikerar att det skulle vara möjligt att få fram ett vete som är mindre allergiframkallande, men som fortfarande håller hög kvalitet på bakegenskaperna. Mest lovande i syftet att få fram ett mindre allergiframkallande veta är Wang & Skoczowski (2014) försök, där de lyckades helt stoppa produktionen av alla ω -gliadin. Frågan är om den minskade inbindningen av IgE-antikroppar är tillräckligt för att minska eller helt undvika symtomen. Ett annat frågetecken är vilka som skulle kunna dra nytta av det ω -gliadinfria vetet, då ω -gliadiner inte är de största allergenen i alla veteallergirelaterade symtom. Idag finns det inga riktigt bra diagnostiseringsmetoder för veteallergi. Det mest tillförlitliga är metoden är pricktestet då misstänkta allergena ämnen testas på huden för att se om en reaktion uppstår. Men även denna metod ger en väldigt ospecifik diagnos. Därför är det vanligast att erfarenhet av reaktioner som uppstått när individerna fått i sig kost med vete i av misstag visar vilka symtom den specifika individen har. Ifall en individ haft en reaktion på vete eller uppvisat positiva resultat på ett pricktest rekommenderas helt vetefri kost. Eftersom diagnostiseringsmetoden inte kan säkerställa vilka proteinkomponenter som är allergena i specifika individer, vilket tycks variera mycket från individ till individ, så är det svårt att i varje enskilt fall förutsätta hur de skulle reagera på ett ω -gliadinfritt vete.

Men eftersom ω -gliadin i flera publikationer visats vara det protein som orsakar de mest aggressiva symtomen som anafylaktisk chock (Battais *et al.* 2005a, Battais *et al.* 2005b, Palosuo *et al.* 2001, Daengsuwan *et al.* 2004), så är det möjligt att denna minskning på 30 % ändå är så avgörande att en reaktion på vetet inte längre är livshotande. Är detta fallet skulle det ω -gliadinfria vete kunna finnas som ett allergivänligare alternativ, något som till fördel skulle kunna användas i den offentliga sektorn som skolor och sjukhus, för att minska risken för att kraftiga allergiska personer av misstag få i sig kost med vete. Detta skulle skapa en tryggare miljö både för dessa individer och deras anhöriga.

Altenbach & Allen (2011) och Gil-Humanes *et al.* (2008) metoder med RNA-interferens är en effektivare och mer lättkontrollerad metod för att tysta specifika gener än traditionell växtförädling som Wang & Skoczowski (2014) använde. Genom att tysta en gen med en RNA-interferensplasmid minskas risken för att påverka och förändra produktionen av andra proteiner. Det går även snabbare då mindre korsning och färre generationer krävs. Dock medförde denna metod en ökad förlust av tystade gener i kommande generation jämfört med

växtförädlingen. Växtförädlingen medförde en större förändring i sammansättningen av resterande proteiner. Förändringen av den övriga proteinsammansättningen är med stor sannolikhet orsaken till de ökade bakegenskaperna som kunde påvisas i Wang & Skoczowski (2014) experiment. Så en förändring i även de glutenproteiner som inte är målgruppen behöver inte ge en negativ effekt. Den största fördelen med Wang & Skoczowski (2014) växtförädling är att det inte medför några politiska problem. RNA-interferensen klassas som genmanipulation vilket i stor utsträckning är förbjudet i EU och omdiskuterar i stora delar av världen.

Det är fortfarande lång väg kvar innan allergivänligt vete likvärdigt med vanligt vetemjöl finns att köpa i våra mataffärer. Att olika glutenproteiner reagerar olika med IgE-antikroppar är nu fastställt, men det behövs mer forskning om hur de olika proteinerna är kopplade till olika symtom och hur avgörande de är ensamma. Det är fortfarande alldeles för oklart hur de enskilda proteinkomponenterna påverkar veteallergiker, något som borde bättre klargöras innan man börjar testa olika veten med reducerade proteinkomponenter. Detta försvåras av att IgE-sammansättningen är individuell, så något som inte är skadligt för en individ vara väldigt allergiframkallande för en annan. Trots dessa svårigheter har på senare år många forskningsframsteg gjorts inom både om veteallergi och veteproteiner samt hur dessa hänger ihop, vilket gör att området ser ut att ha en ljus framtid.

Tack

Tack till Lage Cerenius som har hjälp till med handledning genom hela arbetet, Hanne Carlsson och Jun Mei Hu Frisk som har opponerat och hjälpt mig utveckla uppsatsen. Även tack till Therese Jonsson som fotograferat bilden till framsidan.

Referenser

- Altenbach SB, Allen PV. 2011. Transformation of the US bread wheat 'Butte' and silencing of omega-5 gliadin genes. *GM Crops* **2**:66-73.
- Barak S, Wudgil D, Khatkar BS. 2014. Effect of sompositional variation of gluten proteins and rheological characteristics of wheat flour and the textural quality of white salted noodles. *International Journal of Food Properties* **17**:731-740.
- Battais F, Courcoux P, Popineau Y, Kanny G, Moneret-Vautrin DA, Denery-Papini S. 2003. Food allergy to wheat: identification of immunoglobulin E and immunoalbulin G-binding proteins with sequential extracts and purified proteins from wheat flour. *Clinical and Experimental Allergy* **33**:962-970.
- Battais F, Courcoux P, Popineau Y, Kanny G, Moneret-Vautrin DA, Denery-Papini S. 2005a. Food allergy to wheat: difference in immunoglobulin E-binding proteins as a function of age or symptoms. *Journal of Cereal Science* **42**: 109-117.
- Battais F, Mothes T, Moneret-Vautrin DA, Pineau F, Kanny G, Popineau Y, Bodiner M, Denery-Papini S. 2005b. Identification of IgE-binding epitopes on gliadins for patients with food allergy to wheat. *Allergy* **60**:815-821.
- Björn LO, Enckell PH, Meurling P, Pelger S, Ståhl S. 2005. Biologisk ordlista. Holmbergs AB, Malmö.
- Daengsuwan T, Palosuo K, Phankingthongkum S, Visitsunthorn N, Jirapongsananuruk O, Alenius H, Vichyanond O, Reunala T. 2005. IgE antibodies to ω -5 gliadin in children with wheat-induced anaphylaxis. *Allergy* **60**:506-509.
- D'Ovidio R, Masci S. 2004. The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. *Journal of Cereal Science* **39**:321-339.

- Gil-Humanes J, Pistón F, Hernando A, Alvarez, JB, Shewry PR, Barro F. 2008. Silencing of γ -gliadins by RNA interference (RNAi) in bread wheat. *Journal of Cereal Science* **48**:565-568.
- Inomata N. 2009. Wheat allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **9**:238-243.
- Keet CA, Matsui EC, Dhillon G, Lenehan P, Paterakis M, Wood RA. 2009. The natural history of wheat allergy. *Annals of Allergy, Astma & Immunology* **102**:410-415.
- Larré C, Lupi R, Gombaudo G, Bossard C, Branlard G, Moneret-Vautrin DA, Rogniaux H, Denery-Papini S. 2011. Assessment of allergenicity of diploid and hexaploid wheat genotypes: Identification of allergens in the albumin/globulin fraction. *Journal of Proteomics* **75**:1279-1289.
- Matsuo H, Kohno K, Morita E. 2005 Molecular cloning, recombinant expression and IgE-binding epitope of ω -5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *FEBS Journal* **272**:4431-4438.
- Merlino M, Leroy P, Chambon C, Branlard G. 2009. Mapping and proteomic analysis of albumin and globulin proteins in hexaploid wheat kernels (*Triticum aestivum* L.) *Theoretical and Applied Genetics* **118**:1321-1337.
- Nationalencyklopedin. 2014. WWW-dokument: <http://www.ne.se.ezproxy.its.uu.se/?login=yes>. hämtad 2014-03-18.
- Palosuo K, Varjonen E, KeKKi OM, Klemola T, Kalkkinen N, Alenius H, Reunala T. 2001. Wheat ω -5 gliadin is a major allergen in children with immediate allergy to ingested wheat. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **108**:634-638.
- Shewery PR. 2009. Wheat. *Journal of Experimental Botany* **60**:1537-1553.
- Shewery PR, Halford NG. 2002 Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization *Journal of Experimental Botany* **53**:947-958.
- Shewery PR, Halford NG, Tatham AS. 1992. High molecular weight subunits of wheat glutenin. *Journal of Cereal Science* **15**:105-120.
- Shewery PR, Tatham AS, Forde J, Kreis M, Mifflin BJ. 1986. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: a reassessment. *Journal of Cereal Science* **4**:97-106.
- Sicherer SH. 2000. Determinants of systemic manifestations of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **106**:S251-S257.
- Waga J, Skoczowski A. 2014. Development and characteristics of ω -gliadin-free wheat genotypes. *Euphytica* **195**:105-116.
- Wieser H. 2007. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology* **24**:115-119.
- Woychik JH, Boundy JA, Dimler RJ. 1961. Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **94**:477-482.
- Zeleny L, Greenaway WT, Gurney G M, Fifield CC, Lebsack K. 1960. Sedimentation value as an index of dough-mixing characteristics in early-generation wheat selections. *Cereal Chemistry* **37**:673-678.
- Żukiewicz-Sobczak W A, Wróblewska P, Adamczuk P, Kopczyń P. 2013. Causes, symptoms and prevention of food allergy. *Postepy Dermatologii i Alergologii* **2**:133-116.