

# *Corylus avellana* polen ve tohum protein profillerinin karşılaştırılması

## Comparison between pollen and seed protein profiles of *Corylus avellana*

Hande CEBECİ<sup>1</sup>, Gökçe ALIÇ<sup>1</sup>, Özlem YILDIRIM<sup>1</sup>, Nur Münevver PINAR<sup>1</sup>, Barış AŞCI<sup>2</sup>, Şenol ALAN<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye  
Department of Biology, Faculty of Science, Ankara University, Ankara, Turkey

<sup>2</sup> Hakkari Üniversitesi Sağlık Meslek Yüksekokulu, Hakkari, Türkiye  
School of Health Profession, Hakkari University, Hakkari, Turkey

<sup>3</sup> Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zonguldak, Türkiye  
Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, Zonguldak Karaelmas University, Zonguldak, Turkey

### ÖZET

**Giriş:** Genellikle Fagales ordosuna dahil ağaçların polenlerinin birçok allerjik reaksiyona yol açtığı bilinmektedir. Bununla birlikte allerjinin gelişiminde çapraz reaktivite kaynaklı olguların rol oynadığı görülmektedir. Çapraz reaktivite, farklı allerjen kaynakları arasında görülebildiği gibi, polen ve tohum gibi aynı kaynağın farklı biyolojik yapıları arasında da görülebilmektedir. Fındık bitkisi polenleri ve tohumları allerjik reaksiyonlara neden olabilmektedir. Aynı zamanda kavrularak tüketilen fındık tohumları ticari öneme sahiptir.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada, fındık bitkisi tohumları ile polenlerinin protein profilleri, SDS-PAGE yöntemiyle çıkartılıp karşılaştırılmıştır. Ayrıca, ısı işlemlerin tohum protein profili üzerine olan etkileri de araştırılmıştır.

**Bulgular:** Polen ve tohum örneklerinden elde edilen jel elektroforezi analizi sonuçlarında tohum ve polen arasında sekiz tane ortak bant bulunmuştur. Kavrulan fındık tohumunda, bantların yaklaşık %22'sinin kaybolduğu görülmüştür. Bununla birlikte, 9 ve 17 kDa molekül ağırlığına sahip bantların ısıya dayanıklı, 14 kDa'lık bantın ise ısıya dayanıksız olduğu bulunmuştur.

### ABSTRACT

**Objective:** It is known that pollens from trees of the order Fagales usually cause allergic reactions. It is also known that cross reactivity takes part as a trigger in the development of allergies. Cross reactivity may occur between different allergen sources. Moreover, it can be found between different biological structures of same source such as pollen and seed. Pollen and seed of hazelnut can cause allergic reactions. Hazelnut seeds which are consumed as roasted have a commercial prominence.

**Materials and Methods:** In this study, protein profiles of hazelnut seeds and pollens have been taken out with SDS-PAGE method and compared with each other. In addition, effects of heating process on seed protein profile have been investigated.

**Results:** When the results have taken, it is seen that 8 same bands were found between pollen and seed at the end of SDS-PAGE analysis. After the SDS-PAGE analysis process, 22% of bands have disappeared in roasted seed and 9 and 17 kDa bands were heat resistant while 14 kDa was heat sensitive.

**Sonuç:** Fındık allerji testlerinin bölgesel olarak elde edilen kaynaklar ile yapılmasının gıda allerjilerinin tedavisine katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz.

(*Asthma Allergy Immunol* 2011;9:37-43)

**Anahtar kelimeler:** Allerjen, *Corylus avellana*, çapraz reaktivite, fındık, SDS-PAGE, tohum

Geliş Tarihi: 07/02/2011 • Kabul Ediliş Tarihi: 10/03/2011

## GİRİŞ

Ağaç polenleri ile sensitizasyonun, kış mevsiminden yaz mevsimine geçişlerde görülen saman nezlesi ve allerjik astımı tetikleyen bir faktör olduğu bilinmektedir<sup>[1]</sup>. Bununla birlikte, polene duyarlı bireylerde IgE antikorlarının çapraz reaktiflerle indüklenmesi, gıda allerjilerinin mevsimsel olmaktan ziyade tüm yıl boyunca görülme olasılığını artırmaktadır<sup>[2-4]</sup>. Farklı gıda ya da polenler arasında görülen çapraz reaktivite reaksiyonları, canlıların birbirleriyle olan sistematik akrabalıkları ile yakından ilişkilidir<sup>[5]</sup>. Çapraz reaktivite, farklı canlılar arasında olabildiği gibi, solunum ya da beslenme gibi ayrı yollarla vücuda alınan, aynı canlıya ait farklı kısımların etkileşimi sonucu da ortaya çıkabilmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, fındık ile yakın akraba olan huş ağacı (*Betula*) polenleri ile, kereviz ve soya fasulyesi gibi gıdalar arasında çapraz reaktivite bildirilmiştir<sup>[6,7]</sup>. *Corylus avellana* (fındık), hem polenleri hem de tohumları ile allerjik reaksiyonlara neden olan bir bitkidir<sup>[8,9]</sup>. Fındık tohumları, çiğ şekilde tüketilebildiği gibi, şekerleme ya da çikolata gibi allerjik özelliklere sahip gıdalar içerisinde de kavrulmuş olarak yer almaktadır. *Corylus* polenleri, Betulaceae familyasında yer alan *Betula* cinsi gibi oldukça allerjik bir polendir. Bazı türleri süs amaçlı olarak kullanılmakta olan *Corylus*'lar, başta Türkiye ve İspanya olmak üzere, Akdeniz havzasında yetiştirilmektedir. Dünyadaki fındık üretiminin en fazla gerçekleştiği ülkeler arasında başı çeken ülkemizde yapılan atmosferik çalışmalar, fındık polenlerine yüksek miktarda rastlanıldığını göstermektedir<sup>[10-12]</sup>. Fındık allerji prevalansının Avrupa'da yaklaşık

**Conclusion:** As a result, we thought that hazel allergy tests obtained from the regional resources may contribute the treatment of food allergies.

(*Asthma Allergy Immunol* 2011;9:37-43)

**Key words:** Allergen, *Corylus avellana*, cross reactivity, hazelnut, SDS-PAGE, seed

Received: 07/02/2011 • Accepted: 10/03/2011

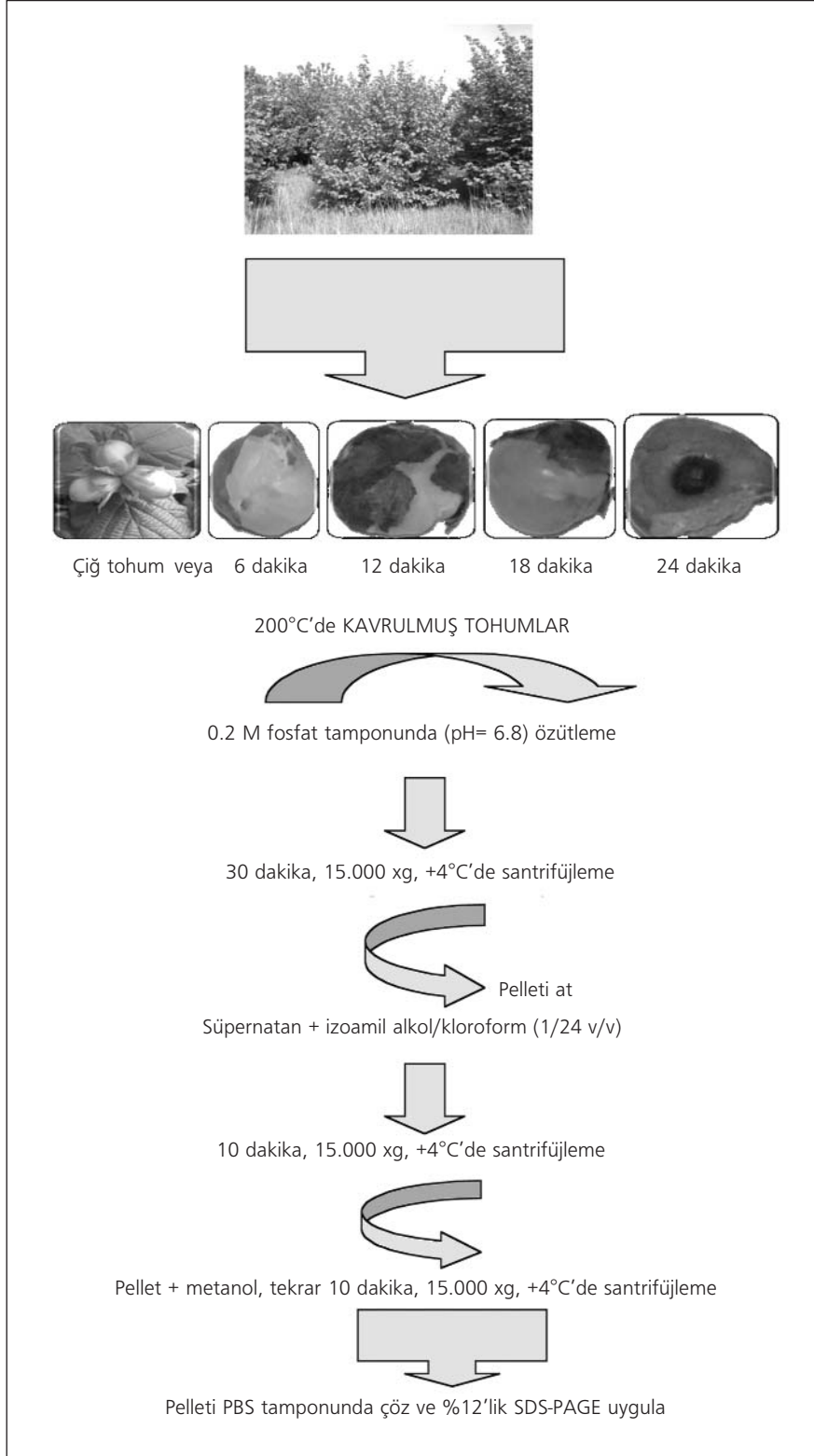
%0.1-0.5 arasında olduğu rapor edilmiştir<sup>[13]</sup>. Ayrıca, fındık tohumu ile ağaç polenleri arasında gerçekleşebilen çapraz reaktivite de gıda allerjisinin gelişimi açısından önemlidir. Bu nedenle, gıda sanayinde sıkça kullanılan işlenmiş *C. avellana* tohumunun protein içeriğinin ne şekilde değiştiğini tespit etmek, allerjik hastalıkların teşhisinde ve/veya tedavisinde önemli olabilir. Bu soruya yanıt bulabilmek amacıyla planladığımız çalışmamızda, Türkiye'de ticari olarak ekimi yapılan *C. avellana*'nın yerel formunun polenleriyle, çiğ ve kavrulmuş tohumlarının protein profilleri karşılaştırılmış, elde edilen bantlar arasında benzerlikler ve farklılıklar ortaya konmuştur.

## GEREÇ ve YÖNTEM

*C. avellana* polenleri, Şubat 2007 tarihinde Zonguldak ilinden özel torbalar içerisinde toplanmıştır. Kurutulan ve elenerek saflığı artırılan polenler, 0.2 M pH 6.8 fosfat tamponunda (PBS) +4°C'de 20 saat süreyle özütlenmiştir. Otuz dakika 15.000 xg, +4°C'de santrifüjlenen örneklerin süpernatant kısmı alınarak, sodyum dodesil sülfatlı ortamda %12'lik poliakrilamid

**Tablo 1. Çalışmada kullanılan materyaller ve toplandığı bölgeler**

Materyal	Kaynak
Polen	Zonguldak
Çiğ tohum	Samsun
6 dakika kavurulmuş tohum	Samsun
12 dakika kavurulmuş tohum	Samsun
18 dakika kavurulmuş tohum	Samsun
28 dakika kavurulmuş tohum	Samsun



Şekil 1. Protein profillerinin çıkartılmasında kullanılan yöntem.

jelde (SDS-PAGE) fraksiyonlarına ayrılmıştır<sup>[14]</sup>. Tablo 1’de verilen bölgelerden toplanan fındık tohumlarının bir kısmı çiğ, kalan kısımları ise 200°C’de sırasıyla 6, 12, 18 ve 28 dakika kavrulduktan sonra, PBS ile havanda ezilerek özütlenmiştir. Şekil 1’de de görüldüğü gibi, 30 dakika 15.000 xg, +4°C’de santrifüjlenen örneklerin süpernatant kısmı alınıp pellet kısmı uzaklaştırılmıştır. Süpernatanda bulunan yüksek orandaki yağı uzaklaştırmak için 1/24 oranında, izoamil alkol/kloroform karışımı ile metanol eklenmiş ve 10 dakika 15.000 xg’da santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen örneğin pellet kısmı metanol içerisinde çözülmüş ve yeniden 10 dakika 15.000 xg’da santrifüjlenmiştir.

### SDS-PAGE Yöntemiyle Protein Profillerinin Çıkarılması

Yukarıda açıkladığımız şekilde izole ettiğimiz polen ve tohum örneklerinin protein miktarları, Bradford yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (sığır serum albumini standart olarak kullanılmıştır)<sup>[15]</sup>. Daha sonra örneklerin protein profilleri, Laemmli’nin önerdiği yöntemle uygun olarak %12’lik Mini Protean III ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, molekül ağırlıkları 8 kDa ile 220 kDa arasında değişen işaretleyiciler kullanılmıştır (Sigma Co. USA). Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel, izopropanol/asetik asit/su (5/1/4) ile sabitleyip, %10’luk asetik asitte çözülen %0.025 Coomassie Brilliant Blue R 250 ile boyanmıştır. Destain işlemi için %10’luk asetik asit kulla-

nılmıştır. Bu işlemler sonunda elde edilen bantların molekül ağırlıkları Şekil 2’de verilen eğri denklemine göre hesaplanmıştır. Çalışmanın sonucunda elde edilen veriler Tablo 2’de yer almaktadır.

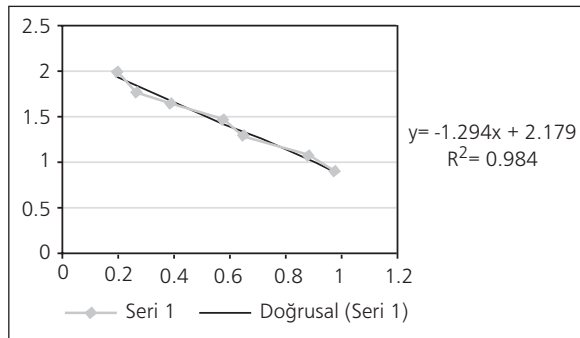
### BULGULAR

Çalışmamızda, allerjik polenler arasında yer alan *C. avellana* polenleri ile gıda olarak tüketilen tohumları kullanılmıştır. Özellikle, farklı besinlere katkı maddesi olarak ilave edilen tohumların kavurma işlemi sonucunda, protein profillerinde herhangi bir değişim olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla hem polen hem de farklı sürelerde kavruyan tohumların poliakrilamid jel elektroforezi yapılmıştır. Tablo 2’de yer alan çalışma sonuçlarına göre, *C. avellana* poleninde toplam 17, çiğ tohumda ise toplam 18 bant yer almaktadır. Kavruyan tohumlardaki sonuçlar ise özetle şöyle sıralanabilir; altı dakika süreyle 200°C’de işlem gören tohumda 14 bant, 12 dakika süre ile 200°C’de işlem gören tohumda dokuz bant, 18 dakika süreyle 200°C’de işlem gören tohumda yedi bant ve son olarak 28 dakika süreyle 200°C’de işlem gören tohumda ise dört bant tespit edilmiştir.

Jel görüntülerinden elde edilen sonuçlar, 10, 14, 84, 91 ve 99 kDa molekül ağırlıklarına sahip bantların ısıya en duyarlı bantlar olduğunu göstermektedir. Buna karşın 17, 22, 38 ve 54 kDa’luk bantların ise ısıya en dayanıklı protein bantlarını oluşturduğu bulunmuştur (Resim 1).

Polen ile çiğ tohumun protein profilleri karşılaştırıldığında, ortak bantların 9, 11, 14, 17, 38, 54, 91 ve 131 kDa molekül ağırlığına sahip proteinler olduğu görülmektedir. Tohumların protein bantlarında, kavurma sürelerine bağlı olarak azaldığı bulunmuştur (Tablo 2).

Yaptığımız çalışmada, 12 dakika süresince 200°C’de kavruyan fındık tohumlarının tat, renk ve koku açısından değerlendirildiğinde yenilebilir olduğu belirlenmiştir. Ancak bu süreden daha uzun zamanda aynı ısıya tabi tutulan tohumların kullanılmayacağı düşünülmektedir. Buna göre, 12 dakika süresince kavruyan fındık tohumu proteinlerinin, çiğ tohum prote-



Şekil 2. Molekül ağırlıklarının hesaplanmasında kullanılan grafik.

Tablo 2. SDS-PAGE elektroforezi sonucu polen, çiğ ve işlenmiş tohumlarda görülen protein bantlarının şeması

MA	Polen	Çiğ tohum	6 dakika	12 dakika	18 dakika	28 dakika	Ortak bantlar	Allerjenler
9	◆	◆	◆	◆	◆		◆	T
10		◆	◆					
11	◆	◆						
14	◆	◆	◆					T, P
17	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	T, P
20		◆	◆	◆				
22		◆	◆	◆	◆	◆		
24	◆							
26	◆							
28		◆						
33		◆	◆	◆				
37	◆							
38	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	
41	◆							
49	◆							
50		◆						
54	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	
64	◆							
70		◆	◆	◆	◆			P
74	◆							
84		◆	◆					
91	◆	◆	◆					
99		◆	◆					
102	◆							
107		◆						
131	◆	◆	◆	◆	◆			
138	◆							

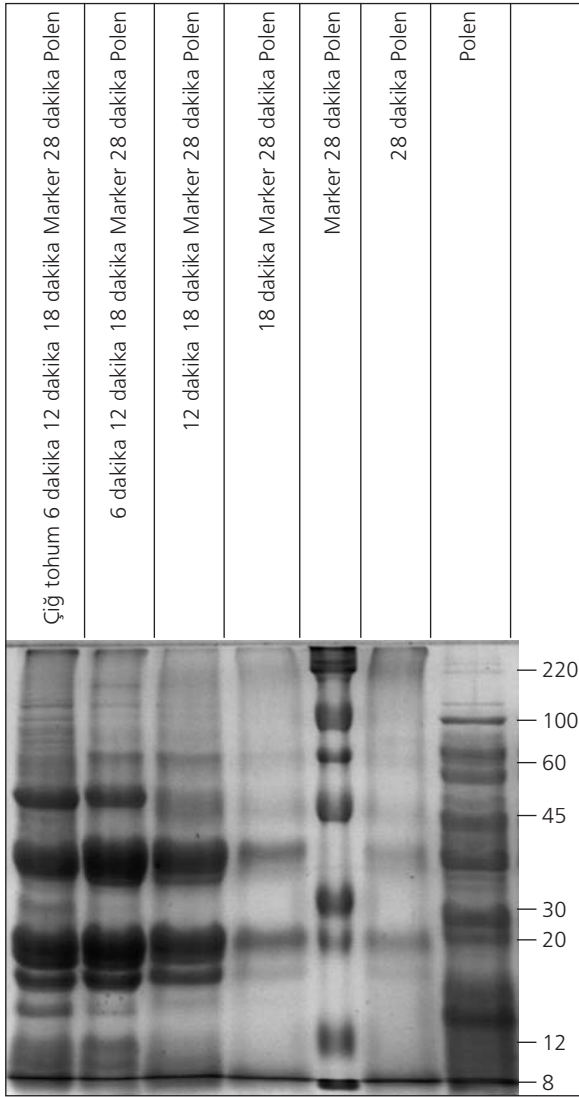
inlerine oranla, yaklaşık %22'sinin kaybolduğu bulunmuştur. Bunlar; 11, 14, 28, 50, 84, 91, 99 ve 107 kDa olarak belirlenen bantlarda yer alan proteinlerdir. Daha önce yapılan çalışmalarda allerjen olarak belirlenen fraksiyonlardan 9 ve 17 kDa molekül ağırlığına sahip bantların ısıya dayanıklı, 4 kDa'luk bantın ise dayanıksız olduğu görülmektedir (Tablo 2)<sup>[11]</sup>.

Polen ve tohum örneklerinden (farklı sürelerde ısı işleme tabi tutulan tüm örnekler) elde

edilen jel elektroforezi sonuçlarında molekül ağırlıkları 9, 17, 38 ve 54 kDa olan dört ortak bant bulunmuştur. Bunlardan 9 ve 17 kDa'lukların allerjen etki gösterdiği, daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir<sup>[11]</sup>.

#### TARTIŞMA

*C. avellana*'nın (fındık), ağaçta yetişen bir kabuklu yemiş olarak gıda ile tetiklenen allerjik reaksiyonlara yol açtığı bilinmektedir. Geniş bir kullanım alanına sahip olan bu yemiş, ge-



**Resim 1.** SDS-PAGE jel elektroforezi ile polen, çiğ ve işlenmiş tohumun protein profilleri [protein büyüklükleri (kDa olarak) jel görüntüsünün sağındaki rakamlarla ifade edilmektedir].

nellikle kavru olarak satılmakta veya yine kavru olarak pasta, çikolata, dondurma gibi gıdaların yapımında kullanılmaktadır. Bilindiği üzere kabuklu ağaç yemişlerinin allerjenleri tohum depo proteinleridir. Bu nedenle çalışmamızda, Karadeniz Bölgesinde yetişen fındık tohumunun proteinlerine kavurma süresinin etkisi incelenmiş ve fındık ağacının polenleriyle tohum arasındaki ortak bantlar SDS-PAGE elektroforezi ile belirlenmiştir. Daha önce yapılan

araştırmalarda polen allerjenlerinin meyve, sebze ve kabuklu yemişlerde bulunan ve IgE ile bağlanabilen epitoplarla çapraz reaksiyona girerek allerji oluşturabildiği gösterilmiştir<sup>[1-5]</sup>. Bu çalışmalarda polen ile etkileşen gıda allerjenlerinde en sık görülen yapının 17 kDa'luk polen proteini olduğu bildirilmiştir<sup>[7,16,17]</sup>. Sunduğumuz çalışmada tohum ve polenin protein profilleri arasında görülen ortak bantların (9, 11, 14, 17, 38, 54, 91 ve 131 kDa'luk), birbirini izleyen bu üreme birimleri arasındaki bağlantı olduğunu düşünmekteyiz. Temel işlevleri yerine getiren ve allerjen olarak belirlenen bantların ortak olarak her iki yapıda da yer alması doğaldır. Bunlardan enzimlere dayanıklı olanlar, polen allerjisi olan hastalarda, gıda allerjisine de neden olabilmektedir. Çalışmamızda ayrıca, kavurma süreleri artsa da, daha önceki çalışmalarla paralel olarak, allerjen polen olduğu bildirilen 9 ve 17 kDa'luk proteinlerin ısıdan etkilenmediği de görülmektedir. Ticari olarak işlenen tohumlarda da, çiğ tohumda görülen allerjen protein bantların büyük bir kısmının bulunması, çikolata kaynaklı allerjilerin bir kısmının kakao ile beraber fındık kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle bu tür hastalarda ayrıca fındık allerji testlerinin uygulanmasıyla daha sağlıklı bir teşhise ulaşılabileceğini tahmin etmekteyiz.

Çalışmamızda bulduğumuz bir diğer önemli sonuç ise, daha önce yapılan araştırmalarda elde edilen 38 ve 50 kDa'luk allerjenler yerine, deney materyalimiz olan Karadeniz Bölgesine ait *Corylus* tohumlarında bulduğumuz 40 ve 48 kDa'luk bantlardır. Bu bantlar daha önce Schocker ve arkadaşlarının fındık tohumları ile yaptıkları bir çalışma ile uyum göstermektedir<sup>[8]</sup>. Bu bulgunun bölgesel antijen farklılığını yansıttığı düşüncesindeyiz. Allerji teşhisinde bu tür farklılıkların göz önüne alınması ve mümkünse kişinin duyarlılık gösterdiği gıda ile doğrudan test yapılması, yukarıda belirttiğimiz farklılıkların ortaya konması açısından önemli olabilir.

Bundan sonra gerçekleştirilecek çalışmalarda ki hedef, ısıya dayanıklı olan protein bantlarının serolojik etkilerinin araştırılması, iklim değişik-



liklerinin *Corylus* tohum ve polen proteinlerine etkileriyle hastalarda allerjik reaksiyonların gelişimine olan etkilerinin araştırılması olacaktır.

#### KAYNAKLAR

1. Gruehna S, Suphioglu C, O'Hehirc RE, Volkmann D. Molecular cloning and characterization of hazel pollen protein (70 kD) as a luminal binding protein (BiP): a novel cross-reactive plant allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 2003;131:91-100.
2. Kazemi-Shirazi L, Pauli G, Purohit A, Spitzauer S, Fröschl R, Hoffmann-Sommergruber K, et al. Quantitative IgE inhibition experiments with purified recombinant allergens indicate pollen-derived allergens as the sensitizing agents responsible for many forms of plant food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:116-25.
3. Scheurer S, Son DY, Boehm M, Karamloo F, Franke S, Hoffmann A, et al. Cross-reactivity and epitope analysis of Pru a1, the major cherry allergen. *Mol Immunol* 1999;36:155-67.
4. Valenta R, Kraft D. Type 1 allergic reactions to plant-derived food: a consequence of primary sensitization to pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:893-5.
5. Radauer C, Breiteneder H. Pollen allergens are restricted to few protein families and show distinct patterns of species distribution. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:141-7.
6. Rudeschko O, Fahlbusch B, Steurich F, Schlenvoigt G, Jäger L. Kiwi allergens and their cross-reactivity with birch, rye, timothy, and mugwort pollen. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1998;8:78-84.
7. Bauer L, Ebner C, Hirschwehr R, Wüthrich B, Pichler C, Fritsch R, et al. IgE cross-reactivity between birch pollen, mugwort pollen and celery is due to at least three distinct cross-reacting allergens: immunoblot investigation of the birch-mugwort-celery syndrome. *Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 1996;26:1161-70.
8. Schocker F, Lüttkopf D, Müller U, Thomas P, Vieths S, Becker WM. IgE binding to unique hazelnut allergens: Identification of non pollen-related and heat-stable hazelnut allergens eliciting severe allergic reactions. *European Journal of Nutrition* 2000;39:172-80.
9. Hirschwehr R, Valenta R, Ebner C, Ferreira F, Sperr W R, Valent P, et al. Identification of common allergenic structures in hazel pollen and hazelnuts: a possible explanation for sensitivity to hazelnuts in patients allergic to tree pollen. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:927-36.
10. Alan Ş. Zonguldak ili atmosferinin polen ve spor analizi (2003-2004) [Tez]. Zonguldak: Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, 2004.
11. İnceoğlu Ö, Pınar NM, Şakıyan N, Sorkun K. Airborne pollen concentration in Ankara, Turkey 1990-1993. *Grana* 1994;33:158-61.
12. Ayvaz A, Baki A, Doğan C. Trabzon atmosferindeki aeroallerjenlerin mevsimsel dağılımı. *Asthma Allergy Immunol* 2008;6:11-6.
13. de Groot H, de Jong NW, Vuijk MH, van Wijk GR. Birch pollinosis and atopy caused by apple, peach, and hazelnut; comparison of three extraction procedures with two apple strains. *Allergy* 1996;51:712-8.
14. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
15. Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
16. Müller Ü, Lüttkopf D, Hoffmann A, Petersen A, Becker WM, Schocker F, et al. Allergens in raw and roasted hazelnuts (*Corylus avellana*) and their cross-reactivity to pollen. *Eur Food Res Technol* 2000;212:2-12.
17. Breiteneder H, Radauer C. A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:821-30.