

WESTERN BLOT ANALYSIS OF CELIAC ACTIVE PROTEINS

Socha P., Mickowska B., Urminská D.

Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76, Nitra, Slovakia

E-mail: ing.peter.socha@gmail.com

ABSTRACT

Celiac disease is an inflammatory disorder of the small intestine in genetically susceptible individuals caused by ingestion of wheat gluten and corresponding prolamins from rye and barley. The aim of our study was examined immunoreactivity of some varieties of cereals and pseudocereals with polyclonal antibody raised against wheat gluten by Western blot analysis. We also compared SDS-PAGE gels with blotted proteins on membranes after immunoblotting. Immunological reaction was positive for all varieties of wheat, spelt wheat, barley, triticale, oat and foxtail millet. Almost no reaction with used antibody was obtained for buckwheat, quinoa and rice. There were no significant differences in immunogenicity between varieties. Western blot analysis after SDS-PAGE is suitable method for assess of prolamins in cereal and pseudocereal grains. Our results confirm that wheat, spelt wheat, barley and triticale are not suitable for celiac patients and must be replaced products from pseudocereals (buckwheat, quinoa, foxtail millet) and rice.

Key words: prolamins, Western blot, cereals, celiac disease

Acknowledgments: This work was realized under the direction of supervisor Dr. Barbara Mickowska on University of Agriculture in Krakow, Faculty of Food Technology, Malopolska Centre of Food Monitoring and Certification.

ÚVOD

Celiakálne ochorenie, známe tiež aj ako celiakálna sprue alebo gluténsenzitívna enteropatia, je jednou z najčastejšie sa vyskytujúcich potravinových intolerancií vo svete. Je definované ako zápalové ochorenie horných častí tenkého čreva (duodenum, jejunum) u geneticky predisponovaných jedincov spôsobené príjmom pšeničných, ražných, jačmenných a ovsených produktov (Wieser, Koehler, 2008). Je všeobecne známe, že prolamíny sú hlavným spúšťajúcim faktorom celiakie. Pšeničný lepok obsahuje dve hlavné bielkovinové frakcie, gliadíny a gluteníny, ktoré sú aktivátormi ochorenia (Hill, McMillan, 2006). Jedinou efektívnou liečbou celiakálneho ochorenia je celoživotná bezlepková diéta. Pacienti musia z potravy vylúčiť všetky výrobky z cereálií, ktoré obsahujú múku z pšenice (vrátane pšenice kamut, tvrdej a špaldovej), raže, jačmeňa, triticales a ovsu (Pruska-Kędzior et. al., 2008). Podľa Codex Alimentarius Commission, ktorý bol v roku 2008 zrevidovaný, sú bezlepkové potraviny (tzv. „gluten-free“) definované ako potraviny obsahujúce menej než 20 ppm ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) bielkovín z pšenice, jačmeňa, raže a/alebo akýchkoľvek ich hybridných druhov (Weber et. al., 2009). Naopak, vhodnými pre potreby bezlepkovej diéty sú niektoré ďalšie plodiny, pričom najčastejšie využívanými sú kukurica, ryža a sója. V súčasnej dobe sa pre potreby bezlepkovej diéty stále väčšia pozornosť venuje využívaniu tzv. pseudocereálií, a to pre ich vysoký obsah plnohodnotných bielkovín, tukov, minerálnych a balastných látok a obsahu škrobu. Môžu sa využívať aj ako čiastočná náhrada chlebového obilia (Cooper et. al., 1998; Zingone et. al., 2010).

Cereálie obsahujú v endosperme zrna frakcie zásobných bielkovín, ktoré sa rozdeľujú do štyroch skupín na základe ich rozpustnosti v rôznych rozpúšťadlách: albumíny, globulíny, prolamíny a glutelíny (Ciccocioppo et. al., 2005). Bielkoviny typu albumínov a globulínov sú dobre rozpustné vo fyziologických roztokoch a ľahko hydrolyzovateľné proteolytickými enzýmami. Tieto vlastnosti predurčujú ich dobrú stráviteľnosť. Prolamíny a glutelíny sú lokalizované v škrobnatom endosperme a plnia zásobnú funkciu (Michalík, 1994). Prolamíny sa u jednotlivých plodín nazývajú nasledovne: v pšenici gliadíny, v jačmeni hordeíny, v raži sekalíny a v ovse aveníny. Glutelíny sa v pšenici nazývajú gluteníny. Hlavný rozdiel medzi gliadínmi a glutenínmi pšenice je v analýze ich funkčnosti. Gliadíny sú monomérne polypeptidové reťazce o molekulovej hmotnosti 30-80 kDa a gluteníny sú viacerázcové štruktúry polypeptidov navzájom pospájané disulfidickými väzbami o molekulovej hmotnosti 15-150 kDa (Gianibelli et. al., 2001; van Eckert et. al., 2010). Vysoký obsah aminokyselín glutamínu a prolínu v gliadínoch, sekalínoch a hordeínoch môže byť jedným z faktorov v patogenéze celiakie, čo robí tieto bielkoviny relatívne rezistentné voči proteolytickému tráveniu črevnými enzýmami. To vyúsťuje do tvorby peptidov bohatých na glutamín a prolín (Hill, McMillan, 2006).

Pšeničné gliadíny a gluteníny plnia významnú úlohu aj z hľadiska reologických vlastností cesta, pritom ich funkcia je odlišná. Hydratované gliadíny sú viac elastickejšie a menej kohézne ako gluteníny a majú

predovšetkým vplyv na viskozitu (rozťažnosť) cesta. Hydratované gluteníny sú kohézne, aj elastické a sú zodpovedné za pevnosť a elasticitu cesta (Starovičová et. al., 2003; Puppo et. al., 2005; Wieser, 2007). Takto hydratované gliadíny a gluteníny majú schopnosť vytvárať súvislú lepidlivú mriežkovitú štruktúru, označovanú ako lepok (glutén). Tento jav je dôležitý z hľadiska prípravy kysnutého cesta a pečených produktov (Petr et. al., 2003).

Dôležitým kritériom pre stanovenie prítomnosti a obsahu prolaminov v zrne cereálií je výber vhodnej analytickej metódy (Ebo, Stevens, 2001). Základnými metódami sú frakcionácia cereálnych bielkovín na základe ich rozdielnej rozpustnosti a elektroforetická separácia bielkovín v polyakrylamidových géloch (Urmínská et. al., 2009). V súčasnosti sa čoraz viac stávajú populárnymi imunochemické metódy, a to ELISA (enzýmová imunoabsorbentná analýza) a imunobloting po SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovom géli v prostredí dodecylsulfátu sodného) (Battais et. al., 2003). Tieto metódy poskytujú dôležité informácie ako pre medicínsky výskum, tak aj pre oblasť cereálnej chémie. Poukazujú na imunoafinitu bielkovín k sérovým protilátkam a na vzťahy medzi štruktúrnymi vlastnosťami bielkovín a ich alergenicitou (Waga, Zientarski, 2007). Tieto imunologické metódy sú založené na princípe špecifickej reakcie medzi protilátkami (imunoglobulínmi), ktoré sú produkované imunizáciou na zvieratách (napr. králikoch alebo myšiach) a antigénmi (v prípade celiakie sú to celiakálne aktívne peptidy) (Wieser, Koehler, 2008).

Cieľom tejto práce bolo analyzovať prolaminový komplex zrna cereálií a pseudocereálií pomocou základnej biochemickej metódy - elektroforézy SDS-PAGE a následne porovnať odlišnosti v imunologickej reakcii na použitú polyklonálnu protilátku medzi druhmi a odrodami prostredníctvom metódy Western blot.

MATERIÁL A METODIKA

Rastlinný materiál bol získaný z génovej banky semenných druhov Slovenského centra poľnohospodárskeho výskumu – Výskumného ústavu rastlinnej výroby v Piešťanoch a na analýzy boli použité: pšenica letná (*Triticum aestivum*), pšenica špaldová (*Triticum spelta*), jačmeň siaty (*Hordeum vulgare*), tritikale (*Triticosecale*), ovos siaty (*Avena sativa*), pohánka jedlá (*Fagopyrum esculentum*), mohár taliansky (*Setaria italica*), quinoa (*Chenopodium quinoa*) a ryža siata (*Oryza sativa*).

Obilniny boli zomleté na celozrnný šrot na laboratórnom mlyne. Zomleté cereálie boli extrahované pomocou magnetického miešadielka s 15 ml rozpúšťadla/g vzorky po dobu 1 hod. pri laboratórnej teplote. Albumíny a globulíny boli extrahované 0,5 M NaCl (dvakrát), zvyšky NaCl boli premyté destilovanou vodou a prolaminy boli extrahované 70% etanolom. Supernatant bol zakaždým centrifugovaný a prolaminy lyofilizované.

SDS-PAGE elektroforéza bola vykonaná podľa metodiky Schägger, von Jagov, 1987. Elektrotransfer bielkovín na PVDF membránu ImmobilonP^{SQ} prebiehal 1,5 hod. pri 170 mA s použitím pufru CAPS

podľa postupu výrobcu (Millipore, USA). Bielkoviny na membráne boli vizualizované pomocou reverzibilnej farbičky Ponceau S.

Western blot:

1. blokovanie membrány 1 hod. (1% bovinný sérový albumín v TBS pufrí s pH 7,6)
2. premytie membrány TBS pufrom 4-krát po 15 min.
3. inkubácia s primárnou protilátkou 1,5 hod. (riedenie 1:1000)
4. premytie membrány TBS pufrom 5-krát po 15 min.
5. inkubácia so sekundárnou protilátkou 1 hod. (riedenie 1:2000)
6. premytie membrány TBS pufrom 6-krát po 15 min.
7. detekcia bielkovín na membráne pomocou 3,3'-diaminobenzidínu podľa odporúčania výrobcu (Sigma, USA)

Primárna anti-gluténová polyklonálna protilátka proti pšeničnému gluténu bola od firmy USBiological (USA) a sekundárna HRP protilátka pripravená imunizáciou na králikoch pochádzala od firmy BD Pharmigen (USA).

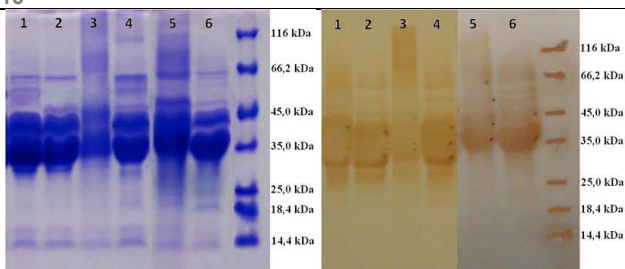
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Cieľom tejto práce bolo elektroforeticky a imunologicky analyzovať celiakálne aktívne frakcie bielkovín extrahovaných zo zrna vybraných druhov cereálií a pseudocereálií. Proteíny po SDS-PAGE elektroforéze boli vizualizované pomocou Coomassie Brilliant Blue. Následne boli vystavené elektrotransferu na PVDF membránu, kde boli farbené reverzibilnou farbičkou Ponceau S. Bielkovinové bandy na géloch boli identické s tými na membráne po transfere. Prolamíny viazané na membráne boli potom inkubované s primárnou anti-gluténovou protilátkou a detekované sekundárnou protilátkou značenou enzýmom chrenovou peroxidázou. Po imunoblate boli bielkoviny vizualizované diaminobenzidínom a tie sa porovnávali s bandmi na polyakrylamidových géloch. Oproti gélom boli blotované proteínové bandy mierne rozsiahlejšie, ale vo všeobecnosti boli identické.

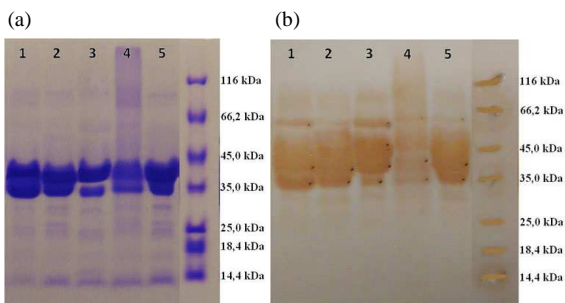
Výsledky z elektroforeogramov pri všetkých odrodách pšenice letnej (*Triticum aestivum*) a pšenice špaldovej (*Triticum spelta*) poukazujú na to, že bielkovinové bandy medzi nimi sa výrazne neodlišujú a sú spravidla rovnaké. Na základe použitého markera pre SDS-PAGE môžeme určiť aj ich molekulové hmotnosti. Pri pšenici sa prolamínová frakcia bielkovín nazýva gliadíny. Van Eckert et. al., (2010) udáva molekulové hmotnosti gliadínov nasledovne: 32 000 Da pre α -gliadíny, 38 000-42 000 Da pre γ -gliadíny, 55 000-79 000 Da pre ω -gliadíny a 90 000-124 000 Da pre HMW glutenínové podjednotky. Celiakálne aktívne bielkoviny sú prítomné v tejto gliadínovej frakcii a zo zdravotného hľadiska je najviac riziková frakcia s molekulovou hmotnosťou okolo 20-30 kDa, nazývaná α -gliadíny, ktorá je aktívatorom celiakálneho ochorenia (Petr et. al., 2003; Urminská et. al., 2009). Práve tieto sú najviac zastúpené vo všetkých odrodách pšenice letnej a špaldovej. Nevýrazné rozdiely môžeme nájsť v kvantite jednotlivých subfrakcií, čo závisí od odrody pšenice (obr. 1a). Podobné výsledky z SDS-PAGE boli získané aj pri všetkých odrodách jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare*), kde hlavný bielkovinový band má molekulovú hmotnosť okolo 30-45 kDa (obr. 2a).

(a)

(b)



Obr. 1 (a) SDS-PAGE elektroforéza a (b) Western blot prolamínov pšenice letnej (*Triticum aestivum*) a pšenice špaldovej (*Triticum spelta*): 1. pšenica letná Hana, 2. pšenica letná Vlada, 3. pšenica letná Granny, 4. pšenica letná Saxana, 5. pšenica špaldová Rubiota, 6. pšenica špaldová Ceralio.

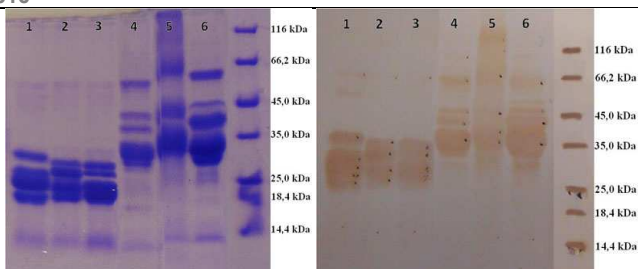


Obr. 2 (a) SDS-PAGE elektroforéza a (b) Western blot prolamínov jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare*): 1. Sladar, 2. Amsterdam, 3. Babette, 4. Gerlach, 5. Luran.

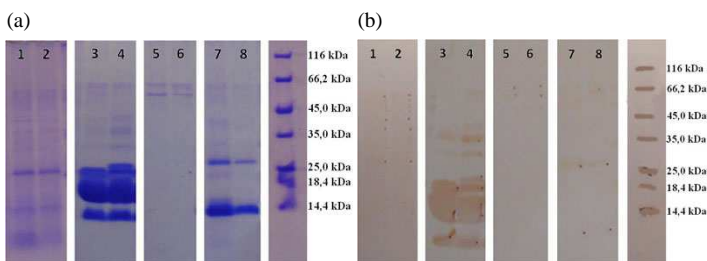
Tritikale je medzidruhový kríženec pšenice a raže (*Triticum* a *Secale*). Z výsledkov elektroforetických profilov vyplýva, že hlavný bielkovinový band má molekulovú hmotnosť okolo 30-45 kDa (podobne ako v pšenici) a druhý band má molekulovú hmotnosť okolo 60 kDa. Keďže tento je pri pšenicach menej výraznejší, môžeme predpokladať, že sa jedná o frakciu prolamínov, ktorá sa vo väčšom množstve vyskytuje v raži (obr. 3a). Ovos patrí spolu s pšenicou, ražou, tritikale a jačmeňom medzi zakázané suroviny vo výžive celiatiakov. Naše výsledky z SDS-PAGE poukazujú, že ovos siaty (*Avena sativa*) ako jediný spomedzi týchto cereálií má hlavné prolaminové subfrakcie s molekulovou hmotnosťou nižšou ako 35 kDa (obr. 3a). Zo skúmaných pseudocereálií je na prolaminovú frakciu najbohatší mohár taliansky (*Setaria italica*), v ktorom sa nachádzajú tri bandy s molekulovou hmotnosťou nižšou ako 25 kDa (obr. 4a). Pohánka jedlá (*Fagopyrum esculentum*) a quinoa (*Chenopodium quinoa*) obsahujú iba malé množstvá prolaminov, na čo poukazuje prítomnosť a počet slabších bandov na polyakrylamidovom gély. Pri quinoe môžeme pozorovať dokonca iba dva slabšie bandy na úrovni 60 kDa. Ryža z pohľadu elektroforetického profilu obsahuje prolaminovú frakciu s nízkou molekulovou hmotnosťou (≈ 15 kDa) a ďalší menej výraznejší band má veľkosť asi 25 kDa (obr. 4a).

(a)

(b)



Obr. 3 (a) SDS-PAGE elektroforéza a (b) Western blot prolaminov ovsa siateho (*Avena sativa*) a tritikale (*Triticosecale*): 1. ovos Ardo, 2. ovos Atego, 3. ovos Detvan, 4. tritikale Kendo, 5. tritikale Kinerit, 6. tritikale Wanad.



Obr. 4 (a) SDS-PAGE elektroforéza a (b) Western blot prolaminov pohánky jedlej (*Fagopyrum esculentum*), mohára talianskeho (*Setaria italica*), quinoi (*Chenopodium quinoa*) a ryže siatej (*Oryza sativa*): 1. pohánka FAG 120/82, 2. pohánka Pyra, 2. mohár Čiernoklas, 3. mohár Friderika, 4. quinoa Faro, 5. quinoa Baer, 6. ryža lúpaná gulatozrná, 7. ryža natural.

Ďalej sme posudzovali reakciu blotovaných bielkovín s polyklonálnou protilátkou. Pri všetkých odrodách pšenice, vrátane pšenice špaldovej protilátka rozpoznala všetky prolaminové frakcie s molekulovou hmotnosťou vyššou ako 30 kDa. Reakcia nebola pozorovaná jedine pri frakciách s nižšou molekulovou hmotnosťou ($\approx 14\text{--}25$ kDa) a to vo všetkých odrodách pšenice (obr. 1b). Podobné výsledky boli získané aj u jačmeňa siateho. Prolaminové frakcie s veľkosťou viac ako 35 kDa vykázali veľmi pozitívnu imunologickú reakciu s použitou polyklonálnou protilátkou, okrem fragmentov s veľkosťou približne 14–30 kDa, podobne ako v pšenici. Blotované bielkoviny sa výrazne nelíšili medzi skúmanými odrodami jačmeňa a boli takmer identické (obr. 2b). V prípade tritikale protilátka reagovala silno pozitívne s frakciami o veľkosti viac ako 30 kDa a nereagovala s frakciami s molekulovou hmotnosťou okolo 14–25 kDa, rovnako ako v prípade pšenice a jačmeňa (obr. 3b). Podľa autorov Wieser a Koehler (2008) patria α/β - a γ -gliadíny a LMW-GS pšenice, γ -hordeíny a B-hordeíny jačmeňa a aveníny ovsa do skupiny LMW bielkovinových frakcií s nižšou molekulovou hmotnosťou ($\approx 32\text{--}42$ kDa), ktoré sú bohaté na glutamín, prolín a aromatické aminokyseliny s množstvom cysteínových zvyškov. Naproti tomu do skupiny HMW bielkovinových frakcií s vyššou molekulovou hmotnosťou (≈ 90 kDa a viac) zaraďujú HMW-GS pšenice a D-hordeíny jačmeňa. Z našich výsledkov teda vyplýva, že polyklonálna protilátka najpozitívnejšie reagovala s frakciou α/β -gliadínov (v pšenici a tritikale) a frakciou γ -hordeínov (v jačmeni). Tieto frakcie o veľkosti ≈ 35 kDa vykazujú

najvýraznejšiu celiakálnu aktivitu. Protilátka tiež reagovala aj s frakciami s väčšou molekulovou hmotnosťou, hoci reakcia nebola až taká výrazná.

Polyklonálna protilátka rozpoznala aj prolamíny v ovse (o molekulovej hmotnosti približne 20-30 kDa), hoci vieme, že bielkoviny ovsa nemajú epitopy, ktoré reagujú s monoklonálnou protilátkou (obrázok 3b). Napríklad monoklonálna protilátka R5 používaná pri sendvičovej ELISA analýze nevykazuje žiadnu krížovú reakciu s bielkovinami ovsa a taktiež ryže, pohánky a quinoi. Táto protilátka reaguje s epitopmi QQPFP, QQQFP, LQPFP a QLPPF (van Eckert et. al., 2010), ktoré sa vo veľkom množstve vyskytujú v sekvenciách prolamínov pšenice, raže, tritikale a jačmeňa. Polyklonálne protilátky rozpoznávajú viac epitopov, čiže existuje pri nich väčšia pravdepodobnosť krížových reakcií. Podľa niektorých autorov je konzumácia čistých ovsených produktov bezpečná pre pacientov s celiakiou, kým názory ďalších autorov sú rozdielne a výrobky z ovsa vylučujú z bezpečkovej diéty (Størsrud et. al., 2003; Silano et. al., 2007).

Mohár, ktorý obsahuje bielkovinové frakcie s nižšou molekulovou hmotnosťou (< 30 kDa), vykázal dobrú imunologickú reakciu s použitou protilátkou (obr. 4b). Na rozdiel od gliadínov pšenice, prolamíny mohára nevykazujú celiakálnu aktivitu a môže byť použitý v bezpečkovej diéte. V pohánke, quinoi a ryži nebola pozorovaná takmer žiadna imunologická odpoveď na reakciu s protilátkou, čo môžeme potvrdiť neprítomnosťou bandov po imunoblottingu na rozdiel od rozseparovaných prolamínov na polyakrylamidovom gély (obr. 4b). Aj napriek tomu, že pohánka, quinoa a ryža obsahujú minimálne množstvo prolamínov, tieto sa polyklonálnej protilátke nepodarilo detekovať, čo svedčí o ich vynikajúcich imunochemických vlastnostiach v porovnaní s ostatnými cereáliami. Z toho dôvodu, pohánka, quinoa a ryža sú vhodnými surovinami pre potreby bezpečkovej diéty.

ZÁVER

Na základe získaných výsledkov detekcie celiakálne aktívnych bielkovín v zrne cereálií a pseudocereálií pomocou metódy Western blot s využitím polyklonálnej protilátky, môžeme konštatovať, že použitá metóda je vhodná na stanovenie prítomnosti prolamínových frakcií v sledovanom rastlinnom materiály. V nami analyzovaných vzorkách bola pozitívne potvrdená reakcia s použitou polyklonálnou protilátkou vo všetkých odrodách pšenice, vrátane pšenice špaldovej, jačmeňa, tritikale, ovsa a mohára. Naopak, žiadna alebo len veľmi nepatrná reakcia bola pozorovaná v zrne pohánky, quinoi a ryže. Prezentované výsledky potvrdili, že pseudocereálie (pohánka, quinoa alebo mohár) a ryža sú vhodnými surovinami pre potreby bezpečkovej diéty.

LITERATÚRA

Battais F., Pineau F., Popineau Y., Aparicio C., Kanny G., Guerin L., Moneret-Vautrin D. A., Denery-Papini S. (2003): Food allergy to wheat: identification of immunoglobulin E and immunoglobulin G-binding proteins with sequential extracts and purified proteins from wheat flour. *Clinical & Experimental Allergy*, 33(7): 962-970.

Ciccocioppo R., Di Sabatino A., Corazza G. R. (2005): The immune recognition of gluten in celiac disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 140(3): 408-416.

Cooper H. D., Spillane C., Kermali I., Anishetty N. M. (1998): Harnessing plant genetic resources for sustainable agriculture. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 114: 1-8.

Ebo D. G., Stevens W. J. (2001): IgE-mediated food allergy – extensive review of the literature. *Acta Clinica Belgica*, 56(4): 234-247.

Eckert van R., Bond J., Rawson P., Klein Ch. L., Stern M., Jordan T.W. (2010): Reactivity of gluten detecting monoclonal antibodies to a gliadin reference material. *Journal of Cereal Science*, 51(2): 198-204.

Gianibelli M. C., Larroque O. R., MacRitchie F., Wrigley C. W. (2001): Biochemical, genetics and molecular characterization of wheat endosperm proteins [online review]. Dostupné na internete: <<http://www.aaccnet.org/cerealchemistry/freearticle/gianibelli.pdf>>

Hill P. G., McMillan S. A. (2006): Anti-tissue transglutaminase antibodies and their role in the investigation of coeliac disease. *Annals of Clinical Biochemistry*, 43(2): 105-117.

Michalík I. (1994): Charakteristika cereálních bílkovín, ich výživná kvalita a vplyv na zdravotný stav. *Výživa a zdravie*, 39(8): 159-160.

Petr J., Michalík I., Tlaskalová H., Capouchová I., Faměra O., Urmínská D., Tučková L., Knoblochová H. (2003): Extention of the spectra of plant products for the diet in coeliac disease. *Czech Journal of Food Sciences*, 21(2): 59-70.

Pruska-Kędzior A., Kędzior Z., Gorący M., Pietrowska K., Przybylska A., Sychalska K. (2008): Comparison of rheological, fermentative and baking properties of gluten-free dough formulations. *European Food Research and Technology*, 227(5): 1523-1536.

Puppo M. C., Calvelo A., Anón M. C. (2005): Physicochemical and rheological characterization of wheat flour dough. *Cereal Chemistry*, 82(2): 173-181.

Schägger H., von Jagow G. (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2): 368-379.

Silano M., Benedetto R., Maialetti F., Vincenzi A., Calcaterra R., Cornell H. J., Vincenzi M. (2007): Avenins from different cultivars of oats elicit response by coeliac peripheral lymphocytes. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 42(11): 1302-1305.

Starovičová M., Gálová Z., Knoblochová H. (2003): Identification of glutenin markers in cultivars of three wheat species. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 39(2): 51-57.

Størsrud S., Hulthén L. R., Lenner R. A. (2003): Beneficial effects of oats in the gluten-free diet of adults with special reference to nutrient status, symptoms and subjective experiences. *British Journal of Nutrition*, 90(1): 101-107.

Urmínská D., Socha P., Vollmannová A. (2009): ELISA and PAGE analysis of protein determinants from cereal and pseudocereal grain causing human coeliac disease. *FEBS Journal*, 276(1): 94.

Waga J., Zientarski J. (2007): Isolation and purification of individual gliadin proteins by preparative acid polyacrylamide gel electrophoresis (A-PAGE) for allergenic research. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 57(1): 91-96.

Weber D., Cl eroux Ch., Godefroy S. B. (2009): Emerging analytical methods to determine gluten markers in processed foods – method development in support of standard setting. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(1): 111-117.

Wieser H. (2007): Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24(2): 115-119.

Wieser H., Koehler P. (2008): The biochemical basis of celiac disease. *Cereal Chemistry*, 85(1): 1-14.

Zingone F., Capone P., Ciacci C. (2010): Celiac disease: Alternatives to a gluten free diet. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 1(1): 36-39.