

**UNIVERZITET U BEOGRADU**

**HEMIJSKI FAKULTET**

**Jana V. Ognjenović**

**Imunološka karakterizacija polena lipa  
i modulacija imunskog odgovora  
prirodnim aromatičnim jedinjenjima**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2013**

**UNIVERSITY OF BELGRADE**

**FACULTY OF CHEMISTRY**

**Jana V. Ognjenović**

**Immunological characterization of the  
linden pollens and modulation of the  
immune response by naturally  
occurring aromatic compounds**

**Doctoral Dissertation**

**Belgrade, 2013**

## **Članovi komisije:**

1. Dr Tanja Ćirković Veličković, redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (mentor)
2. dr Marija Gavrović-Jankulović, redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. dr Marina Atanasković- Marković, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
4. dr Katarina Smiljanić, naučni saradnik Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
5. dr Dragana Stanić-Vučinić, viši naučni saradnik Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane:

## **Zahvalnica**

*Zahvaljujem se svom mentoru, dr Tanji Ćirković Veličković, na podršci i savetima tokom izrade doktorskog rada, kao i na prilici da radim na nadasve zanimljivim i značajnim projektima. Njen entuzijazam i predanost nauci su nešto čemu ću težiti u svom budućem radu.*

*Zahvalna sam članovima komisije (dr Gavrović-Jankulović, dr Atanacković-Marković, dr Stanić-Vučinić i dr Smiljanić) na detaljnoj obradi završnog rada.*

*Dugujem svoju zahvalnost posadama laboratorije 434 i SHD-a bez kojih bi svakodnevni rad bio jednoličan i višestruko mukotrpniji.*

*Hvala studentkinjama Ani Milošević i Sari Trifunović na pomoći pri izradi dela ove teze.*

*Ceo ovaj rad ne bih mogla da izvedem do kraja da nije bilo prijatelja koji su bili uz mene kada je bilo najteže. Hvala Ani Parabucki, Milici Grozdanović, Sari Trifunović, porodici Parabucki i Pusu.*

*Zahvalnost dugujem inostranim institutima u kojima su neki od rezultata ove teze nastali (Istraživačka stanica Petnica, Istraživački centar Borstel u Nemačkoj i CSIC institut u Granadi, Španija), kao i alergičnim prijateljima koji su pristali da svojom krvlju daju (ne)merljiv doprinos ovom radu.*

*Konačno, najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima koji su mi pružali bezrezervnu podršku tokom studija i tokom izrade ovog rada. Njima posvećujem ovu doktorksu tezu.*

# **Naziv: Imunološka karakterizacija polena lipa i modulacija imunskog odgovora prirodnim aromatičnim jedinjenjima**

## **Izvod**

Učestalost pojave alergijskog sindroma u poslednjih par decenija je značajno uvećana, te se alergije i alergijska oboljenja danas često nazivaju „bolest 21. veka“. Prema trenutnim podacima, oko 25% svetske populacije pati od nekog oblika alergije, dok u ekonomski razvijenim zemljama taj procenat seže i do 40%. Postoji nekoliko hipoteza koje pokušavaju da objasne ovaj trend porasta učestalosti alergijske reakcije, ali uzrok još uvek nije poznat.

Alergijska reakcija se javlja kada IgE antitela alergične osobe prepoznaju specifične proteine iz polena, tzv. alergene. Poleni drveća, trava i korovskih biljaka smatraju se jednim od najčešćih izvora alergena, te samim tim i izazivačima alergijske reakcije. Alergeni potencijal specifičnog polena ne zavisi samo od alergične osobe, već i od godišnjeg doba i geografskog regiona. Tako, za predeo severne Evrope karakteristična je alergija na polen breze (*Betula verrucosa*), dok je u predelu južne Evrope i Mediterana prisutna alergija na polen masline (*Olea europea*). Međutim, pored ovih poznatih izvora alergena, nije izučeno da li poleni drugih široko raspostranjenih biljnih vrsta izazivaju alergijske reakcije. U ovoj doktorskoj disertaciji je izučavan alergijski odgovor na polen korišćenjem dva model sistema. U prvom je izučavana alergija humane populacije na polen lipa, dok je u drugom izučavan alergijski odgovor populacije kućnih pasa na polen kratke ambrozije.

U ovoj doktorskoj disertaciji je, po našem saznanju, po prvi put urađena karakterizacija alergenog potencijala polena lipa u humanoj populaciji. Takođe, u ovom radu prikazana je analiza ukrštene reaktivnosti polena lipa sa polenima masline i breze u humanim populacijama iz različitih geografskih i klimatskih regiona. Naši rezultati ukazuju da je lipa potencijalni izvor alergena, da postoji visok stepen ukrštene reaktivnosti sa polenima drugih vrsta drveća i da je potrebno uvrstiti ovaj polen u kliničku paletu polena koja se koristi u alergološkoj dijagnostici. Takođe, u ovoj disertaciji potvrđeno je da polen kratke ambrozije u Srbiji uzrokuje atopični dermatitis kod populacije kućnih pasa, određeni su njegovi glavni alergeni izazivači, urađena je

uporedna analiza profila alergijskih reakcija pasa i humanih pacijenata na polen ambrozije, i ustanovljene sličnosti i razlike u karakteru i identitetu glavnih alergena.

Pored opisivanja novih izvora alergena i karakterizacije pojedinačnih alergena, u ovoj disertaciji ispitivani su i mehanizmi kojim prirodne aromatične supstance sa dokazanim blagotvornim dejstvima po organizam modulišu imuni odgovor na nivou strukture alergena, signalnih kaskada i ćelija imunskog sistema. U ovom radu pokazano je da polifenoli zelenog čaja interaguju sa glavnim alergenom kokošijeg jajeta, ovalbuminom, i da utiču na njegovu strukturu i imunske reakcije u koje je uključen ovaj alergen. Takođe, pokazan je i uticaj polifenola na modulaciju imunskog odgovora na nivou promene signalnih kaskada u mononuklearnim ćelijama periferne krvi, a pod kontrolom citokina IL-4.

U zaključku, rezultati ove doktorske disertacije doprinose boljem razumevanju mehanizama kojim sastojci hrane modulišu alergijske reakcije, a takođe su značajni za unapređenje dijagnostike i tretmana alergijskih oboljenja.

**Ključne reči:** Polenske alergije, polen lipe, polen breze, polen masline, polen ambrozije, pseći atopični dermatitis, modulacija imunskog odgovora, katehini zelenog čaja, ovalbumin, IL-4 signalni put.

**Naučna oblast:** Prirodno-matematičke nauke

**Uža naučna oblast:** Biohemija

**UDK broj:** 577.27

# **Title: Immunological characterization of the linden pollens and modulation of the immune response by naturally occurring aromatic compounds**

## **Abstract**

The prevalence of allergic reactions has increased significantly in the last few decades, which prompted the scientific community to name allergies and allergic disorders as “the disease of the 21<sup>st</sup> century”. According to the current data, approximately 25% of the world population suffers from some form of allergy, whereas this number approaches 40% in the Western industrialized countries. Several hypotheses had been put forward in an attempt to explain the basis for the increase in the allergy prevalence, yet the cause remains unknown.

An allergic reaction appears when the IgE antibodies of the allergic individual recognize specific proteins from the pollen, which are called allergens. Perhaps the most frequent sources of allergens and causes of allergies are the pollens from trees, grasses and weeds. The allergenic potential of the particular pollen depends not only on the allergic individual, but also on the season and geographic region. For instance, allergy against the birch pollen (*Betula verrucosa*) is present in the Northern Europe, whereas the allergic reaction to the olive tree pollen (*Olea europea*) is widespread in the Southern Europe and Mediterranean. However, besides the well-known sources of allergens, it is not clear if pollens from other plant species that are well distributed across the continent are capable of eliciting the allergic response. In this doctoral thesis, the allergic response to pollen was studied by using two model systems. In one, the allergic response of human patients against the linden pollen was characterized, while in the other, the canine allergy in Serbia against the pollen from short ragweed was studied.

Herein, a detailed characterization of the allergenic potential of the linden pollen among human patients is presented for the first time. Also, results supporting the cross-reactivity between the pollens from the linden, birch, and olive trees in patients from distinct climate and geographic regions in Europe are shown. The findings suggest that the linden tree is a potential source of allergens, that there is a significant level of cross-reactivity between the linden tree pollen and the pollens from other tree species, and that it is advisable to incorporate the linden pollen into the clinical palette of allergens.

Furthermore, the results confirm that the short ragweed pollen causes the canine atopic dermatitis, reveal the identity of the major allergens, and explain both similarities and differences in the allergic reaction profile between humans and dogs.

Besides the description and characterization of new allergen sources and individual allergens, the mechanisms by which naturally occurring aromatic substances, which have beneficial effect on human health, modulate immune response at the level of allergen structure, signaling cascade in the cells and the immune cells antigen uptake, were examined. The findings show that the green tea polyphenols, catechins, interact with the major food allergen from the hen egg white, ovalbumin, and that they affect the structure of the allergen and immune reactions in which this allergen participates. In addition, the effects of polyphenols on change in the signaling cascade of peripheral blood mononuclear cells under the control of the cytokine IL-4 are described.

In conclusion, the results of the doctoral thesis presented herein might be important for improving both diagnostics and treatment of allergic diseases, and for the improved understanding of the mechanisms by which food components modulate allergic responses and reactions.

**Key words:** Pollen allergy, linden pollen, birch pollen, olive pollen, modulation of immune response, canine atopic dermatitis, green tea catechins, ovalbumin, IL-4 signal cascade.

**Scientific field:** Life sciences

**Scientific discipline:** Biochemistry

**UDK number:** 577.27



## Spisak skraćenica

APĆ – antigen prezentujuće ćelije  
APS- amonijum-persulfat  
BCIP - 5-bromo-4-hloro-indolil fosfat  
BFP- bromfenol plavo  
BSA - goveđi serum albumin (*Bovine Serum Albumin*)  
CBB - *Comasie Brilliant Blue*  
CD - cirkularni dihidroizam  
DNK – dezoksiribonukleinska kiselina  
EDTA - etilendiamin tetrasirćetna kiselina  
ELISA - enzim-povezani imunosorbentni esej (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)  
FACS – protočni citometar (*Fluorescence Activated Cell Sorter*)  
FITC – fluorescein izotiocijanat  
IEF – izoelektrično fokusiranje  
IFN – interferon  
Ig – imunoglobulin  
IL – interleukin  
MHC - glavni kompleks histokompatibilnosti (*Major Histocompatibility Complex*)  
MM – molekularni markeri  
MS – masena spektroskopija  
NBT - 4-nitroblue tetrazolium  
NC- nitroceluloza  
SDS-PAGE - natrijum dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (*Sodium Dodecylsulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*)  
TBS - TRIS-om puferisan fiziološki rastvor (*TRIS Buffer Saline*)  
TCA- trihlorsirćetna kiselina  
TEMED - N,N,N',N'-tetrametiletildiamine

# Sadržaj

1. Uvod .....	12
2. Opšti deo.....	14
2.1. Alergije .....	14
2.2. Mehanizam alergijske reakcije.....	15
2.3. Dijagnostika alergena.....	18
2.4. Terapija alergija .....	18
2.5. Nomenklatura alergena.....	19
2.6. Polen i polenske alergije.....	20
2.6.1. Alergije na polen drveća.....	21
2.6.2. Alergije na polen korovskih biljaka.....	25
2.7. Alergijski odgovor kod pasa, atopični dermatitis.....	26
2.8. Modulacija imunskog odgovora .....	27
2.8.1. Interakcije polifenola i alergena.....	28
2.8.2. Uticaj polifenola na ćelijsku signalizaciju.....	30
3. Cilj istraživanja .....	32
4. Rezultati .....	33
4.1. Karakterizacija alergena potencijala polena lipe ( <i>Tilia tomentosa</i> ).....	33
4.1.1. Određivanje veličine polenskog zrna lipe mikroskopskim metodama.....	33
4.1.2. <i>In vivo</i> vezivanje IgE .....	34
4.1.3. <i>In vitro</i> vezivanje IgE .....	36
4.1.4. Određivanje ukrštene reaktivnosti sa polenom masline i breze.....	38
4.1.5. Imunoproteomska karakterizacija alergena polena lipe .....	44
4.2. Imunoproteomska karakterizacija alergena ambrozije ( <i>Ambrosia artemisiifolia</i> ) kod pasa.....	47
4.2.1. Molekulska karakterizacija glavnih alergena ambrozije u psećem atopijskom dermatitisu pomoću 2D elektroforeze i 2D imunoblota.....	47
4.2.2. Identifikacija proteina ambrozije koji su pokazali imunoreaktivnost na 2D blotu sa 2D gela pomoću nLC-MS/MS .....	48
4.3. Modulacija imunskog odgovora polifenolima zelenog čaja.....	52
4.3.1. Spektrofluorimetrija i izotermalna titraciona kalorimetrija ovalbumina u prisustvu EGCGa.....	52
4.3.2. Vezivanje EGCG za OVA izaziva promene u sadržaju sekundarne strukture u OVA .....	54
4.3.3. Pronalaženje mogućih vezivnih mesta za EGCG na površini OVA korišćenjem metoda kompjuterske simulacije vezivanja molekula.....	55
4.3.4. Vezivanje EGCG za OVA ne sprečava aktivaciju bazofila u pacijentima alergičnim na kokošije jaje.....	57
4.3.5. EGCG sprečava apsorpciju OVA od strane monocita.....	59
4.3.6. Katehini zelenog čaja inhibiraju fosforilaciju STAT6 od strane IL-4.....	60
5. Diskusija.....	62
5.1. Karakterizacija alergena polena lipe ( <i>Tilia tomentosa</i> ).....	62
5.2. Imunoproteomska karakterizacija alergena ambrozije ( <i>Ambrosia artemisiifolia</i> ) kod pasa.....	64
5.3. Modulacija imunskog odgovora polifenolima zelenog čaja.....	68

<b>6. Zaključak .....</b>	<b>74</b>
<b>7. Eksperimentalni deo .....</b>	<b>75</b>
<b>7.1. Konfokalna mikroskopija polena.....</b>	<b>75</b>
<b>7.2. Priprema ekstrakta polena .....</b>	<b>75</b>
<b>7.3. Određivanje koncentracije proteina .....</b>	<b>75</b>
<b>7.4. Elektroforetske tehnike.....</b>	<b>76</b>
7.4.1. Natrijum dodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE).....	76
7.4.2.1. Izoelektrično fokusiranje (IEF).....	80
7.4.2.2. Izoelektrično fokusiranje visoke rezolucije na IPGphore trakama .....	81
7.4.3. Dvodimenzionalna poliakrilamid gel elektroforeza (2D PAGE).....	83
<b>7.5. Digestija proteina u gelu i analiza peptida masenom spektrometrijom .....</b>	<b>83</b>
<b>7.6. Elektrotransfer proteina sa PAA gela na nitroceluloznu ili PVDF membranu .....</b>	<b>85</b>
<b>7.7. Detekcija proteina u imunoblotu.....</b>	<b>85</b>
7.7.1 Opšti protokol.....	85
7.7.2 Detekcija alergena korišćenjem seruma pacijenata .....	87
<b>7.8. ELISA testovi .....</b>	<b>87</b>
7.8.1. Indirektni ELISA test.....	87
<b>7.9. Kožne probe .....</b>	<b>89</b>
<b>7.10. Funkcionalni <i>in vitro</i> testovi.....</b>	<b>90</b>
7.10.1. Test aktivacije bazofila .....	90
7.10.2. Test proliferacije limfocita .....	90
<b>7.11. Cirkularni dihroizam (CD).....</b>	<b>91</b>
<b>7.12. Spektrofluorimetrija .....</b>	<b>91</b>
<b>7.13. Izotermalna titraciona kalorimetrija (ITC).....</b>	<b>92</b>
<b>7.14. <i>In silico</i> simulacija vezivanja katehina za ovalbumin .....</b>	<b>92</b>
7.14.1. Priprema proteinske strukture.....	92
7.14.2. Priprema strukture liganda.....	93
7.14.3. Studija “ukotvljavanja” .....	93
<b>7.15. Preuzimanje proteina od strane monocita .....</b>	<b>93</b>
<b>7.16. Priprema i karakterizacija katehina zelenog čaja.....</b>	<b>94</b>
7.16.1. Priprema ukupnih fenolnih jedinjenja iz suplemenata zelenog čaja.....	94
7.16.2. Određivanje ukupne koncentracije katehina zelenog čaja .....	94
<b>7.17. Primarna kultura monojedarnih ćelija periferne krvi (PBMC).....</b>	<b>95</b>
<b>8. Reference.....</b>	<b>96</b>
<b>9. Prilog A: Radovi koji čine deo disertacije .....</b>	<b>108</b>
<b>10. Biografija autora .....</b>	<b>109</b>

# 1. Uvod

Činjenica da je učestalost pojave alergijskog sindroma u poslednjih par decenija značajno uvećana, dovela je do toga da se alergije danas često nazivaju i „bolest 21. veka“. Prema trenutnim podacima oko 25% svetske populacije pati od nekog oblika alergije, dok u ekonomski razvijenim zemljama taj procenat seže i do 40%. Postoji nekoliko hipoteza koje pokušavaju da objasne ovaj trend porasta učestalosti alergijske reakcije, ali uzrok još uvek nije poznat (von Mutius, 2007; Wjst, 2009).

Polen se smatra jednim od najčešćih izazivača alergijske reakcije. Alergijska reakcija se javlja kada IgE antitela alergične osobe prepoznaju specifične proteine ili glikoproteine iz polena, tzv. alergene. Glavni izvori alergena su poleni drveća, trava i korova (D'Amato, Cecchi, Bonini, Nunes, Annesi-Maesano, Behrendt, et al., 2007). Za predeo severne Evrope karakteristična je alergija na polen breze (*Betula verrucosa*), dok je predeo južne Evrope i Mediterana okarakterisan alergijom na polen masline (*Olea europea*) (D'Amato & Liccardi, 1994). Zanimljivo je da uprkos širokoj rasprostranjenosti lipe po celom evropskom kontinentu, alergija na polen ove biljne vrste još uvek nije opisana. Nedostatak podataka o alergijskom odgovoru na lipu može pre svega biti posledica preklapajućih sezona polinacije ovog drveta sa drugim biljnim vrstama koje su poznati izvori alergena. Drugim rečima, imuna reakcija na alergene lipe je ili prikrivena reakcijom na slične alergene prisutne u polenima drugih vrsta ili je pogrešno dijagnostifikovana kao alergija na već poznati izvor polenske alergije. U tom smislu, karakterizacija novih potencijalnih alergena kao što je lipa predstavlja važan korak koji vodi do bolje dijagnostike i terapije alergijskih oboljenja.

Alergije nisu karakteristične samo za humanu populaciju. Na primer, atopični dermatitis je vrlo rasprostranjena pojava u populaciji pasa (Olivry, Dunston, Murphy, & Moore, 2001). Kao glavni uzročnici ovog oboljenja označeni su grinje i polen, a pogotovu polen ambrozije. Obzirom da je polen ambrozije detaljno ispitan na populaciji humanih atopičnih pacijenata, interesantno je bilo istražiti da li jedan tako dobro okarakterisan izvor alergena uzrokuje atopični dermatitis (AD) kod populacije pasa, i ukoliko je ishodni rezultat pozitivan, odrediti njegove glavne alergene izazivače.

Opisivanje novih izvora alergena, kao i karakterizacija pojedinačnih alergena je vrlo bitan korak u razumevanju alergije kao fenomena. Međutim, ono što nam još više

daje uvida u to kako se alergija, kao neadekvatna reakcija imunskog sistema uopšte javlja, jeste ispitivanje mehanizama odgovornih za podešavanje odnosno modulaciju imunskog odgovora na nivou ćelije, signalnih kaskada i strukture alergena.

Zeleni čaj je svakodnevna namirnica sa dokazanim blagotvornim dejstvima po organizam (Butt & Sultan, 2009; R. Singh, Akhtar, & Haqqi, 2010). U svakodnevnoj ishrani može doći do mešanja zelenog čaja sa drugim namirnicama koje se unose, kao što je npr. mleko. Pokazano je da prirodni polifenoli zelenog čaja mogu da interaguju sa alergenima hrane, što dovodi do strukturne promene alergena, a samim tim i do modulacije imunskog odgovora (Gruber, Vieths, Wangorsch, Nerkamp, & Hofmann, 2004; Yuksel, Avci, & Erdem, 2010). U skladu sa tim, korisno je bilo ispitati interakcije između polifenola zelenog čaja i jednog od glavnih alergena hrane, ovalbumina, i biološke posledice takvih interakcija na ćelijskom nivou. Pored direktnog uticaja na strukturu alergena, polifenoli zelenog čaja mogu da modulišu imuni odgovor na nivou signalnih kaskada. U tom smislu, bilo je važno opisati mehanizam pod kojim ove supstance utiču na signalnu kaskadu koja je važna za započinjanje i održavanje alergijskog odgovora na primeru mononuklearnih ćelija periferne krvi, PBMC (engl. **Peripheral Blood Mononuclear Cells**).

## 2. Opšti deo

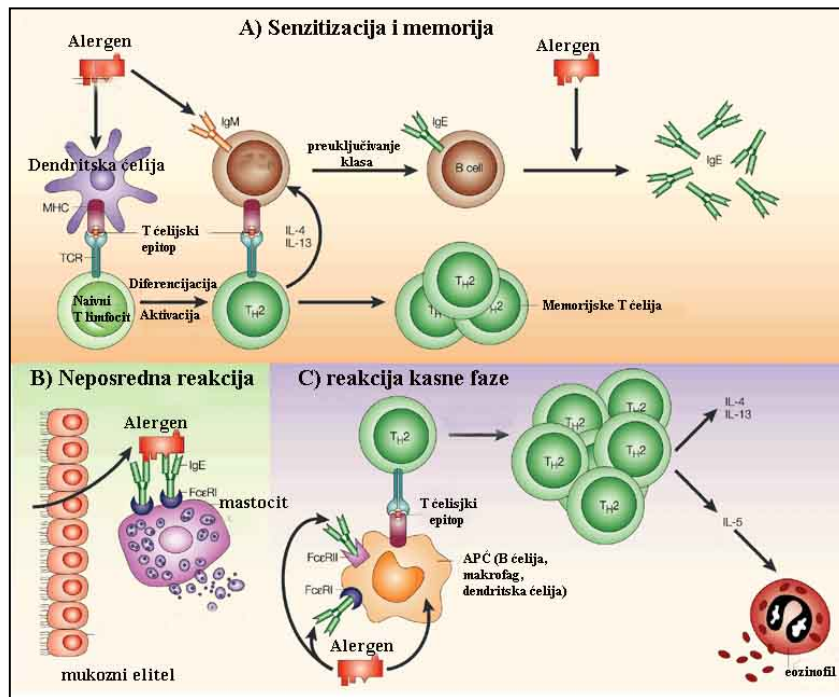
### 2.1. Alergije

Imuni sistem predstavlja odbrambeni sistem organizma i kod kičmenjaka je razvijen prevashodno u cilju odbrane od patogenih mikroorganizama. Međutim, u nekim slučajevima ovaj odgovor može biti preteran, neadekvatan, te se naziva reakcija preosetljivosti. Alergija je najčešća od četiri forme preosetljivosti i formalno se naziva reakcijom preosetljivosti tipa I. Imuni sistem alergičnih osoba prepoznaje kao štetne, bezopasne supstance koje se nalaze u životnoj okolini i u kontaktu sa njima dovodi do aktivnih imunih odgovora. Alergijski simptomi, kao što su alergijski rinitis, konjuktivitis, astma, dermatitis, gastrointestinalni simptomi i anafilaktički šok, uzrokovani su oslobađanjem inflamatornih medijatora iz mastocita nakon njihove aktivacije (Rosen & Mackay, 2001). Supstance koje izazivaju alergijsku reakciju nazivaju se alergenima i najčešće su proteinske prirode. Izvori alergena najčešće su grinje, poleni drveća, trava i korova, životinjska dlaka, i različite hranljive namirnice biljnog i životinjskog porekla.

U današnje vreme alergija je označena kao peta po redu najčešća hronična bolest kod odraslih, a treća kod osoba mlađih od 18 godina. Međutim, ljudi su znali za alergijske reakcije od davnina što pokazuje i verovatno najstariji zapis o alergijama koji je nastao 3,500 godina p.n.e. i u kome stoji da je kralj Egipta Menses preminuo od posledica ujeda ose. Rimski pesnik i filozof Tit Lukrecije Kar (97-55 p.n.e) primetio je kod nekih ljudi neuobičajene, preterane odgovore na supstance koje se normalno nalaze u prirodi i u svom delu „*De Rerum Natura*“ („O prirodi stvari“), koje će kasnije imati velikog uticaja na Vergilija i ostale rimske pesnike, piše „ono što je za jednog čoveka hrana, za drugog može biti snažan otrov“. Moderna era alergologije počinje u 19. veku kada Džon Bostok opisuje polensku groznicu, a Čarls Blekli identifikuje polen kao uzročnik alergijskih simptoma. Naziv „alergija“ prvi je 1906. upotrebio austrijski pedijatar Klemens fon Pirket, da bi označio čudne simptome koji nisu povezani sa drugim bolestima, a koje su neki od difteričnih pacijenata iskazivali nakon tretmana sa konjskim antitoksinskim serumom. Reč potiče od grčkih reči „alol“ što znači „drugačije“ i „ergon“ što znači „stanje“, da bi naznačilo izmenjenu sposobnost organizma da reaguje na strane supstance. Prvi alergen koji je opisan je Amb a1 (Sahoo, 1999) koji je svojevremeno nazvan „antigen E“ (King, Norman, & Connell, 1964).

## 2.2. Mehanizam alergijske reakcije

Alergijska reakcija ne javlja se odmah pri prvom izlaganju alergena imunom sistemu. Naime, pri prvom susretu sa alergenom, antigen-prezentujuće ćelije (APĆ) (dendritične ćelije, makrofagi i B ćelije) fagocituju alergen i digestuju ga do peptida endozomalnim proteazama. Ova faza je poznata kao procesovanje antigena. Nakon procesovanja antigena dolazi do prikazivanja nastalih peptida naivnim T ćelijama u sklopu kompleksa sa odgovarajućim MHC molekulima klase II. Prepoznavanje peptid-MHC kompleksa od strane T ćelijskih receptora (TCR) dovodi do umnožavanja naivnih T ćelija u procesu klonalne ekspanzije. Nakon toga, T ćelije se diferenciraju u alergen-specifične pomoćne T ćelije, Th2 limfocite. Th2 ćelije, pak, luče citokine IL-4, IL-5 i IL-10 koji dalje stimulišu diferenciranje naivnih B ćelija u memorijske B ćelije. Istovremeno, IL-4 i IL-13 stimulišu klonalnu ekspanziju memorijskih B ćelija i u njima promenu klase imunoglobulina u IgE. Stimulisane B ćelije proizvode IgE koji se vezuje visokom afinitetom za IgE receptore (FcεRI). Ovi receptori nalaze se na površini mastocita u tkivima, i bazofila i eozinofila u krvi. Interakcijom između IgE i FcεRI završava se prva faza alergijskog odgovora koja je poznata kao senzitivizacija (*Slika 2.1.*). Prilikom sledećeg susreta sa alergenom, dolazi do njegovog vezivanja za IgE molekule koji su već prisutni na mastocitima (Valenta, 2002). Vezivanje više alergena za IgE antitela dovodi do umrežavanja FcεRI receptora, što dalje dovodi do oslobađanja inflamatornih medijatora (histamin, leukotrijeni, prostaglandini, faktori aktivacije krvnih pločica i citokini) iz sekretornih granula mastocita. Već u prvih nekoliko minuta ovi molekuli uzrokuju mnoge patofiziološke promene, poput kontrakcije mišića glatke muskulature, produkcije mukusa i povećane propustljivosti krvnih sudova, koji su odgovorni za akutne simptome alergijske reakcije. Medijatori su, pored ovih trenutnih promena, odgovorni i za pokretanje i održavanje dugotrajnijih inflamatornih procesa vezanih za prikupljanje Th2 limfocita, eozinofila, bazofila i monocita na mestu kontakta alergena i imunskog sistema. Rekrutovane ćelije potom luče inflamatorne faktore koji uzrokuju simptome rane faze alergijske reakcije i oštećenje lokalnog tkiva (*Slika 2.1.*).



Slika 2.1. – Mehanizam alergijske reakcije. Preuzeto i modificirano iz (Valenta, 2002).

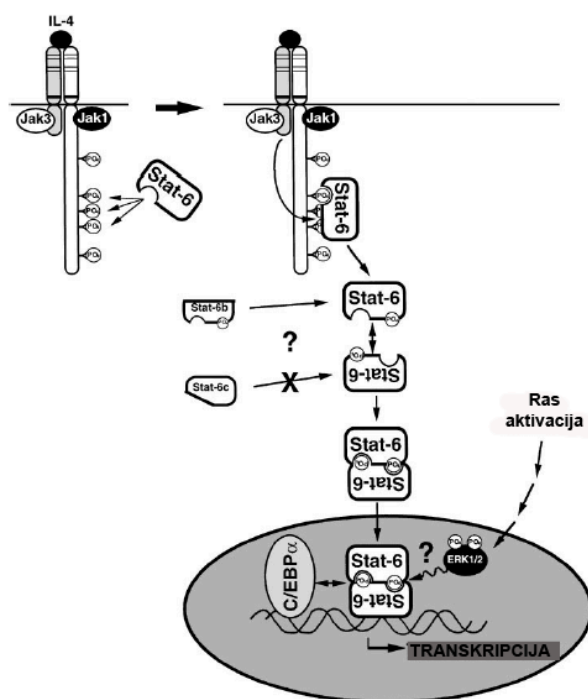
Reakcija kasne faze javlja se kod alergičnih pacijenata koji imaju hronične manifestacije atopije. Na mestu kontakta sa alergenom T ćelije se reaktiviraju, dolazi do klonske ekspanzije, a pored IL-4 i IL-13 one luče i IL-5 koji privlači i aktivira eozinofile na mestu kontakta sa alergenom. Aktivirani eozinofili oslobađaju sadržaj svojih granula što može dovesti do masovnog zapaljenja i ozbiljnih oštećenja tkiva kod hronično alergičnih osoba.

Postoji par hipoteza koje pokušavaju da daju odgovor na pitanje zašto dolazi do pojave alergijske reakcije. Jedna od najpopularnijih jeste tzv. higijenska hipoteza (von Mutius, 2007) koja objašnjava da je do pojave alergijskog Th2 odgovora došlo, jer se u sadašnjem modernom dobu mlad organizam ne izlaže infektivnim agensima i parazitima, te dolazi do nepotpunog razvoja imunskog sistema. Izbegavanjem infektivnih agenasa ne koristi se i ne razvija Th1 imuni odgovor, što ostavlja prostor za razvoj alergijskog odgovora posredovanog Th2 ćelijama. U prilog ovoj hipotezi često se navodi činjenica da je primećen porast alergičnih osoba u industrijalizovanim zemljama, što se objašnjava boljim higijenskim uslovima i manjom izloženošću patogenima. Sa druge strane, protivnici ove hipoteze navode kao činjenicu da je u tim istim industrijalizovanim zemljama primećeno povećanje učestalosti autoimunih oboljenja koja su Th1 indukovana. U poslednjih desetak godina sve više činjenica govori u prilog



tome da su Th1 i Th2 odgovori samo dve ekstremne forme, a ne potpuno nezavisni CD4<sup>+</sup> Th ćelijski odgovori (Kidd, 2003; Muraille & Leo, 1998).

Važnu ulogu u razvoju alergijskog odgovora ima IL-4. Interleukin-4 je multifunkcionalni citokin koji reguliše diferenciju antigen-stimuliranih naivnih T limfocita u Th2 limfocite, koje dalje luče IL-4, ali i druge citokine, poput: IL-5, IL-10 i IL-13. Druga, vrlo važna fiziološka funkcija IL-4 je kontrola specifičnosti prilikom imunskoglobulinskog prekopčavanja klasa. Ovaj citokin utiče na humane B limfocite da promene ekspresiju imunskoglobulina u IgE i IgG4, dok kod mišijih B limfocita dovodi do ekspresije IgE i IgG1 imunskoglobulina (Takeda, Tanaka, Shi, Matsumoto, Minami, Kashiwamura, et al., 1996).



Slika 2.2. – Prikaz IL-4/IL-4R signalnog puta. Preuzeto i modifikovano iz (Takeda, et al., 1996)

Ove efekte IL-4 postiže nakon vezivanja za  $\alpha$ -lanac IL-4 receptora i zajednički  $\gamma$ -lanac, što dovodi do pokretanja JAK-STAT (engl. “Janus kinases”, “signal transducers and activators of transcription”) signalne kaskade (Slika 2.2.). Vezivanje citokina za receptor dovodi do aktivacije JAK1 i JAK3 kinaza, koje dalje fosforilišu i aktiviraju signalne molekule u citoplazmi STAT6. Fosforilisani STAT6 molekuli se dimerizuju i translociraju u jedro, gde utiču na gensku ekspresiju vezivanjem za specifične DNK elemente.

## 2.3. Dijagnostika alergena

Dijagnostika alergije na neki izvor započinje analizom simptoma i kliničke istorije pacijenta. Najčešći laboratorijski testovi koji se koriste prilikom utvrđivanja alergija su *in vivo* (kožne probe) i *in vitro* metode (utvrđivanje prisustva specifičnih IgE antitela u serumu i testovi aktivacije bazofila).

Kožne probe izvode se nanošenjem kapi alergena rastvorenog u puferu ispod kože na unutrašnjoj stranu podlaktice. Pozitivnim rezultatom smatra se pojava otoka čiji je prečnik za barem 3 mm veći od otoka koji se javlja u negativnoj kontroli, dok se reakcija pri kojoj je prečnik otoka veći za preko 8 mm od kontrolnog uzorka smatra jakom pozitivnom reakcijom koja ukazuje na mogućnost kliničke reaktivnosti (Antunes, Borrego, Romeira, & Pinto, 2009). Međutim, iako se kožni test ne smatra preterano pouzdanim i dalje se rutinski izvodi u alergološkim klinikama zbog svoje velike osetljivosti, brzine izvođenja i niske cene. Dodatni problem ovog testa je i taj što na očekivane prečnike otoka utiču starost pacijenta, prethodno izlaganje pacijenta alergenu, kao i priroda samog alergena.

*In vitro* IgE testovi zasnivaju se na inkubaciji specifičnih IgE antitela iz seruma pacijenta sa potencijalnim alergenima koji su prethodno imobilizovani na čvrstom nosaču (Wide, Bennich, & Johansson, 1967). Vezivanje alergen-specifičnih IgE antitela prati se dodatkom specifičnih anti-IgE antitela koji imaju za sebe vezan sistem detekcije. U zavisnosti od korišćenog sistema za detekciju razlikujemo nekoliko testova: radioalergosorbentni test, modifikovani radioalergosorbentni test, fluorescentni alergosorbentni test i, u novije vreme, CAP test. Prednosti ovih testova u odnosu na kožne probe jesu mogućnost standardizacije, preciznije kvantifikacije rezultata, bezbednost pacijenta, kao i mogućnost dužeg skladištenja uzoraka. Napredovanje tehnologije utiče na smanjenje cene ovih testova, njihovu automatizaciju i povećane mogućnosti višestrukih simultanih analiza IgE antitela.

## 2.4. Terapija alergija

Još uvek se intenzivno radi na iznalaženju imunoterapija koje bi omogućile da se neodgovarajuće reakcije imunskog sistema isprave ili bar ublaže. Kada je reč o alergijama, još uvek ne postoji univerzalni efikasni lek za njih i lekari preporučuju, kada

god je to izvodljivo, izbegavanje alergena kao prvi korak u tretmanu alergijskih oboljenja. U nekim slučajevima, kao kod polenskih alergija, izbegavanje alergena nije u potpunosti moguće, i tada se primenjuju farmakoterapija i/ili imunoterapija. Farmakoterapija reguliše simptome alergijske reakcije, pri čemu se najčešće primenjuju antagonisti H<sub>1</sub>-receptora (antihistaminici), selektivni β<sub>2</sub>-agonisti (koji relaksiraju mišiće bronhija) i inhalacioni kortikosteroidi. Međutim, alergen-specifična imunoterapija (ASIT) predstavlja jedini tretman koji se bazira na tretiranju uzroka alergijskih reakcija i koja ublažava alergijske simptome i nekoliko godina nakon završene terapije (Durham, Walker, Varga, Jacobson, O'Brien, Noble, et al., 1999). Prilikom ASIT-a alergični pacijent tretira se specifičnim alergenom, intaktnim ili hemijski modifikovanim (alergoid), sa ciljem da se pokrene mehanizam imunološke tolerance, a samim tim i smanjenje alergijskih simptoma prilikom sledećeg izlaganja alergenu (Bousquet, Lockey, Malling, Alvarez-Cuesta, Canonica, Chapman, et al., 1998). U klasičnom ASIT-u, postepeno rastuće doze solubilnog ekstrakta alergena injektuju se potkožno dok se ne postigne maksimalna doza, kada sledi period održavanja doze. Efikasnost ove vrste terapije varira i zavisi od više faktora: od prirode alergena na koji je pacijent osetljiv, kvaliteta i ukupne količine primenjenog alergena, kao i vremenskog rasporeda primene ASIT-a (Mackay & Rosen, 2001).

Alergijski odgovor ostavlja mnogo otvorenih pitanja o samom imunom sistemu i kako do danas ne postoji imunoterapija apsolutne uspešnosti, neophodno je nastaviti sa izučavanjem alergija kao i samih mehanizama modulacije alergijskog odgovora, jer nova saznanja mogu da unaprede kako dijagnostiku tako i tretman alergijskih oboljenja (Mackay & Rosen, 2001).

## **2.5. Nomenklatura alergena**

Na samom početku izolovanja i karakterizacije pojedinih alergenihi komponenti nazivi su alergenima davali sami naučnici, po svom nahodanju. Prvi alergen izolovan je 60.-tih godina prošlog veka iz ekstrakta polena ambrozije i nazvan je "antigen E", jer se pojavio kao jedna od pet precipitacionih linija u difuznom testu, obeleženih abecedno od A-E. Pojam glavnog alergena uveo je Dejvid Marš koji je glavni allergen definisao kao izolovani protein visoke čistoće, koji kod više od 90% alergičnih individua dovodi do neposredne pojave alergijske reakcije prilikom apliciranja u kožnim probama. Nasuprot glavnom, majornom alergenu, minorni, sporedni su definisani kao oni koji

dovode do reakcije kod <20% alergičnih pacijenata (Marsh, 1975). Danas se ipak, kao glavni alergen definiše onaj protein koji dovodi do pozitivne reakcije kod >50% alergičnih pacijenata u kožnim probama (Lowenstein, 1978).

Tokom XIII Međunarodnog Kolegijuma Alergologa u Kostanci, Nemačka, 1980. godine usvojeno je da se alergenima daju nazivi tako što će prva tri slova imena označavati prva tri slova roda, zatim prvo slovo vrste i na kraju brojem koji označava koji je po redu izolovan dati alergen iz tog izvora. Sama nomenklatura je do današnje verzije prošla kroz još par promena. Svetska zdravstvena organizacija, WHO (engl. **World Health Organization**) je izdala poseban spisak alergena 1986. godine sa finalno usvojenim sistemom za nomenklaturu alergena, pri čemu se poslednji broj danas piše arapskim ciframa i označava koji je po potentnosti dati alergen iz izvora. Tako se danas nekada nazvan antigen E, naziva Amb a 1 (*Ambrosia artemisiifolie*) (Chapman, 2008).

## 2.6. Polen i polenske alergije

Kao jedan od najčešćih uzorčnika alergije označava se polen različitih biljnih vrsta. Uloga polena je u oprašivanju, tj. reprodukciji biljaka (Edlund, Swanson, & Preuss, 2004). Zrela polenska zrna su vegetativne ćelije koje sadrže i spermatične ćelije. Polen nastaje u mikrosporangijama; ubrzo posle mejoze majke ćelije dolazi do asimetrične mitotičke deobe u kojoj nastaje velika ćelija koja guta manju sestrinsku, generativnu ćeliju. Nakon toga, generativna ćelija prolazi kroz drugu mitozu što za posledicu ima formiranje druge spermatične ćelije koja je neophodna za dvostruku fertilizaciju. "Troćelijski" polen završava ovu deobu pre nego što biva otpušten sa antere, dok "dvoćelijski" poleni prolaze kroz ovu deobu kasnije, tokom elongacije polenske tube. Polenske ćelije nalaze se unutar jedinstvenih polenskih zidova, koji nastaju zajedno sa mejocitozom, pri čemu se površinski slojevi formiraju vremenom. Kod zrelog polenskog zrna možemo razlikovati tri glavna sloja: (1) spoljašnji, **egzinski sloj**, koji je višeslojan i sastavljen od hemijski otpornih polimera sporopolenina sa otvorima koji se nazivaju apertusi, (2) **unutrašnji sloj**, koji isto može biti višeslojan i koji je sastavljen uglavnom od celuloze i (3) **polenski omotač**, koji je sastavljen od lipida, proteina, pigmenata i aromatičnih jedinjenja. Polenska zrna mogu biti vrlo različitih oblika, veličina i površinskih karakteristika. Smatra se da biljne vrste čija polenska zrna dostižu veličinu do 100 µm mogu biti oprašivane vetrom i da su stoga

mogući izvori alergija (Pleasant, Hellmich, Dively, Sears, Stanley-Horn, Mattila, et al., 2001).

Polensko zrno mehanički je vrlo otporno, što zajedno sa činjenicom da se poleni mogu razlikovati na osnovu različite površinske teksture dovodi do toga da se proučavanje polena danas koristi u forenzici, paleontologiji i arheologiji. Period polinacije (ili oprašivanja) biljaka zavisi od vrste kao i od klimatskih uslova. Tokom polinacije može se pronaći veliki broj čestica polena u vazduhu. Pogotovo velika koncentracija polenskih čestica može se naći tokom suvih i toplih jutarnjih delova dana. Za vreme trajanja polinacije respiratorni putevi izloženi su visokim koncentracijama polena, što predstavlja veliki problem za alergične pacijente. Dok pacijenti koji pate od alergija na komponente hrane mogu da izbegavaju hranljive namirnice koje sadrže alergene, pacijenti alergični na polen nemaju tu mogućnost i zato su stalno izloženi uticaju polena. Za pacijente alergične na neku vrstu polena, simptomi mogu nastati i kad nema samih polenovih zrna u vazduhu. Naime, pod određenim klimatskim uslovima polensko zrno može da se fragmentiše na manje, subpolenske čestice, koje mogu da prodru duboko u pluća i da izazovu još snažnije napade astme (Phelps, 2007). Zbog stalne izloženosti alergenima, alergije na polene je teško suzbiti i još teže lečiti.

### **2.6.1. Alergije na polen drveća**

Polen drveća je čest izvor alergijskih reakcija, pogotovo u rano proleće. Drveće proizvodi velike količine polena, što je dodatna otežavajuća okolnost za osetljive osobe. Kao najčešći uzročnici alergija u Evropi navode se polen breze (*Betula*) (D'Amato, et al., 2007) u severnoj, centralnoj i istočnoj Evropi, i polen masline (*Olea europea*) i čempresa (*Cupressus*) u Mediteranskim regionima (D'Amato & Liccardi, 1994).

#### **2.6.1.1. Alergije na polen breze**

Breza je označena kao najčešći uzročnik alergija u severnoj Evropi sa periodom polinacije koji uglavnom počinje krajem marta u zapadnoj, sredinom aprila u istočnoj, i traje do kraja maja u severnoj Evropi. Procenjena veličina polenskog zrna breze iznosi oko 20 µm (Sofiev, Siljamo, Ranta, & Rantio-Lehtimäki, 2006). U Evropi procenat

alergičnih osoba na alergene breze kreće se od 5% u Holandiji do 54% u Cirihiu (Švajcarska). Do sad je karakterisano 7 alergena iz polena breze (Bet v 1 do Bet v 7). Glavni alergen polena breze, Bet v 1, koji se takođe naziva i PR-10, je protein približne molekulske mase od 17 kDa. Oko 95% pacijenata alergičnih na polen breze poseduje specifična IgE antitela na Bet v 1. IgE antitela na Bet v 2, profilin i/ili Bet v 4, i kalcijum-vezujući protein su markeri za ukrštenu reaktivnost. Ako se kod pacijenta detektuje povećanje IgE antitela na ove komponente, ali ne i na Bet v 1, pacijent je verovatno primarno senzitivisan drugim polenom. IgE antitela na Bet v 2 su pokazatelji ukrštene reaktivnosti između mnogih polena i povrća, dok su IgE antitela na Bet v 4 pokazatelj ukrštene reaktivnosti samo između alergena različitih polena (Wolthers, 2012).

#### ***2.6.1.2. Alergija na polen masline***

Polen masline smatra se najvažnijim uzročnikom alergija na području Španije, južne Italije, Grčke i Turske. Period polinacije masline počinje u aprilu i traje do juna. Veličina polenskog zrna masline varira u zavisnosti od uzgajivača i iznosi do 29  $\mu\text{m}$  (Javady & Arzani, 2001). Do sad je identifikovano i okarakterisano 11 alergena iz ovog polena (Ole e 1 do Ole e 11). Glavni alergen je Ole e 1, koji izaziva alergijski odgovor kod više od 70% pacijenata alergičnih na maslinu. U pitanju je protein od 145 aminokiselina, sa kiselom pI vrednosti, i mestom glikozilovanja na Asn111. Fiziološka funkcija ovog proteina još uvek nije poznata, ali na osnovu njegove ćelijske distribucije i mestima ekspresije, pretpostavlja se da ima ulogu u komunikaciji između polenskog zrna i pistila tokom rasta polenske tube. Ole e 4 i Ole e 7 takođe su pokazani kao glavni alergeni masline. Zastupljenost alergena polena masline može da varira u zavisnosti od klimatskih faktora, kao i od geografskog predela u kojem alergični pacijenti žive (Hill & DeBoer, 2001; Sture, Halliwell, Thoday, van den Broek, Henfrey, Lloyd, et al., 1995). Neki od alergena su članovi poznatih proteinskih familija: profilinske (Ole e 2), kalcijum-vezujućih proteina (Ole e 3 i Ole e 8), superoksid dismutaze (Ole e 5) i proteina lipidnog transfera (Ole e 7) (Rodriguez, Villalba, Monsalve, & Batanero, 2001).

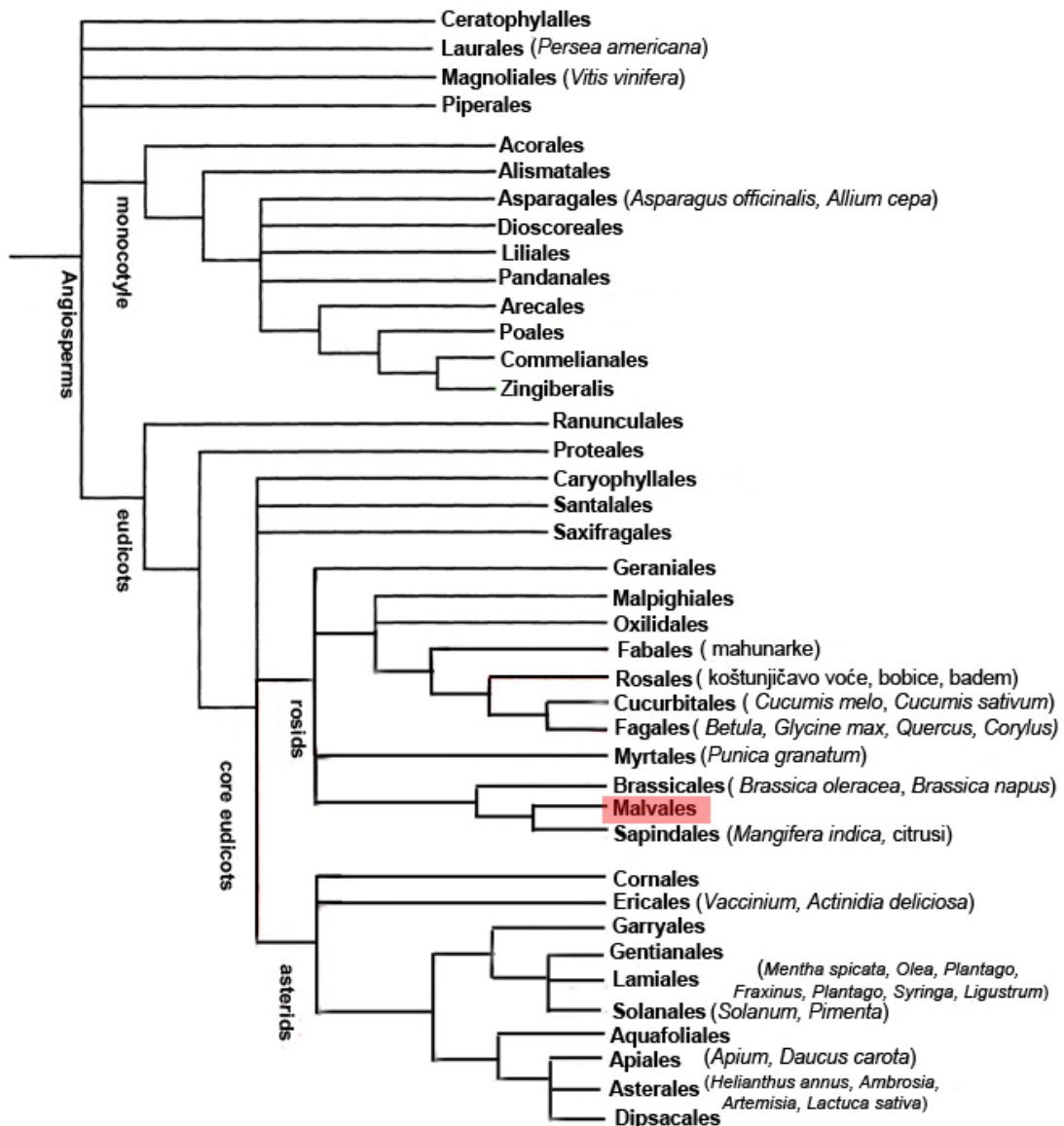
### 2.6.1.3. Alergije na polen lipa (*Tilia*)

Lipa pripada familiji *Tiliaceae* i ovaj rod čini oko 30 vrsta drveća. Prirodna je vrsta za većinu severne hemisfere, u Aziji, Evropi i Severnoj Americi. Samo četiri vrste se pojavljuju u Evropi i to su kavkaska lipa (*Tilia dasystyla*), srebrnolisna lipa (*Tilia tomentosa*, slika 2.3.), malolisna lipa (*Tilia cordata*) i velikolisna lipa (*Tilia platyphyllos*). Poslednje dve vrste prekrivaju skoro ceo kontinent Evrope, osim većih delova Skandinavije. Srebrnolisna lipa (*T. tomentosa*) je endemska vrsta za Balkan, posebno za države bivše Jugoslavije, Bugarsku, Rumuniju i Grčku. *T. cordata* i *T. platyphyllos* formiraju prirodne međusobne hibride kada se nađu u blizini i nastali hibrid se naziva *Tilia europea* ili *Tilia vulgaris* (Radoglou, Dobrowolska, Spyroglou, & Nicolescu, 2008).



Slika 2.3. – Lice i naličje lista srebrnolisna lipa (*Tilia tomentosa*)

Smatrano je da se polinacija lipa vrši insektima, a ne vetrom, i samim tim lipa nije posmatrana kao važan izvor alergena. Isto tako, preklapanje perioda polinacije sa drugim biljnim vrstama koji su poznati i okarakterisani izvori alergena, može dovesti ili do ukrštene reaktivnosti ili do maskiranja alergenog potencijala lipa. Zanimljivo je da kada se pogleda filogenetsko stablo biljaka uočljivo je da niti jedna vrsta reda *Malvales*, kojem pripada *Tilia*, nije do sada uvrštena na spisak alergernih izvora, iako je za dosta filogenetski bliskih vrsta pokazano da su uzročnici polenskih alergija (Slika 2.4.).



Slika 2.4. – Filogenetsko stablo skrivenosemenica (Angiosperme) sa naznačenim rodovima i vrstama koje su dokazani izvor alergena. Crveno je označen red Malvales, kojem pripada lipa. Iz ovog roda polen ni jedne vrste još uvek nije opisan kao izvor alergena.

Alergija na polen lipe i to vrste *Tilia cordata* do sada je opisana samo na slučaju jednog pacijenta (Mur, Feo Brito, Lombardero, Barber, Galindo, Gomez, et al., 2001). Kao IgE vezujući proteini identifikovani su proteini približnih molekulskih masa od 50, 23 i 10 kDa. Dalja identifikacija alergena polena lipe, kako imunološka, tako i strukturna, potrebna je da bi se poboljšala dijagnostika, a samim tim i terapija alergija na ovaj polen.



## 2.6.2. Alergije na polen korovskih biljaka

Pored polena drveća, polen trava i korovskih biljaka je svakako jedan od najbitnijih izvora alergena. Nesumnjivo najčešći uzročnik alergija, kada su u pitanju korovske biljke, jeste kratka ambrozija (*Ambrosia artemisiifolia*).

Polen kratke ambrozije (*Ambrosia artemisiifolia*) je najprisutniji sezonski alergen u Severnoj Americi i delovima Evrope za koji je procenjeno da utiče na 36 miliona ljudi (Wopfner, Jahn-Schmid, Schmidt, Christ, Hubinger, Briza, et al., 2009) izazivajući tako više alergijskih reakcija kod čoveka nego sve ostale biljne vrste zajedno (Bagarozzi, Potempa, & Travis, 1998; D'Amato, et al., 2007; Weber, 2005). Takođe, kratka ambrozija postaje jedan od glavnih izvora alergena iz korovskog polena u centralnoj i jugoistočnoj Evropi (Bagarozzi, Potempa, & Travis, 1998; D'Amato, et al., 2007; Janjic & Vrbnicanin, 2007; Weber, 2005). Skorašnja fitogeografska i aerobiološka merenja distribucije i prisustva kratke ambrozije pokazala su da je Srbija pod značajnim uticajem ove biljke i da je ugrožena njenim polenom (Janjic & Vrbnicanin, 2007; Sikoparija, Smith, Skjoth, Radisic, Milkovska, Simic, et al., 2009). Izloženost ovom polenu traje i do 100 dana koliko traje sezona polinacije kratke ambrozije (Janjic & Vrbnicanin, 2007). Prevalenca alergije na ambroziju kod ljudi je u stalnom porastu i kako pokazuje pan-Evropska studija GALEN, trenutno je više od 2,5% evropske populacije izloženo ovom polenu, a čak 50% populacije u Mađarskoj, 15,2% u Holandiji i 14,2% u Nemačkoj (Asero, Wopfner, Gruber, Gadermaier, & Ferreira, 2006; Burbach, Heinzerling, Rohnelt, Bergmann, Behrendt, Zuberbier, et al., 2009; Jager, 2000).

Do danas, 7 grupa alergena iz polena kratke ambrozije identifikovani su kao uzročnici alergija kod čoveka: (1) Amb a 1 ili antigen E (pektat lijaza) sa 5 izoalergenih podgrupa, (2) Amb a 3/ Amb a 7 (plastocijanin), (3) Amb a 4 (protein sličan defensinu), (4) Amb a 5 homolozi, (5) Amb a 6 (protein lipidnog transfera), (6) Amb a 8 (profilin) i (7) Amb a 9/Amb a 10 (polkalcin/protein sličan polkalcinu). Otprilike 95% pacijenata osetljivih na ambroziju sadrže IgE antitela na glavni alergen, Amb a 1 (Asero, Wopfner, Gruber, Gadermaier, & Ferreira, 2006). U ovu grupu je od skora uključena i od ranije poznata grupa alergena Amb a 2 (antigen K), koja je sada preimenovana u izoalergen Amb a 1.05. Na ovaj alergen reaguje čak 70% pacijenata (Griffith, Pollock, Klapper, Rogers, & Nault, 1991; Rogers, Morgenstern, Griffith, Yu, Counsell, Brauer, et al.,

1991). Ostale grupe alergena ambrozije za sada predstavljaju sporedne alergene i time su manje značajne u alergijskom odgovoru čoveka.

## **2.7. Alergijski odgovor kod pasa, atopični dermatitis**

Kada su humani pacijenti u pitanju, alergija na polen trava je detaljno izučen fenomen. Međutim, alergijski simptomi uočeni su i kod pasa, te smo u cilju izučavanja alergijskog odgovora na trave upoređivali humani i alergijski odgovor pasa alergičnih na ambroziju.

Atopični dermatitis je jedno od najzastupljenijih oboljenja kože kod pasa (Halliwell, 2006; D Scott, 1981) AD je definisan genetskom predispozicijom ka inflamatornim i alergijskim oboljenima kože praćenim svrabom i prisustvom IgE antitela na alergene iz životne sredine (Halliwell, 2006). Dijagnoza AD-a kod pasa zasniva se na pažljivoj proceni istorije oboljenja koja je dobijena od vlasnika psa, na osnovu prisustva odgovarajućih kliničkih znakova, eliminacijom drugih oboljenja praćenih svrabom, i može biti potvrđena ili *in vivo* ili *in vitro* testovima na prisustvo IgE molekula specifičnih na određene alergene (Favrot, Linek, Mueller, Zini, & International Task Force on Canine Atopic, 2010).

Trenutno ne postoji slična, multiregionalna studija o rasprostranjenosti senzitivizacije pasa na polen kratke ambrozije što je možda uzrokovano heterogenom rasprostranjenošću ove biljke. Dok se nekolicina američkih autora slaže da je kratka ambrozija najznačajniji izvor alergena među korovskim biljkama koji uzrokuje AD kod pasa (Zur, Ihrke, White, & Kass, 2002), autori iz Skandinavskih zemalja i Poljske, recimo, nisu došli do sličnih nalaza (Cunze, Leiblein, & Tackenberg, 2013; Taszkun, 2011). Ovo nesuglasje bi moglo da se pripíše smanjenoj rasprostranjenosti ambrozije u Skandinaviji i Poljskoj. Na osnovu rezultata intradermalnog kožnog (IDK) testa u SAD, Francuskoj i Grčkoj, polen kratke ambrozije izaziva pozitivnu reakciju kod 7.7-59% pasa sa AD-om, a čak 77% atopičnih životinja ima povišen nivo IgE na ovaj polen (Hill & DeBoer, 2001). Rezultati iz Srbije takođe pokazuju da je polen kratke ambrozije značajan za razviće AD kod pasa pošto je 66% atopičnih životinja bilo pozitivno na njen ekstrakt u IDK testu. Iako je nekolicina alergena iz životne sredine implikovana u patogenezi psećeg AD-a, glavni uzročnici su grinje na prvom mestu i polen ambrozije

na drugom mestu (Milcic-Matic, Popovic, Lazarevic, & Medenica, 2010; Nesbitt, Kedan, & Cacciolo, 1984).

Napredak u imunološkoj karakterizaciji glavnih humanih alergena omogućio je razvitak unapređenih dijagnostičkih metoda i novih pristupa u specifičnim imunoterapijama alergijskih oboljenja. Slično kao kod atopične populacije ljudi, unapređene dijagnostičke i terapijske metode bi mogle da poboljšaju kvalitet života atopičnih pasa kroz poboljšanje brzine i tempa oporavka. Osim toga, detaljno istraživanje ovog oboljenja bi svakako unapredilo razumevanje mehanizama koji dovode do AD kod pasa.

Identifikacija i karakterizacija alergena ambrozije koji su odgovorni za pseći AD nije do sada urađena. Za razliku od čoveka, psi su jako podložni parazitskim infekcijama, bilo naslednim ili stečenim, i kao posledica odbrane od parazita često je nivo IgE antitela povišen i kod zdravih životinja (Ledin, Bergvall, Hillbertz, Hansson, Andersson, Hedhammar, et al., 2006). Zbog toga je detekcija niskog nivoa specifičnih IgE antitela protiv određenih alergena u odnosu na izuzetno visok titar ukupnih antitela, izuzetno komplikovana sa metodološkog stanovišta. Međutim, razvoj imunoproteomičkih pristupa i metoda omogućava detaljnu karakterizaciju raznih alergena, pa tako i kratke ambrozije, koji izazivaju AD kod pasa.

## **2.8. Modulacija imunskog odgovora**

Imuni sistem ima vrlo težak zadatak da održava finu ravnotežu između zaštite organizma domaćina od infektivnih, stranih agenasa, a da pri tom "toleriše" sopstvene i bezopasne materije iz okoline. Pored toga, prilikom zapaljenske reakcije, imuni sistem mora brzo i efikasno da reaguje na štetno strano telo u organizmu, ali tako da istovremeno ta reakcija bude takva da lokalno tkivo pretrpi što manje oštećenje. Može se reći da je ključ uspešnog imunskog sistema u finom podešavanju njegove funkcije.

Podešavanje, ili modulacija, imunskog odgovora može da se ispituje na nekoliko nivoa. Počevši od izmene strukture samog alergena na koji imuni sistem reaguje, stvaranja hipoalergenih varijanti, do modulacije ćelijskog i serumskog odgovora imunskog sistema različitim supstancama.

### 2.8.1. Interakcije polifenola i alergena

Nekoliko studija je pokazalo da prirodni polifenoli zelenog čaja interaguju sa alergenima hrane čime dovode do strukturnih promena alergena, a samim tim i do modulacije alergijskog odgovora.

Kokošije jaje je jedno od najznačajnijih izvora hranljivih materija u ljudskoj ishrani. Ovalbumin (OVA) je glavni protein i glavna hranljiva komponenta belanceta kokošijeg jajeta što se ogleda u činjenici da on predstavlja ~ 60-65% ukupne proteinske mase belanceta. Međutim, ovaj glikoprotein od 385 amino kiselina istovremeno je i glavni alergen ptičijeg jajeta koji je odgovoran za IgE-posredovane alergijske reakcije u dečijoj ishrani. Različite procene ukazuju da je alergijska reakcija na OVA prisutna kod ~1.6-3.2% dece i kod 0.6% odraslih (Sampson, 2004). Na osnovu sličnosti amino-kiselinske sekvence i tro-dimenzionalne strukture, OVA je svrstan u veliku porodicu proteina poznatih kao SERPINI. Skraćenica SERPIN potiče od anglosaksonskog naziva **SER**ine **P**rotease **I**nhibitors, koja pak označava proteinske makromolekule sačinjene od jednog domena koji inhibiraju katalitičku aktivnost serinskih proteaza. Serpini su okarakterisani jedinstvenom tro-dimenzionalnom strukturom koja je sačinjena od tri  $\beta$ -pločice, koje predstavljaju srž strukture, i 8-9  $\alpha$ -heliksa koji se nalaze na površini molekula. Povrh centralne  $\beta$ -pločice A nalazi se petlja dugačka od 15-20 amino kiselina. Ova petlja, koja je potpuno izložena rastvoru i koja, osim u slučaju OVA, nema karakteristike uređene sekundarne strukture, poznatija je kao petlja reaktivnog centra. Ona služi kako mamac za proteaze; proteaze prepoznaju određenu sekvencu u petlji i katališu reakciju hidrolize. Međutim, u toku reakcije proteaza ostaje kovalentno vezana za serpin dovoljno dugo da biva uklonjena sa mesta delovanja zajedno sa isečenim serpinom i ovo ujedno predstavlja opšti mehanizam inhibicije serinskih proteaza. Za razliku od inhibitornih serpina, OVA ne inhibira niti jednu poznatu proteazu i zato se često naziva neinhibitornim serpinom. Isto tako, za razliku od ostalih neinhibitornih serpina, kao što su maspin i faktor iz pigmentnog epitelijuma, PEDF (engl. “**P**igment **E**pthelium **D**erived **F**actor”), koji imaju definisane biološke uloge (regulacija angiogeneze, supresija tumora, itd.), prava uloga OVA, pored moguće rezerve energije, nije baš najjasnija. Uloga OVA u alergijskim reakcijama čoveka i interakcije ovog proteina sa malim fiziološki aktivnim molekulima prisutnim u hrani, kao što su

polifenoli i purinski alkaloidi, naglašava potrebu za detaljnim ispitivanjima uloge OVA u imunom odgovoru (R. Q. Wang, Yin, Li, Wang, Pu, Wang, et al., 2013).

Glavnina dosadašnjih studija o interakcijama između polifenola i proteina je otkrila konstante vezivanja, identitet mogućeg mesta vezivanja polifenola, karakter sila značajnih za prepoznavanje, kao i uticaj protein-polifenol kompleksa na stabilnost i anti-oksidantne osobine polifenola (Caruana, Hogen, Levin, Hillmer, Giese, & Vassallo, 2011; Kanakis, Hasni, Bourassa, Tarantilis, Polissiou, & Tajmir-Riahi, 2011). Polifenoli jabuke formiraju kompleks sa OVA i umanjuju vezivanje specifičnih anti-tela i oslobađanje serotonina iz bazofila. Predloženi mehanizmi anti-alergijskog delovanja polifenola jabuke su delimično zasnovani na stabilnim interakcijama između polifenola i OVA, koje, pak, umanjuju alergeni potencijal datog alergena (u ovom slučaju OVA) promenom epitopa (Zuercher, Holvoet, Weiss, & Mercenier, 2010). Gruber i saradnici su objavili slične rezultate u studiji koja se bavila interakcijama polifenola i glavnog alergena višnje Pru av 1 (Gruber, Vieths, Wangorsch, Nerkamp, & Hofmann, 2004; Si-Yin Chung, 2009). Pokazano je, naime, da interakcije između Pru av 1 i polifenola kao što su epikatehin, galna kiselina i kvercetin, izazivaju stalnu promenu u terciarnoj strukturi alergena i značajno umanjuju sposobnost alergena da interaguje sa IgE molekulima. Takođe, alergeni potencijal kikirikija je umanjen nakon interakcije sa polifenolima (Si-Yin Chung, 2009).

(-)-Epigalokatehin-3-galat (EGCG) je najpotentnija komponenta zelenog čaja koja ima korisna svojstva po opšte zdravlje čoveka, uključujući oboljenja preosetljivosti (Melgarejo, Medina, Sanchez-Jimenez, & Urdiales, 2010). Polifenoli se unose u ljudski organizam u kombinaciji sa proteinima iz raznih izvora i na taj način oni učestvuju u različitim procesima koji mogu da utiču na zdravlje čoveka i koji mogu da moduliraju imunološku reakciju na proteine hrane. Nekoliko studija je pokazalo da EGCG interaguje sa glavnim proteinima hrane kao što su  $\beta$ -laktoglobulin (BLG) i kazein (I. Hasni, Bourassa, & Tajmir-Riahi, 2011). Nekovalentne interakcije između EGCG i proteina izazivaju konformacione promene kod proteina (Kanakis, Hasni, Bourassa, Tarantilis, Polissiou, & Tajmir-Riahi, 2011) i utiču na proteolizu datog proteina pepsinom (Tagliacruzchi, Verzelloni, & Conte, 2005; Tantoush, Apostolovic, Kravic, Prodic, Mihajlovic, Stanic-Vucinic, et al., 2013). Konformacija proteina, podložnost proteolizi i formiranju agregata su osobine koje izuzetno utiču na reakcije hiperosetljivosti na hranu kao što su vezivanje IgE molekula, apsorpcija od strane antigen-prezentujućih ćelija, aktivacija efektnih ćelija u alergijskom odgovoru, i

senzitivizacija od strane alergena hrane (Vissers, Blanc, Skov, Johnson, Rigby, Przybylski-Nicaise, et al., 2011).

### **2.8.2. Uticaj polifenola na ćelijsku signalizaciju**

Pored direktne interakcije sa alergenima i uticaja na njihovu strukturu, prirodni polifenoli mogu da utiču i na ćelijske procese koji su povezani sa alergijskim odgovorom. U te procese spada i modulacija unutarćelijskih signalnih kaskada koje su pod uticajem pro-inflamatornih citokina.

Konzumiranje zelenog čaja ima korisne uticaje na zdravlje čoveka, posebno u mnogim hroničnim i inflamatornim oboljenjima, kao što su bolesti srca, dijabetes, neurodegenerativna oboljenja, artritis i rak (Butt & Sultan, 2009; R. Singh, Akhtar, & Haqqi, 2010). Postoje značajni dokazi da polifenoli zelenog čaja, a pogotovu glavni polifenol (-)-epigalokatehin-3-galat (EGCG), inhibiraju enzimatske aktivnosti i signalne kaskade, što rezultuje suprimiranjem ćelijskog rasta i povišenim nivoom apoptoze, kao i inhibicijom ćelijske invazije, angiogeneze i metastaze različitih linija kancer ćelija (Sarkar, Li, Wang, & Kong, 2009; Yang, Wang, Lu, & Picinich, 2009).

Polifenoli zelenog čaja, a EGCG posebno, utiču na širok spektar imunih ćelija. Naime, ova jedinjenja utiču na rast i sazrevanje dendritskih ćelija (Yoneyama, Kawai, Tsuno, Okaji, Asakage, Tsuchiya, et al., 2008), inhibiraju oslobađanje histamina i sekreciju citokina od strane bazofila (Fujimura, Umeda, Yamada, & Tachibana, 2008), suprimiraju produkciju IgE u B ćelijama i mononuklearnim ćelijama periferne krvi (PBMC) (Hassanain, Silverberg, Norowitz, Chice, Bluth, Brody, et al., 2010), sprečavaju degranulaciju mastocita (Inoue, Suzuki, & Ra, 2010), preživljavanje, adheziju i mobilnost monocita čoveka (Kawai, Tsuno, Kitayama, Okaji, Yazawa, Asakage, et al., 2005; Melgarejo, Medina, Sanchez-Jimenez, & Urdiales, 2010), kao i ekspresiju i IL-17 i TNF-alfa u Th17 humani ćelijama (Danesi, Philpott, Huebner, Bordoni, & Ferguson, 2010). Takođe, pokazano je da EGCG interferira sa IL-2/IL-2R signalnim putem i da je stoga veoma potentan u modulaciji imunskog odgovora (Lambert, Kennett, Sang, Reuhl, Ju, & Yang, 2010; J. Wang, Pae, Meydani, & Wu, 2012; D. Wu, Guo, Ren, Guo, & Meydani, 2009).

Najskoriji rezultati su pokazali da EGCG može da stimuliše inflamatorni odgovor kod životinja koje su primile velike doze EGCG-a. Danas se mogu pronaći

razni proizvoda zelenog čaja u komercijalnoj upotrebi. Uprkos mnogobrojnim rezultatima koji pokazuju da katehini iz zelenog čaja imaju uticaj na imunološki sistem čoveka, nijedna studija nije izučavala efekat dijetalnih suplemenata zelenog čaja pojačanih katehinima i EGCG-om na generaciju ROS u PBMC i moguću interakciju sa IL-4/IL-4R signalnom kaskadom, koja je uključena u nastajanje alergijskog odgovora.

### 3. Cilj istraživanja

Za razumevanje alergije kao fenomena, bitan korak predstavlja izučavanje i opisivanje novih izvora alergena, kao i karakterizacija pojedinačnih alergena. Ova saznanja dalje mogu doprineti boljoj dijagnostici alergija, a samim tim i boljoj terapiji. Međutim, ono što nam još više daje uvida u to kako se alergija, kao neadekvatna reakcija imunskog sistema uopšte javlja, jeste ispitivanje mehanizama odgovornih za podešavanje odnosno modulaciju imunskog odgovora na nivou ćelije, signalnih kaskada i strukture alergena. Obzirom da gore navedena polja nisu dovoljno istražena i objašnjena, cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje novih polenskih izvora alergena, njihova karakterizacija kod humanih i drugih ugroženih životnjskih vrsta, kao i ispitivanje mehanizama modulacije imunskog odgovora čoveka, katehinima zelenog čaja.

Da bi cilj bio postignut nametnuli su se sledeći istraživački zadaci:

- Karakterizacija humanog alergnog potencijala polena lipe (*Tilia tomentosa*).
- Ispitivanje humane ukrštene reaktivnosti polena lipe sa opšte poznatim izvorima alergena, kao što su polen breze i masline.
- Karakterizacija alergijskog odgovora na polen lipe kod pacijenata iz tri različite geografske i klimatske regije evropskog kontinenta.
- Karakterizacija alergijskog odgovora kućnih pasa na polen ambrozije i upoređivanje sa alergijskim odgovorom čoveka.
- Proučavanje mehanizma modulacije imunskog odgovora katehinima zelenog čaja *in vitro*.
- Određivanje mehanizma interakcije između glavnog polifenola zelenog čaja, EGCG-a, i jednog od glavnih alergena hrane, ovalbumina, i bioloških posledica takvih interakcija.
- Proučavanje mehanizma kojim polifenoli iz zelenog čaja, a pogotovu EGCG, modulišu signalnu kaskadu pod kontrolom citokina IL-4, a koji je važan za alergijske reakcije.



## 4. Rezultati

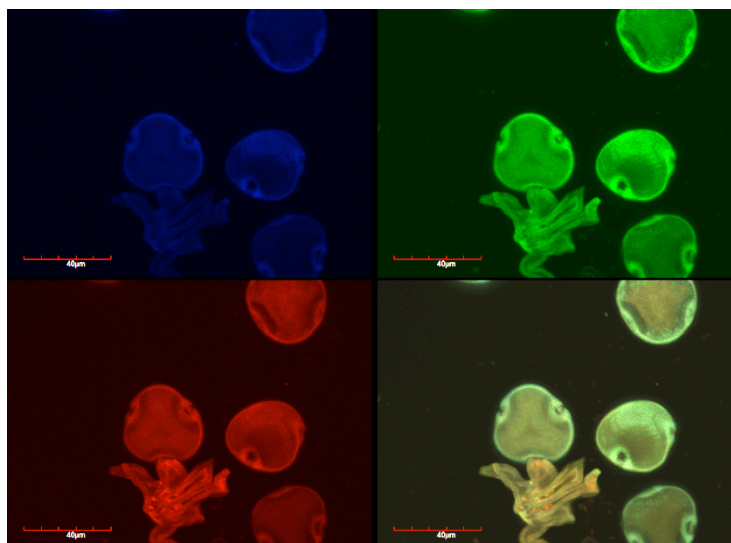
### 4.1. Karakterizacija alergenog potencijala polena lipe (*Tilia tomentosa*)

Smatrano je da se lipa, zbog veličine i težine njenog polenskog zrna, ne oprašuje vetrom već samo insektima. Zbog toga lipa nije uzimana u obzir kao izvor alergena i ne nalazi se u alergenskoj paleti koja se koristi u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Međutim, pojava pacijenata koji su alergični na lipu sugeriše da je lipa izvor alergena koji zavređuje detaljno ispitivanje. U ovom delu, koristili smo kombinaciju *in vitro* i *in vivo* eksperimenata kako bismo karakterisali alergeni potencijal lipe.

#### 4.1.1. Određivanje veličine polenskog zrna lipe mikroskopskim metodama

Pre detaljne karakterizacije imunskog odgovora čoveka na polen lipe bilo je potrebno utvrditi veličinu polenskog zrna lipe i uporediti ga sa polenskim zrnima različitih vrsta drveća, za koje se pouzdano zna da izazivaju alergijske odgovore kod čoveka. Za ova merenja koristili smo metodu konfokalne mikroskopije koja se zasniva na osobini polena da autofluorescira. Autofluorescencija polena omogućava da se pomoću ove mikroskopske tehnike odrede veličina i oblik samog zrna, broj i vrsta pora na zrnu, tekstura egzinskog sloja, procena celosti polenskog zrna, i postojanje polenske opne preko površine polena.

Naša merenja pokazuju da je veličina polenskog zrna lipe (*Tilia tomentosa*) približno 35  $\mu\text{m}$  (Slika 4.1.), što je praktično veličina polenskih zrna drveća koje su poznati izvori alergena. Dobijena vrednost je u skladu sa literaturnim podacima za veličinu polena velikolisne lipe (*Tilia platyphyllos*), koja iznosi 40  $\mu\text{m}$ , a evropske lipe (*Tilia europea*) od 35  $\mu\text{m}$ . Na osnovu ovih rezultata zaključujemo da je polensko zrno lipe (*Tilia tomentosa*) dovoljno malih dimenzija da bi se polinacija obavljala vetrom i samim tim polen lipe zaista predstavlja potencijalni izvor alergena.



Slika 4.1. – Konfokalna mikroskopija polenskog zrna lipe. Autofluorescencija je snimana simultano korišćenjem plavog (A), zelenog (B) i crvenog (C) filtera. Preklopljeni snimci prikazani su na panelu D. Dužina crvene skale na slici je 40  $\mu\text{m}$ . Na osnovu dobijenih snimaka može se zaključiti da veličina zrna polena lipe nije veća od zrna polena već dokazanih alergeni izvora.

#### 4.1.2. *In vivo* vezivanje IgE

U sledećem koraku analizirali smo reaktivnost pacijenata na ekstrakt polena lipe. Dvadeset pacijenata sa alergijskim simptomima u periodu polinacije lipe podvrgnuti su kožnim probama sa ekstraktom polena lipe, masline i breze. Maslina i breza su poznate alergene vrste i njihov period polinacije preklapa se sa peridom polinacije lipe. Kliničke karakteristike pacijenata u ovoj studiji su date u *Tabeli 4.1*. Kao pozitivna kontrola (+) korišćen je histamin fosfat. Od 17 pacijenata 14 je imalo pozitivnu reakciju na ekstrakt lipe (82.35%), dok je 10 od 13 pacijenta pozitivno reagovalo na ekstrakt breze (76.9%) i isto toliko na glavni alergen breze, Bet v 1. Na polen masline je odreagovalo 3 od 8 testiranih pacijenata, dok je na Ole e 1 reagovalo 2/5 (*Tabela 4.1*). Pozitivnom reakcijom smatrala se pojava otoka na mestu nanošenja alergena čiji je prečnik bar 3 mm veći od prečnika negativne kontrole za koji je korišćen samo fiziološki rastvor. Ovi rezultati pokazuju da ekstrakt lipe može izazvati alergijsku reakciju kod čoveka.

Tabela 4.1. Klinički podaci pacijenata koji su učestvovali u studiji. Pol: M – muški, Ž – ženski; Dijagnoza: R – alergijski rinitis, K – alergijski konjuktivitis, B – bronhitis; NT – nije testirano; broj “+” znakova označava jačinu reakcije na skali od 1-3. U *in vitro* koloni predstavljen je intenzitet reakcije pacijenata u imunoblotu, dok je u *ex vivo* koloni predstavljena jačina odgovora pacijenata u testu aktivacije bazofila.

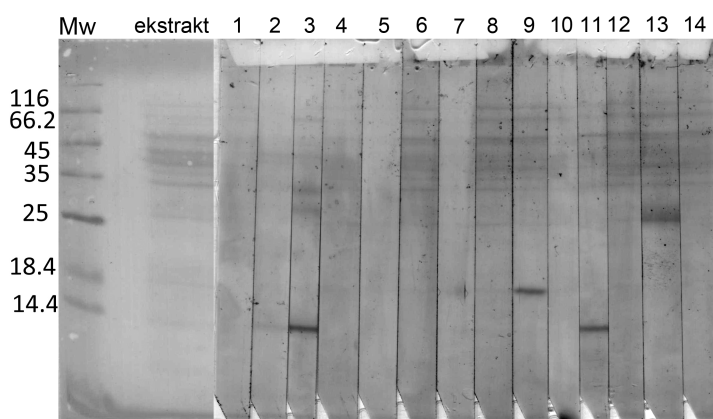
No.	Inicijali	Pol	Dijagnoza	Kožne probe						<i>In vitro</i>	<i>Ex vivo</i>
				histam	<i>Tilia</i>	<i>Betula</i>	Bet v 1	<i>Olive</i>	Ole e 1		
1	VM	M	R., K.	3	4	3.5	3	NT	NT	+++	+++
2	AM	M	R.	2	2	3	2	NT	NT	++	+++
3	IM	M	R.	5	3	4	3	3	2.5	+	++
4	GD	M	R.	2.5	5	NT	NT	NT	NT	++	+++
5	MP	M	R.	5	4	3	2	3	2	+++	++
6	ST	Ž	R.	3	3	4	3	2	3	++	++
7	DC	Ž	R., K.	5	3	0	1	2	2	++	++
8	AD	M	R.	4	6	NT	NT	NT	NT	NT	NT
9	BM	M	R.	4	6	5	5	NT	NT	+++	NT
10	JR	Ž	R., K.	2	2.5	1	2	1	0	NT	NT
11	BG	M	R., K.	4	5	NT	NT	NT	NT	NT	++
12	AMB	Ž	R.	3	5	4	3	NT	NT	+	NT
13	JM	M	R., K.	3	5	5	4	NT	NT	+	NT
14	JP	Ž	B., R.	3	1	3	3	1	0	+++	NT
15	AV	M	R., K.	6	7	4	8	4	3	++	NT
16	AM	Ž	R.	2	4	2	3	1	0	0	NT
17	DA	M	R., K.	3	3	NT	NT	NT	NT	NT	NT

### 4.1.3. *In vitro* vezivanje IgE

Rezultati kožnih testova ukazuju da ekstrakt lipe može da izazove alergijsku reakciju kod čoveka. Međutim, da bi se potvrdilo da se zaista radi o alergiji, potrebno je uraditi niz *in vitro* merenja, kao i eksperimente u kojima se koriste određene ćelije imunskog sistema koje su izolovane iz pacijenata koji su prethodno pozitivno reagovali na ekstrakt lipe u kožnom testu. *In vitro* vezivanje IgE za proteine iz ekstrakta polena lipe testirano je imunoblotom i ELISA testom sa pojedinačnim serumima alergičnih pacijenata, dok su testovi aktivacije bazofila i T ćelija korišćeni kako bi se utvrdila potentnost polena lipe na ćelijskom nivou.

#### 4.1.3.1. Imunoblot

*In vitro* vezivanje IgE iz seruma alergičnih pacijenata testirano je imunoblotom. Prvo su elektroforetski razdvojeni proteini na 12% poli-akrilamidnom gelu, a zatim su razdvojeni proteini prenešeni na membranu koja je korišćena za probu sa 12 pojedinačnih seruma pacijenata koji su pokazali pozitivnu reakciju u testu kožne probe na polen lipe. Kao negativna kontrola korišćen je serum nealergične osobe (traka 2). IgE reaktivnost je detektovana kod većine pacijenata (*Slika 4.2.*).



*Slika 4.2.* – Imunoblot analiza reaktivnosti na polen lipe. Traka Mw predstavlja molekulske proteinske markere, traka pored - razdvojene proteine ekstrakta polena lipe. Traka 1 je tretirana serumom nealergičnog pacijenta. Trake 2-14 su serumima pojedinačnih pacijenata.

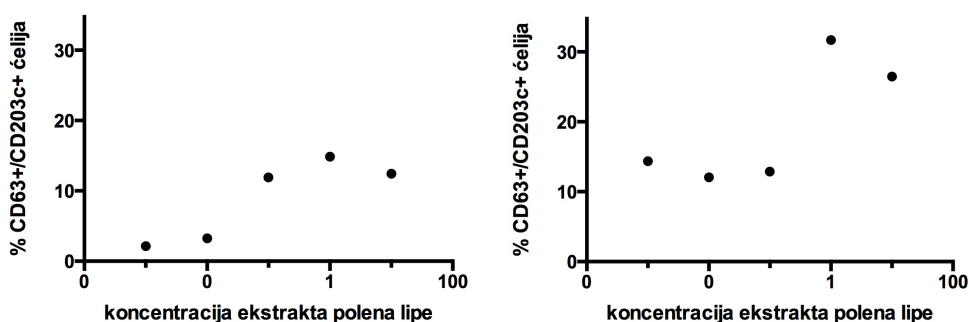
Proteini približnih molekulskih masa 14, 18, 25, 35 i 45 kDa su se pokazali kao

dominanti IgE vezujući proteini i sa manjim ili većim intenzitetom su prepoznati kod svakog pojedinačnog seruma.

#### 4.1.3.2. Test aktivacije bazofila

Na površini bazofila nalaze se receptori (FcεR) koji vezuju konstantni region IgE antitela. Bazofili unutar ćelije sadrže mnoge granule koje su ispunjene različitim aktivnim supstancama koje izazivaju alergijski odgovor nakon degranulacije. Bazofili se aktiviraju kada se alergen-specifično IgE antitelo veže za alergen i za FcεR receptor na bazofilima. Aktivirane ćelije potom započinju degranulaciju, luče aktivne supstance i tako iniciraju alergijski odgovor. Degranulisani i aktivirani bazofili ekspimiraju CD63 i CD 203c antigene na svojoj površini. Zato se detekcija aktiviranih bazofila iz pune krvi može pratiti pomoću protočnog citometra i korišćenjem antitela na CD63 i CD203c proteina. Antitela su obeleženi različitim fluoroforama, najčešće fluorescein izotiocijanatom, FITC (engl. “Fluorescein Isothiocyanate”) i fikoeritriinom, PE (engl. “phycoerythrin”) što omogućava kvantifikaciju signala.

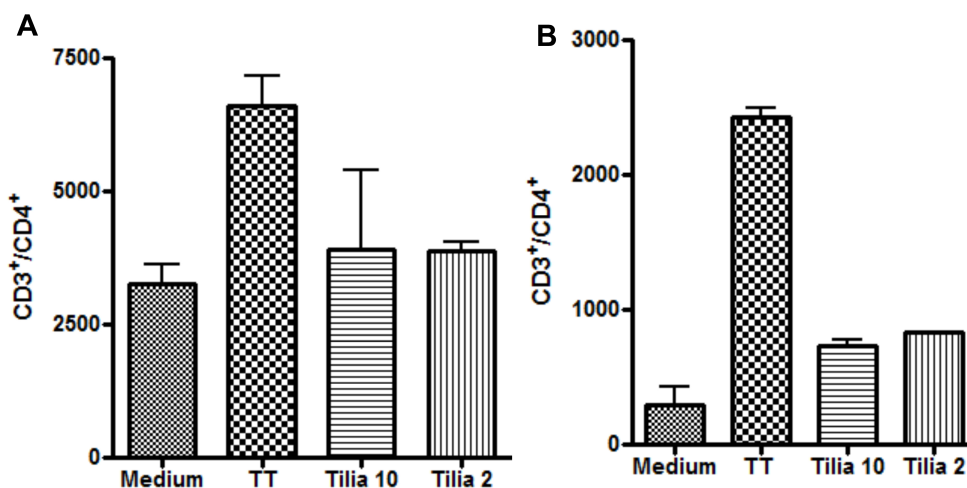
Radi utvrđivanja da li je ekstrakt polena lipe sposoban da dovede do aktivacije bazofila, test aktivacije bazofila je odrađen sa punom krvi 8 pacijenata sa prethodno utvrđenom kliničkom istorijom alergijske reakcije. Ćelije krvi pacijenata stimulisane su sa serijskim razblaženjem ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $0.0001 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ekstrakta polena lipe i praćena je aktivacija bazofila merenjem ekspresije CD63 i CD203c molekula na površini ćelija (Slika 4.3.). Ekstrakt lipe je bio u stanju da izazove aktivaciju bazofila alergičnih pacijenata i do 33% u odnosu na negativnu kontrolu.



Slika 4.3. - Zavisnost % aktiviranih bazofila od koncentracije dodatog ekstrakta polena lipe na primeru pacijenta IM (panel A) i pacijenta AM (panel B)

#### 4.1.3.3. Aktivacija T ćelija

Poznato je da tokom alergijskog odgovora dolazi do proliferacije i uvećanja broja alergen-specifičnih Th limfocita. Nakon dokazane sposobnosti ekstrakta lipe da aktivira bazofile, kako u *in vitro*, tako i u *in vivo* uslovima, odrađeni su testovi proliferacije T limfocita kod 8 pacijenta. Izolovana populacija limfocita iz pune krvi tretirana je sa dve koncentracije ekstrakta polena lipe, 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  i 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Inkubacija tetrodotoksinom je poslužila kao pozitivna kontrola, a inkubacija medijumom za rast ćelija je predstavljao negativnu kontrolu. U svakom od 8 slučajeva moglo se zapaziti povećanje broja CD4<sup>+</sup> /CD3<sup>+</sup> T limfocita, nakon tretiranja ekstraktom lipe. Rezultati na primeru dva pacijenta su prikazani histogramski (Slika 4.4.).



Slika 4.4. – Test proliferacije T ćelija. Netretirane ćelije predstavljaju negativnu kontrolu, odnosno ćelije u koje je umesto ekstrakta dodat samo ćelijski medijum (Medium). Pozitivnu kontrolu predstavljaju ćelije tretirane teterodotoksinom (TT), dok su dve koncentracije ekstrakta obeležene kao Tilia 10 i Tilia 2. Svi uzorci su postavljeni u duplikatu. Prikazana su dva pacijenta, pacijent IM (panel A) i pacijent AM (panel B).

#### 4.1.4. Određivanje ukrštene reaktivnosti sa polenom masline i breze

Kako je lipa karakteristična za područje srednje Evrope, sa tim da je manje ima u severnim i južnim krajevima, zanimljivo je bilo istražiti kako atopični pacijenti iz tih krajeva reaguju na polen lipe. U Švedskoj i Nemačkoj najveći procenat pacijenata alergičnih na polen reaguje na polen breze, koja je svakako među zastupljenijim vrstama drveća u ovim krajevima. Kada govorimo o populaciji alergičnih pacijenata u

Španiji, najčešće se govori o alergijama na polen masline, koja predstavlja jednu od najznačajnijih poljoprivrednih kultura ovog predela.

U cilju utvrđivanja kako različite populacije pacijenata reaguju na polen lipe, iako nisu izložene ovom izvoru u tolikoj meri, odrađeni su *in vitro*, imunoblot i ELISA testovi. Pronalaženje odnosa između imunoreaktivnosti različitih populacija pacijenata na polen lipe i polen breze ili masline omogućava nam da utvrdimo da li postoji paralelna senzitivizacija ovim izvorima ili da li je u pitanju ukrštena reaktivnost na ove polene. U ovom drugom slučaju to bi značilo da poleni lipe, breze i masline sadrže alergene visokog nivoa sličnosti koje IgE antitela čoveka prepoznaju.

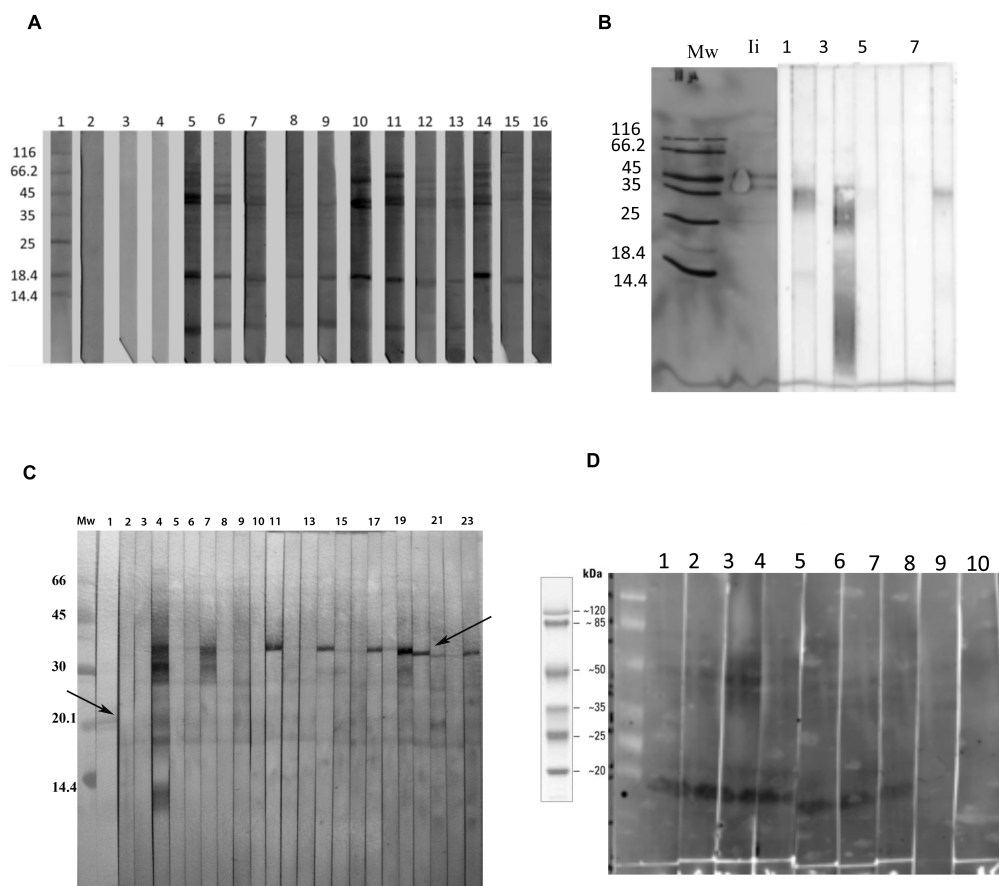
#### ***4.1.4.1. Imunoblot analize na ekstrakt polena lipe serumima alergičnih pacijenata tri evropske populacije***

Razvijanje blota rađeno je pojedinačnim serumima pacijenata iz tri evropske populacije. Pacijenti iz nemačke i švedske populacije birani su na osnovu pokazane reaktivnost na brezu koja je dominantan izvor alergena u tim regijama, dok su pacijenti iz Španije birani na osnovu istorije alergije na polen masline, koji je, pak, glavni izvor alergena u tom geografskom području.

Da bi se utvrdilo da li u ekstraktu lipe postoje proteini za koje postoji specifično IgE antitelo u serumima pacijenata koji nisu izloženi ovom izvoru alergena, proteini iz ekstrakta polena lipe prvo su razdvojeni pomoću SDS-PAG elektroforeze na 12% poliakrilamidnom gelu. Zatim su protein prenešeni na nitroceluloznu membranu i tretirani pojedinačnim serumima pacijenata iz različitih populacija.

Korišćeno je 12 seruma breza-alergičnih pacijenata sa područja Srbije, 7 seruma sa područja Nemačke i 20 sa područja Švedske. Populacija pacijenata iz Srbije prepoznala je kao dominantne IgE vezujuće proteine približnih masa od 10, 18 i 45 kDa (*Slika 4.5., panel A*). Iz populacije nemačkih pacijenata troje je pokazalo IgE reaktivnost i to pre svega na protein približne molekulske mase oko 36 kDa, a slabije na protein od oko 14 kDa (*Slika 4.5., panel B*). U Švedskoj populaciji, slabijim ili jačim intenzitetom svi pacijenti su prepoznali protei oko 36-38 kDa, dok se nešto slabijeg intenziteta, ali kod svih testiranih pacijenata mogu videti trake na oko 18 kDa (*Slika 4.5., panel C*). Sa područja Španije testirano je 7 pacijenata alergičnih na maslinu na imunoblotu sa razdvojenim proteinima ekstrakta polena lipe. Zanimljivo je da je 6/7 pacijenata skoro jedinstveno prepoznala protein oko 18 kDa. Sedmi pacijent (*Slika 4.5.,*

panel D, traka 9) je na kožnim probama pokazao alergiju na ekstrakt polena masline, ali ne i na glavni alergen Ole e1, koji je mase oko 17 kDa.

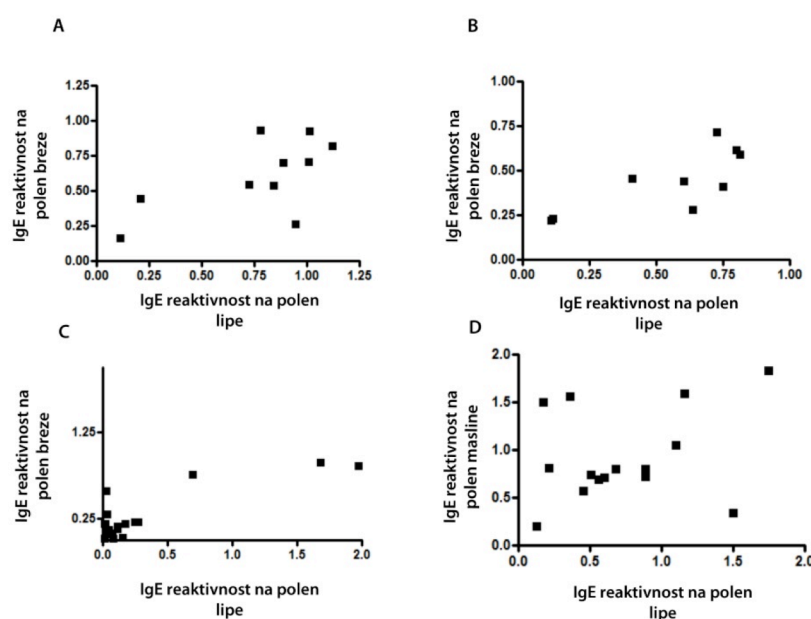


Slika 4.5. – Imunoblotovi alergičnih pacijenata različitih populacija Evrope na elektorforetski razdvojene proteine ekstrakta polena lipe. (A) Imunoblot razvijen sa 12 pojedinačnih seruma breza-alergičnih pacijenata sa područja Srbije. Traka 1 – Molekulski proteinski markeri. Trake 2-4 negativne kontrole, dok su trake 5-16 tretirane pojedinačnim serumima pacijenata. (B) Imunoblot razvijen sa pojedinačnim serumima 7 breza-alergičnih pacijenata sa područja Nemačke. Mw – molekularni markeri, li – traka obojena Indian ink-om, zarad provere uspešnosti transfera, traka 1 – negativni serum, trake 2 – 8 serumi alergičnih pacijenata. (C) Imunoblot razvijen sa pojedinačnim serumima 20 breza-alergičnih pacijenata sa područja Švedske. Mw – proteinski molekularni markeri, traka 1 – serum nealergičnog pacijenta, trake 2 i 3 – negativne kontrole za sekundarna i tercijarna antitela, trake 4-23 serumi breza-alergičnih pacijenata. (D) Imunoblot sa pojedinačnim serumima maslina-alergičnih pacijenata na području Španije. Prikazani su proteinski molekularni markeri, trake 1 – 9 pojedinačni serumi pacijenata alergičnih na polen masline, traka 10 – negativna kontrola.



#### 4.1.4.2. Upoređivanje IgE reaktivnosti na polen lipe i polen breze, odnosno polen lipe i polen masline

ELISA testom smo uporedili specifično IgE vezivanje za alergene polena lipe i polena breze među populacijom pacijenata alergičnih na brezu Švedske, Nemačke i Srbije. Upoređen je i IgE specifičan odgovor na polen lipe i masline, na populaciji pacijenata alergičnih na maslinu, sa područja Španije. Vrednosti prikazane na graficima su vrednosti apsorbancije ( $A_{405}$ ) od kojih je oduzeta vrednost apsorbancije za negativnu kontrolu. Ovim testom smo hteli da vidimo da li postoji korelacija između IgE reaktivnosti alergičnih pacijenata na polen lipe i polen breze, odnosno polen masline, kada je u pitanju populacija pacijenata iz Španije. U slučaju postojanja korelacije, očekivano je da prava bude što približnija  $r=1$ . Kao što se može videti sa slike 4.6. najuočljivija korelacija je u panelu D, između reaktivnosti maslina-alergičnih pacijenata Španije na polen masline i polen lipe.

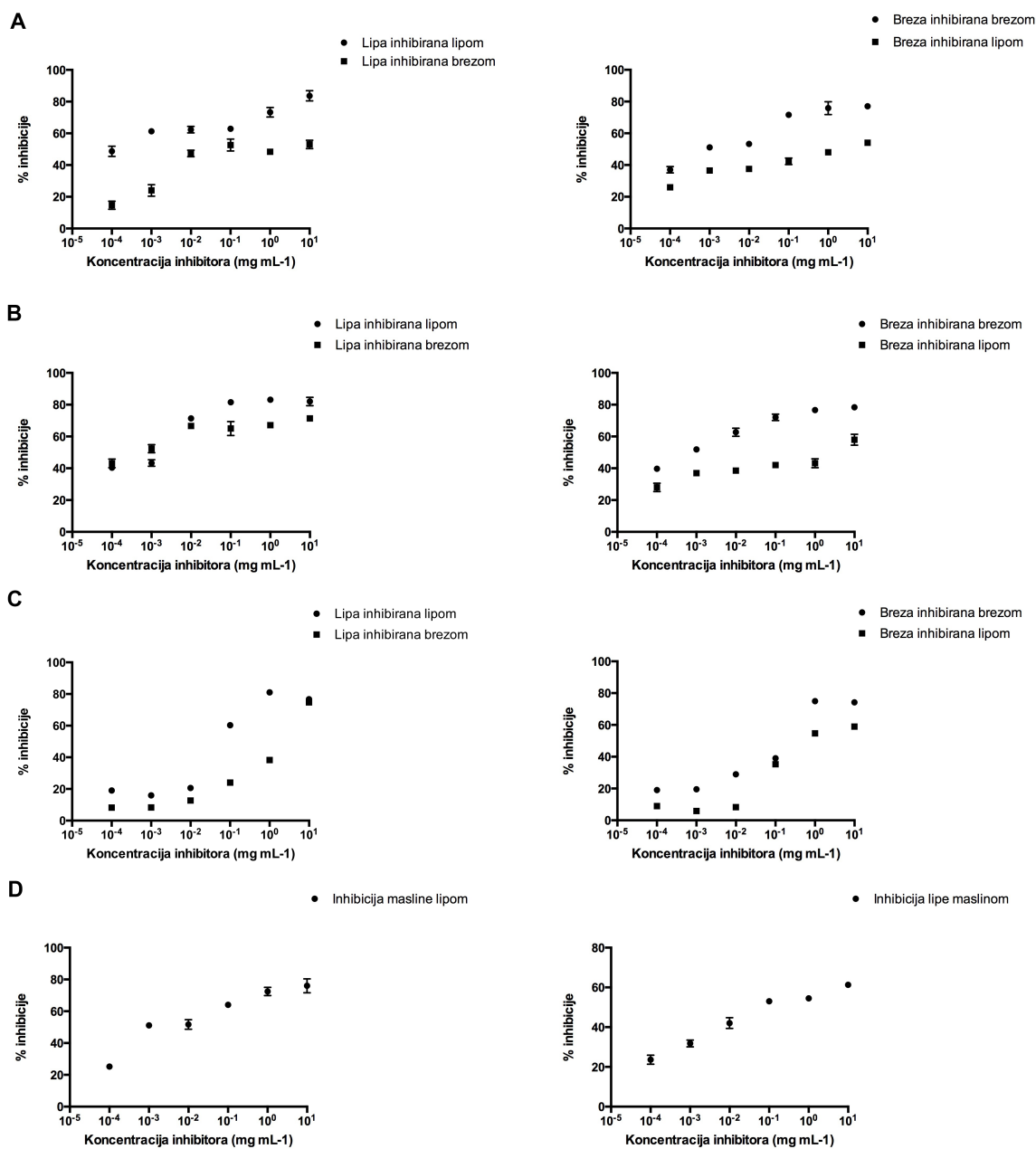


Slika 4.6. – Direktnim ELISA testom određena je reaktivnost IgE antitela na alergene polena lipe u serumima pacijenata različitih populacija Evrope (Srbija (A), Nemačka (B), Švedska (C), Španija (D)), a zatim upoređena sa IgE reaktivnošću na polen breze, tj. masline.

#### **4.1.4.3. Inhibitorni ELISA testovi**

U cilju daljeg ispitivanja ukrštene reaktivnosti između polena lipe i breze, kao i između polena lipe i masline urađeni su inhibitorni ELISA testovi sa grupisanim serumima četiri različite populacije pacijenata. U ovim testovima, prvo su proteini ekstrakta polena lipe kuplovani za mikrotitar pločicu. Zatim su dodavani serumi pacijenata alergičnih na lipu koji su preinkubirani serijskim razblaženjima ekstrakta breze ili masline zavisno od vrste populacije. Potom je meren nivo vezivanja IgE za ekstrakt polena lipe, preko merenja apsorbance na 405 nm, i taj rezultat je upoređen sa kontrolnim uzorkom u kojem nisu korišćeni ekstrakti breze ili masline. Naši rezultati pokazuju da ekstrakti breze i masline smanjuju nivo vezivanja seruma za proteine iz ekstrakta lipe što ukazuje na postojanje ukrštene reaktivnosti među polenima (*Slika 4.8*). Smanjenje nivoa vezivanja je izraženo kroz odnos nivoa vezivanja seruma za polen lipe u odsustvu i u prisustvu polena breze ili masline. Taj odnos smo izrazili kao procenat inhibicije.

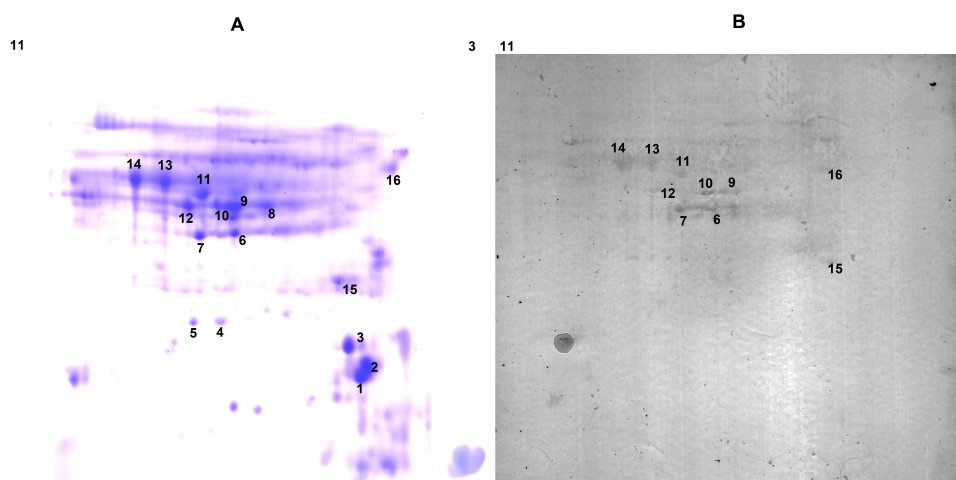
Naši rezultati nedvosmisleno pokazuju da je polen lipe potencijalni izvor alergena, koji izaziva alergijski odgovor kod čoveka i koji bi morao da bude uključen u kliničku paletu alergena.



Slika 4.7. – Inhibitorni ELISA testovi. (A) Na populaciji alergičnih pacijenata Srbije odrađena je inhibitorna ELISA gde su serumi dodavani na kuplovane proteine ekstrakta polena lipe, a preinkubirani (inhibirani) sa ekstraktom polena breze i lipe (levi panel). Isto je urađeno i sa kuplovanim proteinima breze (desni panel). Isti eksperimenti su ponovljeni i za populaciju Nemačke (B) i za populaciju Švedske (C). Određen je i stepen ukrštene reaktivnosti između polena lipe i masline na pridruženim serumima alergičnih pacijenata španske populacije (D), ali bez odgovarajućih kontrola.

#### 4.1.5. Imunoproteomska karakterizacija alergena polena lipe

Kako je do sada u literaturi opisan samo jedan slučaj alergije na polen lipe, i to vrste *Tilia cordata*, jasno je da ne postoji detaljna analiza i karakterizacija alergena ovog izvora. U cilju bolje karakterizacije alergena lipe odrađena je 2-D elektroforeza, gde je prva dimenzija izoelektrofokusing, a druga SDS-PAG elektroforeza pod redukujućim uslovima. Proteini su zatim preneseni na NC membranu, gde su tretirani pridruženim serumima pacijenata alergičnih na polen lipe, sa područja Srbije. Rezultati su prikazani na slici 4.8., panel B.



Slika 4.8. – (A) Razdvajanje proteina polena lipe pomoću 2D SDS-PAG elektroforeze visoke rezolucije. Brojevima su označeni proteini koji su zatim digestovani tripsinom, a nastali peptidi su analizirani pomoću MS. (B) Western blot ekstrakta polena lipe tretiranog sa serumima lipa-alergičnih pacijenata Srbije.

Nakon elektroforeze, imunoreaktivne tačkice sa 2D gela su isecane i digestovane tripsinom. Dobijeni peptidi su analizirani pomoću LC-MS/MS masene spektrometrije. Dobijeni peptidi su upoređeni sa već postojećim u Tremble FASTA bazi UniProt servera. Peptidi za koje je pokazano da imaju izvesno preklapanje sa već opisanim u bazi podataka, prikazani su u Tabeli 4.3.

Tabela 4.3. – Identifikacija “imunoreaktivnih” tačaka sa redukujućeg 2-D gela, pomoću nLC-MS/MS. Pretraga je vršena traženjem homologije sa već postojećim proteinima iz Tremble FASTA baze Rosidae i Asteracea.

Broj tačke	Šifra (UniProt)	Protein	Pogodak/pokrivenost	Peptidi	Mr (kDa)
1	O49813	Ole e1- like protein, <i>Betula pendula</i>	2.58/4.22	VYcDNcR	18.4
3	P86104	Nepoznati protein (fragment), <i>Vitis rotundifolia</i>	3.30/100	TNAENEFVTIKK	1.4
4	A3F7Q3	Benzokinin reduktaza, <i>Gossypium hirsutum</i>	28.73/14.3	MPSELELAQAFHQGK VYIVYYSMYGHVEK	21.7
5	P86104	Nepoznati protein (fragment), <i>Vitis rotundifolia</i>	3.30/100	TNAENEFVTIKK	1.4
6	Q3KN67	Izoflavon reduktazi-nalik protein, <i>Vitis vinifera</i>	34.11/19.48	GDHTNFEIEPSFGVEAS ELYPD ILIIGGTGYIGK DKVILGDGNPK FFPSEFGNDVDR	33.9
7	D7U4J6	Neokarakterisani protein, <i>Vitis vinifera</i>	5.71/12.1	AVFNKEDDIGTYTIK VILGDGNPK ILIIGGTGYIGK	33.9
9	M5X0L9	Neokarakterisani protein, <i>Prunus persica</i>	38.2/23.8	KLASLADVYVNDAFGT A FLKPSVAGFLMQK MSHISTGGASLELLEG K GVTTIIGGGDSVAAVEK LVAQLPDGGVLLLENV R ELDYLVGAVGNPK	47.5
10	Q42962	Fosfoglicerat kinaza, <i>Nicotiana tabacum</i>	20.8/14.7	GVTTIIGGGDSVAAVEK VVPASEIPDGWMGLDIG LSELLGVEVK FAAGTEAIK	42.3
11	M5X0L9	Neokarakterisani protein, <i>Prunus persica</i>	38.2/23.8	KLASLADVYVNDAFGT A FLKPSVAGFLMQK MSHISTGGASLELLEG K GVTTIIGGGDSVAAVEK	47.5
12	Q42962	Fosfoglicerat kinaza, <i>Nicotiana tabacum</i>	20.8/14.7	GVTTIIGGGDSVAAVEK VVPASEIPDGWMGLDIG LSELLGVEVK FAAGTEAIK	42.3
14	Q39766	Poligalakturonaza, <i>Gossypium barbadense</i>	8.18/2.21	VKLSNISFK	43.9
16	M5W7Y7	Neokarakterisani protein, <i>Prunus persica</i>	2.45/1.72	ALcFPLLTRR	61.2

Analiza proteina od interesa na masenom spektrometru nam je dala bolji uvid u proteinsku prirodu novog, do sada neokarakterisanog izvora. Protein iz tačke 1 sadrži jedan jedinstveni peptid (VYcDNcR), za koji sa velikom pouzdanošću možemo da kažemo da je sličan Ole e 1-nalik proteinu iz breze (*Betula pendula*). Ole e 1 je glavni alergen masline, a postoji i Ole e 1-nalik familija proteina koja takođe ima alergena svojstva. Na osnovu jedinstvenog peptida, može se pretpostaviti da ovaj protein može da poseduje određenu ukrštenu reaktivnost sa datim alergenom breze (*Betula pendula*) ukoliko pri alergijskoj reakciji postoje antitela specifična za sekvencu koja je homologa u ovim proteinima. Ovo svakako ostaje da se ispita detaljnije u budućim studijama. Protein iz tačke 3 sadrži jedan peptid homolog nepoznatom (neokarakterisanom) proteinu iz tamjanike (*Vitis rotundifolia*). Protein iz tačke 4 sadrži jedan peptid koji je homolog benzokinin reduktazi iz vrste pamuka poznatije kao Meksički pamuk (*Gossypium hirsutum*), benzokinin reduktaza je reduktaza koja katalizuje redukciju kinona i nema okarakterisana alergena svojstva. Protein iz tačke 5 sadrži jedan peptid homolog nepoznatom (neokarakterisanom) proteinu iz tamjanike (*Vitis rotundifolia*). Tačka 6 sadrži jedan peptid homolog izoflavon reduktazi iz grožđa (*Vitis vinifera*). Izoflavin reduktaza iz grožđa (*Vitis vinifera*) ima alergena svojstva, čak je nađen i određeni stepen ukrštene reaktivnosti između ovog proteina i alergena iz breze Bet v 6.

Protein iz tačka 7 sadrži jedan peptid homolog nepoznatom (neokarakterisanom) proteinu iz grožđa (*Vitis vinifera*), dok proteini označeni brojevima 9, 11 i 16 na gelu sadrže jedan peptid homolog nepoznatom (neokarakterisanom) proteinu iz breskve (*Prunus persica*). Rezultati masene spektrometrije otkrili su da protein iz tačke 10 sadrži jedan peptid homolog fosfoglicerat kinazi iz Američkog duvana (*Nicotiana tabacum*) za koju nisu za sada okarakterisana alergena svojstva. Protein iz tačke 12 sadrži peptid koji je homolog fosfoglicerat kinazi iz Američkog duvana (*Nicotiana tabacum*) za koju nisu za sada okarakterisana alergena svojstva. Protein iz tačke 14 ima peptid koji ukazuje da je ovaj protein sličan poligalakturonazi iz pamuka (*Gossypium barbadense*). *Gossypium barbadense* spada u istu familiju kao *Tilia*, a poligalakturonaza je okarakterisana kao potentan alergen kod više vrsti kao što su *Platanus acerifolia*, *Cynodon dactylon*, *Phleum pratense* iako za poligalakturonazu *Gossypium barbadense* nisu za sada pokazana alergena svojstva.

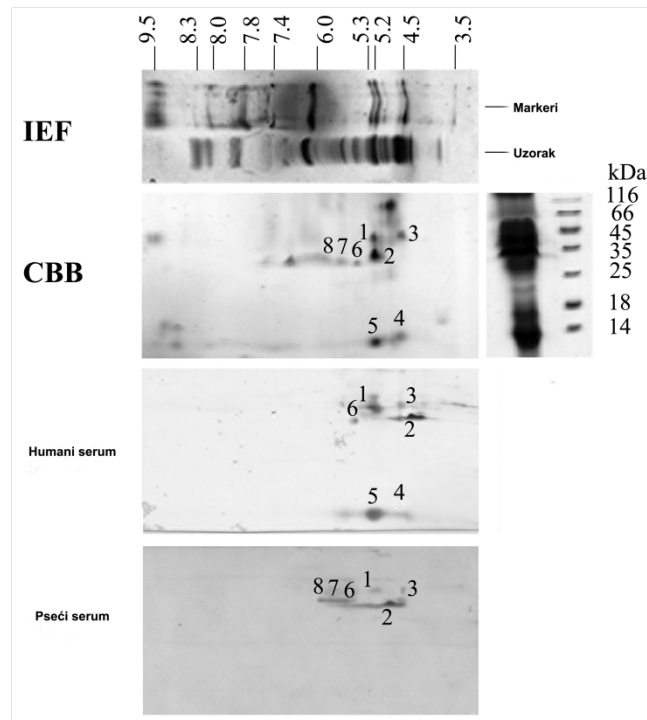
## **4.2. Imunoproteomska karakterizacija alergena ambrozije (*Ambrosia artemisiifolia*) kod pasa**

Polen ambrozije je već naširoko poznat izvor alergija kod čoveka i najčešći je izazivač alergije na području Severne Amerike i delovima Evrope. Podatak da izaziva više sezonskih alergijskih reakcija nego svi ostali poleni biljaka zajedno govori o alergijskoj potentnosti ovog izvora (Bagarozzi, Potempa, & Travis, 1998).

Ne postoje studije na temu alergijskog odgovora na ambroziju kod pasa, ali se mnogi autori slažu da je to svakako jedan od najznačajnijih izvora psećeg atopijskog dermatitisa (Reedy, Miller, & Willemsse, 1997; DW Scott, Miller, & Griffin, 2001; Zur, Ihrke, White, & Kass, 2002). Za razliku od ljudi, psi su i dalje vrlo podložni parazitnim infekcijama i stoga je za njihov serum karakterističan visok nivo IgE antitela. Kao posledica toga, detekcija veoma niskih koncentracija specifičnih IgE antitela značajno komplikuju metodologiju detekcije proteina koji su glavni uzročnici psećeg atopijskog dermatitisa.

### **4.2.1. Molekulska karakterizacija glavnih alergena ambrozije u psećem atopijskom dermatitisu pomoću 2D elektroforeze i 2D imunoblota**

Detaljna analiza i karakterizacija alergena ambrozije, kao i njihovih izoformi odrađena je 2-D elektroforezom, gde je prva dimenzija izoelektrofokusanje, a druga SDS-PAG elektroforeza pod neredukujućim uslovima. Proteini su zatim prenešeni na PVDF membranu, gde su tretirani serumima ljudi i pasa alergičnih na ambroziju. Rezultati su prikazani na *slici 4.9*.



Slika 4.9. – 2D Western blotovi ekstrakta polena ambrozije tretiranih sa serumima alergičnih ljudi i pasa. IEF – izoelektrično fokusiranje, CBB – Coomassie Brilliant Blue, M – proteinski molekularni markeri za pI vrednost; Uzorak – sirovi ekstrakt polena ambrozije; pH skala odgovara pI vrednostima markera.

Upoređivanjem rezultata dobijenih 1D i 2D imunoblotom, vidljivo je da su sve specifične trake koje su detektovane u 1D analizi i dalje prisutne u 2D u obliku tačkica sa približnim masama od 27, 38 i 45 kDa. Tačke od interesa su zatim isecane iz gela i nakon tripsinske digestije, analizirane nLC-MS/MS masenom spektrometrijom.

#### 4.2.2. Identifikacija proteina ambrozije koji su pokazali imunoreaktivnost na 2D blotu sa 2D gela pomoću nLC-MS/MS

Nakon što su detektovani proteini od interesa, isecani su iz gela, a zatim su prečišćeni i stavljeni na tripsinsku digestiju preko noći. Dobijeni digesti su analizirani pomoću masene spektrometrije.



Tabela 4.3 – Identifikacija celovitih izoformi alergena Amb a iz “imunoreaktivnih” tačaka sa neredukujućeg 2-D gela, pomoću nLC-MS/MS.

Broj tačke	Kod (UniProtKB)	Protein/ alergen	Pogodak/ pokrivenost	Broj peptida	Broj jedinstvenih peptida	Mr (kDa)
1	P27759	Predložena pektin lijaza/Amb a 1.0101	708/48	14	3	40
	E1XUL4	Predložena pektin lijaza/Amb a 1.0304	197/52	13	9	
	E1XUL2	Predložena pektin lijaza/Amb a 1	169/37	11	1	
	E1XUL3	Predložena pektin lijaza/Amb a 1.0202	66/30	8	4	
	E1XUL9	Predložena pektin lijaza/Amb a 1.0402	37/19	5	4	
	E1XUM0	Predložena pektin lijaza/Amb a 1	25/11	3	3	
2	P27759	Predložena pektin lijaza/Amb a 1.0101	450/58	18	17	34
	E1XUL9	Predložena pektin lijaza/Amb a 1.0402	449/63	17	16	
	E1XUL3	Predložena pektin lijaza/Amb a 1.0202	50/27	7	7	
	E1XUM0	Predložena pektin lijaza/Amb a 1	52/11	3	3	
3	P27759	Predložena pektin lijaza/Amb a 1.0101	934/51	15	14	38
	E1XUL9	Predložena pektin lijaza/Amb a 1.0402	88/34	9	8	
	E1XUM0	Predložena pektin lijaza/Amb a 1	44/15	4	4	
	E1XUL4	Predložena pektin lijaza/Amb a 1.0304	31/16	5	2	
	E1XUL3	Predložena pektin lijaza/Amb a 1.0202	26/21	6	3	
4	Q2KN23	Profilin/Amb a 8.0102	35/37	3	2	12
	Q2KN24	Profilin/Amb a 8.0101	28/37	3	2	
	Q64LH0	Profilin-3/Amb a 8	24/27	3	2	

*Tabela 4.4* – Identifikacija fragmenata izoformi lergena Amb a 1 iz “imunoreaktivnih” tačkaka sa neredukujućeg 2-D gela pomoću nLC-MS/MS.

Broj tačke	Kod (UniProtKB)	Protein/aler gen	Pogodak/pokrivenost	Broj peptida	Broj jedinstvenih peptida	Mr (kDa)
5	E1XUM0	Predložena pektin lijaza ( $\beta$ fragment)/Amb a 1	154/39	9	9	10
	E1XUL2	Predložena pektin lijaza ( $\beta$ fragment)/Amb a 1	75/10	2	2	
6	P27760	Polenski alergen Amb a 1.2 ( $\alpha$ fragment)/Amb a 1.0201	438/68	18	18	28
7	P27760	Polenski alergen Amb a 1.2 ( $\alpha$ fragment)/Amb a 1.0201	654/74	19	19	28
8	P27760	Polenski alergen Amb a 1.2 ( $\alpha$ fragment)/Amb a 1.0201	818/74	21	21	30

Analizirali smo 8 tačkaka prikazanih na slici 4.9. Poput seruma čoveka, pseći serumi su reagovali na svih 5 izoalergena Amb a 1 grupe. Tačnije, specifično IgE vezivanje vidljivo na 38 kDa u 1D imunoblotovima odgovara celim Amb a 1 izoformama: Amb a 1.0102, 1.0202, 1.0304, 1.0402 i prirodnoj varijanti Amb a 1.0501, E1XUM0 (*Tabela 4.3*, tačke 1, 2 i 3). Uspešno se detektuju dva para Amb a 1 varijanti, iako su aminokiselinske sekvence dužine 396 i 398 i razlikuju se u samo jednoj aminokiselini (prirodni varijeteti). Specifično vezivanje koje se javlja u regionu od 27-30 kDa u 1D imunoblotu, odgovara  $\alpha$  fragmentu Amb a 1.0201 (tačke 6-8), pre nego Amb a 4 (*Tabela 4.4*). Združeni humani serumi takođe reaguju sa  $\beta$  fragmentom Amb a 1 i Amb a 8.0102 i profilinom 3 (*Tabela 4.3*, tačka 5 i *tabela 4.4*, tačka 4). Svi izoalergeni Amb a 1 grupe su identifikovani sa visokom sigurnošću, što je odličan rezultat, ako se ima na umu da su Amb a 1 varijante veoma sličnih sekvenci, molekulskih masa i pI vrednosti.

Zahvaljujući postojanju većeg peptida određenih sa visokim stepenom pouzdanosti, kao i onih “jedinstvenih” peptida koji se minimalno razlikuju, ali je ipak ta razlika uočena među izoformama, mogli smo po prvi put da pokažemo postojanje nekoliko Amb a 1 varijanti na proteinskom nivou čije postojanje je predviđeno na osnovu transkripata: E1XUL2-E1XUL4, E1XUL9 i E1XUM0 (*Slika 4.10*).

Pozicija		#	Pristupna šifra
1	MGIKHCCYILYFTLALVTLQPVRSADLQEILP-VNET-RRLTTSYGAYNIIDGCWRGKA	58	P27759
1	MGIKHCCYILYFTLALVTLQPVRSADLQEILP-VNET-RRLTTSYGAYNIIDGCWRGKA	58	E1XUL2
1	-----CCYILYFTLALVILLQPVRSADLQOILPSVNET-RSLTTCGYNIIDGCWRGKA	54	E1XUL9
1	MGIKHCCYILYFTLALVTLQPVRSADVEEFLPSANETRRSLKACEAHNIIDKCWRCKA	60	P27760
1	MGIKHCCYILYFTLALVTLQPVRSADVEEFLPSANETRRSLKACEAHNIIDKCWRCKA	60	E1XUL3
1	MGIKQCCYILYFTLALVALLQPVRSAGVEIILPSVNET-RSLQACEALNIIDKCWRGKA	59	E1XUL4
1	MGIKHCCYILYFTLALVTLVQAGRLGEEV-DILPSPNDTRRSLQGEAHNIIDKCWRCKP	59	E1XUM0
	***** : * * * * : : * * * * * * * : * * * * * * * * *		
59	DWAENRKALADCAQGFQGTGGKDGDIYTVTSELDLDDVANPKEGTLRFGAAQNRPLWII	118	P27759
59	DWAENRKALADCAQGFQGTGGKDGDIYTVTSELDLDDVANPKEGTLRFGAAQNRPLWII	118	E1XUL2
55	DWAENRKALADCAQGFQGTGGKDGDIYTVTSELDLDDVANPKEGTLRFGAAQNRPLWII	114	E1XUL9
61	DWANNRQALADCAQGFQGTGGKHGDVYTVTSDKDDVANPKEGTLRFAAAQNRPLWII	120	P27760
61	DWANNRQALADCAQGFQGTGGKHGDVYTVTSDKDDVANPKEGTLRFAAAQNRPLWII	120	E1XUL3
60	DWENNRQALADCAQGFQGTGGKWDVYTVTSDKDDVANPKEGTLRFAAAQNRPLWII	119	E1XUL4
60	DWAENRQALGDCAQGFQKATHGGKWDIYVMVTSQDDDDVANPKEGTLRFATQDRPLWII	119	E1XUM0
	* : *		
119	FERDMVIRLDKEMVNSDKTIDGRGAKVEIINAGFTLNGVKNVIIHNIIMHDVKNVPGGL	178	P27759
119	FERDMVIRLDKEMVNSDKTIDGRGAKVEIINAGFTLNGVKNVIIHNIIMHDVKNVPGGL	178	E1XUL2
115	FARDMVIRLDRELAINDKTIDGRGAKVEIINAGFAIYNVKNIIHNIIMHDIVVNPGL	174	E1XUL9
121	FKRNMVIRLHNLQELVNSDKTIDGRGVKNIVNAGLTLMNKNVIIHNIIMHDIKVCPGGM	180	P27760
121	FKRNMVIRLHNLQELVNSDKTIDGRGVKNIVNAGLTLMNKNVIIHNIIMHDIKVCPGGM	180	E1XUL3
120	FKNDMVIRLHNLQELVNSDKTIDGRGVKVEIINGGLTLMNKNVIIHNIIMHDVKNVLPGGM	179	E1XUL4
120	QRDMIIYLQOEMVNSDKTIDGRGAKVELVYGGITLMNKNVIIHNIIMHDVIRVLPGGR	179	E1XUM0
	* : *		
179	IKSNDGPAAPRAGSDGDAISISGSSQIWIHDHCSLSKSDGLVDAKLGTRRLTVSNLFTQ	238	P27759
179	IKSNDGPAAPRAGSDGDAISISGSSQIWIHDHCSLSKSDGLVDAKLGTRRLTVSNLFTQ	238	E1XUL2
175	IKCNDGPPAPRAGSDGDAISISGSSQIWIHDHCSLSKAVDGLIDAKHGSHFTVSNCLFTQ	234	E1XUL9
181	IKSNDGPPILRQSDGDAINVAGSSQIWIHDHCSLSKASDGLLDITLGGSHVTVSNCKFTQ	240	P27760
181	IKSNDGPPILRQSDGDAINVAGSSQIWIHDHCSLSKASDGLLDITLGGSHVTVSNCKFTQ	240	E1XUL3
180	IKSNDGPPILRQSDGDTINVAGSSQIWIHDHCSLSKSDGLVDVTLGSHVTVSNCKFTQ	239	E1XUL4
180	IKSNGGPAIPRHQSDGDAIHVTPGSSDIWIHDHCSLSKSDGLVDVNWGSTGVPTSNCKFTH	239	E1XUM0
	* *		
239	HQFVLLFGAGDENIEDRGMLATVAFNFTDNDVQRMPCRHRGFFQVNNNYDKWGSYAIG	298	P27759
239	HQFVLLFGAGDENIEDRGMLATVAFNFTDNDVQRMPCRHRGFFQVNNNYDKWGSYAIG	298	E1XUL2
235	HQYLLLFWD----FDERGMLCTVAFNKFDTNDVQRMPLNLRHGFFQVNNNYERWGSYALG	290	E1XUL9
241	HQFVLLLGADDTHYQDKGMLATVAFNMFTHVDQRMPCRHRGFFQVNNNYDRWGTYAIG	300	P27760
241	HQFVLLLGADDTHYQDKGMLATVAFNMFTHVDQRMPCRHRGFFQVNNNYDRWGTYAIG	300	E1XUL3
240	QSKAILLGADDTHYQDKGMLATVAFNMFTHVDQRMPCRHRGFFQVNNNYDRWGTYAIG	299	E1XUL4
240	HEKAVLLGASDTHFQDLKMHVTLAYNIFNTNVHERMPCRHRGFFQIVNNFYDRWDKYAIG	299	E1XUM0
	: : : : : : *		
299	GSASPTILSQGNRFPCAPERSKKNVLRHGEA-AAESMKWNWRTNKDVLENGAI FVASGV	357	P27759
299	GSASPTILSQGNRFPCAPERSKKNVLRHGEA-AAESMKWNWRTNKDVLENGAI FVASGV	357	E1XUL2
291	GSAGPTILSQGNRFASDI--KKEVVGRYGESAMSESINWNRWSYMDVFENGAI FVPSGV	348	E1XUL9
301	GSSAPTILSQGNRFAPDDI IKKNVLRGTGTG-NAESMSWNWRTDRDLLENGAI FLPSGS	359	P27760
301	GSSAPTILSQGNRFAPDDI IKKNVLRGTGTG-NAESMSWNWRTDRDLLENGAI FLPSGS	359	E1XUL3
300	GSSAPTILSQGNRFAPDDQIKKNVLRGTGTG-AAESMAWNRSDKDLLENGAI FVTSGS	358	E1XUL4
300	GSSNPTILSQGNRFVAPDFIYKKNVLRGTGAQ-EPEWMTWNWRTQNDVLENGAI FVASGS	358	E1XUM0
	* * : *		
		Razlika u sekvenci	Identičnost (%)
358	DPVLTPEQSAGMI PAEPGESALSLSLTSAGVLSQPGAPC	396 P27759	100
358	DPVLTPEQSAGMI PAEPGESALSLSLTSAGVLSQPGAPC	396 E1XUL2	99
349	DPVLTPEONAGMI PAEPGEAVLRLTSAGVLSQPGTFC	387 E1XUL9	19%
360	DPVLTPEQKAGMI PAEPGEAVLRLTSAGVLSCHQGAPC	398 P27760	28%
360	DPVLTPEQKAGMI PAEPGEAVLRLTSAGVLSCHQGAPC	398 E1XUL3	14%
359	DPVLTPEQKAGMI PAEPGEAVLRLTSAGVLSCHQGAPC	398 E1XUL3	14%
359	DPVLTPEQKAGMI PAEPGEAVLRLTSAGVLSCHQGAPC	397 E1XUL4	14%
359	DPVLTPEQKAGMI PAEPGEAVLRLTSAGVLSCHQGAPC	397 E1XUM0	29%
	***** * : *		

Slika 4.10. – Prikaz preklapanja sekvenci Amb a 1 izoformi i pokrivanje sekvence peptidima visoke pouzdanosti, dobijenih peptidnom digestijom i analiziranih na nLC-MS/MS. Među mnogim peptidima visokog nivoa pouzdanosti (obeleženi svetlo sivom bojom) nalaze se i jedinstveni peptidi koji omogućavaju razlikovanje vrlo bliskih izofornskih sekvenci, kao što su sekvence uokvirene crnim pravougaonikom. Razlika od jedne amino kiseline između dve izoforme obeležena je tamno sivom bojom. Svrstavanje i poravnanje sekvenci, kao i pretraga homologije (pBLAST) odrađena je naspram UniProt baze podataka, koja je objavljena 2013\_03, a ažurirana 6.3.2013. AA – aminokiselina, pristupni broj – jedinstveni pristupni broj za protein u datoj bazi, “\*” – svi aminokiselinski ostaci u koloni su identični; “:” – konzervirani aminokiselinski ostaci; “.” – polukonzervirani aminokiselinski ostaci.

### **4.3. Modulacija imunskog odgovora polifenolima zelenog čaja**

Mnoge studije koje su se bavile interakcijama između polifenola i proteina dale su konstante vezivanja, prikaz mogućeg mesta vezivanja polifenola, karakter sila značajnih za prepoznavanje, kao i uticaj protein-polifenol kompleksa na stabilnost i anti-oksidantne osobine polifenola (A. Singh, Holvoet, & Mercenier, 2011; Zuercher, Holvoet, Weiss, & Mercenier, 2010). Pokazano je da ekstrakt jabuke koji sadrži povećanu količinu polifenola ublažava simptome alergije na ovalbumin kod miševa sa razvijenom alergijom na ovaj protein, i predloženi mehanizmi za ovaj fenomen su delimično zasnovani na stabilnim interakcijama između polifenola i proteina (Zuercher, Holvoet, Weiss, & Mercenier, 2010). Ali je svakako ovaj biološki fenomen modulacije imunskog odgovora pomoću polifenola, još uvek nedovoljno razjašnjen.

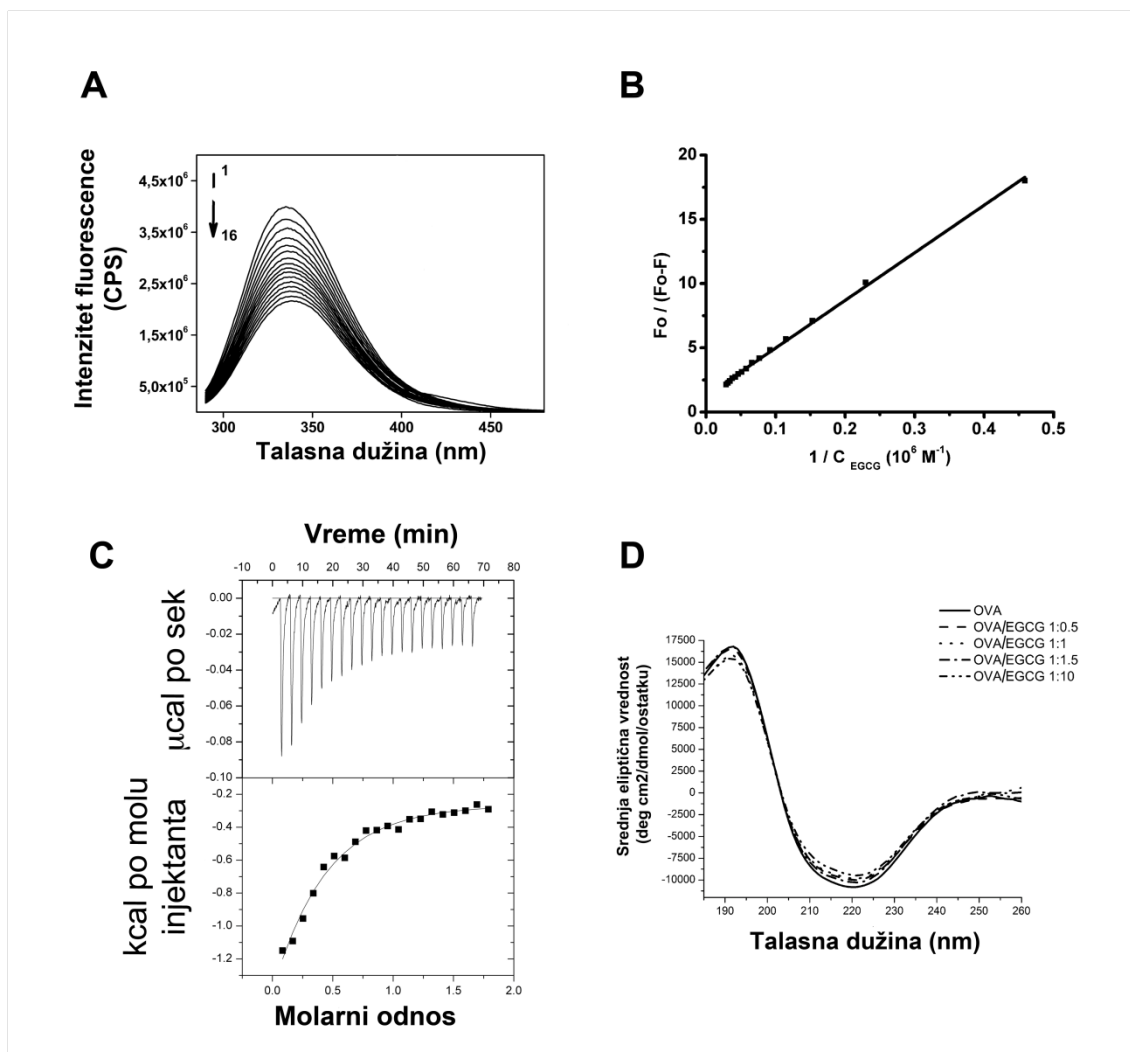
U cilju daljeg razjašnjenja ispitivali smo mehanizam uticaja katehina zelenog čaja modulaciju funkcije imunskog odgovora, na primeru ovalbumina kao modela proteina alergena hrane.

#### **4.3.1. Spektrofluorimetrija i izotermalna titraciona kalorimetrija ovalbumina u prisustvu EGCGa**

Još ranije je ukazano da biljni polifenoli specifično interaguju sa alergenima hrane i da takve interakcije mogu da utiču na imuni odgovor čoveka. Zbog toga je predloženo da se polifenoli možda mogu upotrebiti za tretman alergijskih oboljenja. Mi smo postavili hipotezu da se EGCG vezuje za ovalbumin koji je glavni protein hrane i glavni alergen belanceta kokošijeg jajeta. Da bismo utvrdili jačinu i prirodu interakcija između OVA i EGCG u rastvoru, upotrebili smo spektrofluorimetriju i izotermalnu kalorimetrijsku titraciju (ITC).

Fluorescencija triptofana (Trp) dominira fluorescentnim spektrom OVA (*Slika 4.11. A*). OVA sadrži tri Trp koji se nalaze na diskretnim mestima u polipeptidnom lancu i koji zauzimaju različite pozicije u odnosu na rastvor: Trp160 je okrenut ka rastvoru, Trp194 je zaklonjen od rastvora i uronjen je u hidrofobni džep, dok je Trp275 delimično izložen rastvoru. Dodavanje rastućih količina EGCG-a rastvoru OVA izaziva smanjenje ("gašenje") fluorescencije u talasnim dužinama između 290 i 450nm (*Slika 4.11. A*). Takođe, dodatak EGCG-a izaziva primetan pomeraj emisionog maksimuma

OVA ka višim talasnim dužinama (tzv. “crveni pomeraj”) (Slika 4.11. A). Ovi rezultati ukazuju da u prisustvu EGCG-a fluorofore OVA postaju više izložene rastvoru, što povećava sposobnost Trp da uspostavlja vodonične (H-) veze.



Slika 4.11. – Efekat EGCGa na fluorescenciju ovalbumina i CD spektri sugerišu da se EGCG vezuje za ovalbumin. (A) “Gašenje” fluorescencije ovalbumina dodavanjem EGCGa (1 – 16: 0 – 34.7 µM). Strelica pokazuje trend promene fluorescencije ovalbumina nakon dodatka EGCG, kao i trend povećavanja koncentracije EGCGa tokom eksperimenta. (B) Štern-Volmerov dijagram za kompleks OVA/EGCG. (C) ITC termogram otkriva da je vezivanje EGCGa za OVA povezan sa promenom egzotermičke entalpije i da ovalbumin može da veže veći broj ligandnih molekula pri većim koncentracijama EGCGa. Finalni molarni odnosi OVA:EGCG su: 1:0.5, 1:1, 1:1.5 i 1:10. (D) CD spektar ovalbumina snimljen sa i bez prisustva EGCGa

“Gašenje” emisije Trp na 340 nm se može koristiti za procenu jačine interakcije između OVA i liganda, u ovom slučaju EGCG-a, primenom Štern-Volmerove jednačine i analize. Intenzitet “gašenja”, koji se predstavlja kao linearni odnos između Fo/F i koncentracije izazivača “gašenja” (“kvenčer”), daje vrednost tzv. Štern-Volmerove

konstante. Pošto je u našem slučaju ova kriva linearna (*Slika 4.11. B*), mi smo odredili da je konstanta “gašenja” ( $K_{sv}$ )  $3.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Takođe, naša izračunavanja pokazuju da je 70% fluorofora izloženo rastvoru ( $f_a = 0.70$ ). Ako pretpostavimo da je polu-život Trp u OVA 10ns (R. Q. Wang, et al., 2013) i pošto je izmerena  $K_{sv}$  viša od brzine “gašenja” difuzijom ( $k_q = 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Gudgin, William, & Ware, 1981)), zaključujemo da se OVA/EGCG kompleks formira u rastvoru i da EGCG “gasi” OVA fluorescence statičkim mehanizmom, što, pak, omogućava primenu dvostruke logaritamske jednačine za određivanje konstante vezivanja ( $K_a$ ) i stoihiometrije OVA/EGCG kompleksa. Konačno, naša merenja pokazuju da je konstanta vezivanja ( $K_a$ ) EGCG za OVA  $1.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  (ili  $K_d = 83 \text{ }\mu\text{M}$ ) i da je stoihiometrija kompleksa 0.94 EGCG molekula po molekulu OVA.

ITC merenja takođe podržavaju tezu da se EGCG stabilno vezuje za OVA. ITC termogram pokazuje da je formiranje kompleksa praćeno egzotermnom promenom entalpije. Pošto ITC rezultati nisu mogli da se objasne jednostavnim modelom sa jednim mestom vezivanja, moguće je da OVA vezuje više molekula liganda pri povišenim koncentracijama EGCG-a koje su korišćene u ITC eksperimentima (*Slika 4.11. C*).

#### **4.3.2. Vezivanje EGCG za OVA izaziva promene u sadržaju sekundarne strukture u OVA**

Prethodne studije pokazale su da vezivanje polifenola za proteine hrane utiče na strukturu tih proteina (Kanakis, Hasni, Bourassa, Tarantilis, Polissiou, & Tajmir-Riahi, 2011; Yuksel, Avci, & Erdem, 2010). Na primer, pokazano je da vezivanje EGCG za  $\beta$ -laktoglobulin (BLG) povećava sadržaj  $\beta$ -pločica u proteinu i to na račun neuređene petlje, što opet ukazuje da se struktura proteina uređuje i stabilizuje u prisustvu EGCG. Da bismo utvrdili da li EGCG utiče na strukturu OVA i na sadržaj sekundarne strukture, obavili smo seriju CD spektrometrijskih merenja. CD spektrometrija je u suštini blaga i osetljiva metoda za određivanje promena u sekundarnoj strukturi proteina.

Naša merenja pokazuju da dodatak EGCG-a u rastvor OVA povećava sadržaj  $\beta$ -pločica u OVA. Ovaj uticaj je prisutan pri molarnom odnosu od 1:1 i ostaje prisutan pri višim koncentracijama EGCG-a (*Slika 4.11. D*). Dalje, ovo povećanje sadržaja  $\beta$ -pločica pojavljuje se pri koncentracijama EGCG-a oko i iznad izmerene vrednosti  $K_d$  (*Tabela 4.5*). Kao u slučaju BLG-a, sadržaj  $\beta$ -pločica je uvećan na račun smanjenja

neuređene strukture. Dakle, zaključujemo da vezivanje EGCG za OVA utiče na promenu sekundarne strukture OVA i da je ovaj uticaj verovatno posledica konformacione promene OVA nastale po vezivanju EGCG.

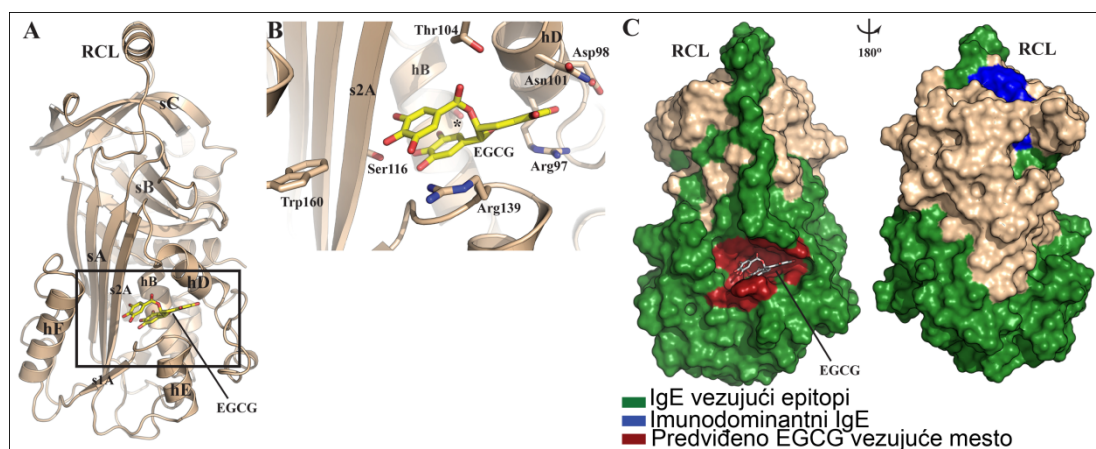
*Tabela 4.5. Sadržaj sekundarnih struktura u ovalbuminu izmerene pomoću CD spektrometra*

<b>OVA/EGCG molarni odnos</b>	<b><math>\alpha</math>-heliks</b>	<b><math>\beta</math>-pločica</b>	<b>zavojnica</b>	<b>neuređena struktura</b>
<b>0</b>	29,40	19,10	20,40	31,10
<b>0,5</b>	30,50	21,20	19,70	28,60
<b>1</b>	29,30	25,55	20,05	25,10
<b>1,5</b>	30,90	20,35	19,35	29,40
<b>10</b>	30,05	28,65	18,00	23,30

### **4.3.3. Pronalaženje mogućih vezivnih mesta za EGCG na površini OVA korišćenjem metoda kompjuterske simulacije vezivanja molekula**

Kompjuterska simulacija vezivanja i teoretska izračunavanja ukazuju na nekoliko mogućih mesta vezivanja EGCG-a na površini OVA. Tačnije, naša analiza otkriva 12 različitih ligandnih struktura koje se vezuju za OVA vezivnom energijom iznad  $32.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Na osnovu predviđene energije vezivanja i prirode mogućih interakcija, najverovatnije mesto vezivanja nalazi se na vrhu heliksa E (hE) (*Slika 4.12. A*). U stvari, 8 struktura ( od 12 ukupno) sa najnižom energijom vezivanja, vezuje se u različitim orijentacijama i sa različitim vezivnim energijama upravo za ovo vezivno mesto. Uslovno rečeno “najbolja” struktura među njima vezuje se za OVA energijom od  $-37.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Preostale četiri strukture vezuju se za različita mesta na OVA sa nešto nižim energijama vezivanja, a koje su u opsegu od  $-29.3$  do  $-32.2 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Priroda interakcija između EGCG i OVA na ovim “slabijim” mestima vezivanja ukazuje da su ta mesta od manje važnosti i da su afiniteti vezivanja značajno niži. Zbog toga, mi smo ovde detaljno opisali samo interakcije visokog afiniteta između EGCG i OVA.

Visoko-afinitetno mesto vezivanja je sastavljeno od amino-kiselinskih ostataka iz nekoliko strukturnih elemenata. Bazu vezivnog mesta sačinjavaju amino kiseline iz hB, dok hD, pločica 2A (s2A) i petlja koja spaja hE i s1A (hE-s1A) čine zidove vezivnog mesta (Slika 4.12. A). Trihidrobenzoatni i trihidrofenilni prstenovi EGCG-a “sede” iznad petlje hE-s1A, složeni jedan iznad drugog i okrenuti ka s2A i hF, dok je dihidrobenzopiranski prsten okrenut na suprotnu stranu, ka hD (Slika 4.12. A). Karbonilni kiseonik trihidrobenzoata interaguje sa O $\gamma$  atomom u Thr104 (svi brojevi amino kiselina OVA u tekstu su u skladu sa sekvencom u PDBID 1OVA), dok hidroksilne grupe ovog prstena ostvaruju H-veze sa guanidinium grupom Arg139 i amidnom grupom Ser116 (Slika 4.12. B). Slično, hidroksilne grupe trihidrofenilnog prstena prave H-veze sa O $\gamma$  atomom Ser59 i karbonilnim kiseonicima Ser116 i Arg139 (Slika 4.12. B). Sve ove interakcije pozicioniraju trihidrobenzoatni i trihidrofenilni prsten EGCG-a na samo 4 Å od Trp160 koji se nalazi na fleksibilnom hF i koji je potpuno okrenut ka rastvoru. Ova činjenica je jako važna za razumevanje ranije pomenutih promena u fluorescentnim i CD spektrima OVA.



Slika 4.12. – Kompjuterska simulacija vezivanja molekula otkriva potencijalna EGCG-vezujuća mesta na ovalbuminu. (A) Najjače vezivno mesto EGCGa se nalazi u šupljini zatvorenoj pomoću hB, hD, hE, s2A i hE-s1A petlje. Pravougaonikom je označena oblast koja je detaljnije prikazana u panelu B. Glavni strukturni elementi ovalbumina su prikazani i obojeni bež bojom. EGCG je obojen žutom bojom. (B) Detaljan pregled EGCG vezivanja. Elementi sekundarne strukture koje čine EGCG-vezujući džep su istaknuti; aminokiselinski ostaci koji su u bliskom kontaktu sa EGCGom i Trp160 su obojeni bež bojom, kiseonik na Ser59 je obeležen sa zvezdicom. (C) Površinski dijagram potencijalnog OVA/EGCG kompleksa pri čemu su glavna vezujuća mesta istaknuta. Prikaz levog dijagrama je iste orijentacije kao i u panelu A, dok se dijagram sa desne strane rotiran za 180° suprotno od kazaljke na satu oko vertikalne ose. Površina koja pokriva glavne IgE epitope je zelena, dominantni IgE epitop je plave boje, potencijalno



*EGCG vezujuće mesto je tamno crveno, dok je EGCG sive boje.*

Sveukupno gledano, naše kompjuterske simulacije predlažu postojanje bar jednog visoko-afinitetnog vezujućeg mesta za EGCG na površini OVA koje se nalazi u neposrednoj blizini glavne fluorofore u ovom alergenu. Takođe, naši rezultati predlažu da se vezivno mesto za EGCG samo delimično preklapa sa IgE-vezivnim mestom 1 (amino kiseline 24-33 i 56-182) (Kahlert, Petersen, Becker, & Schlaak, 1992) i da je različito od dominantnog IgE-vezujućeg epitopa (amino kiseline 364-372) (*Slika 4.12. C*).

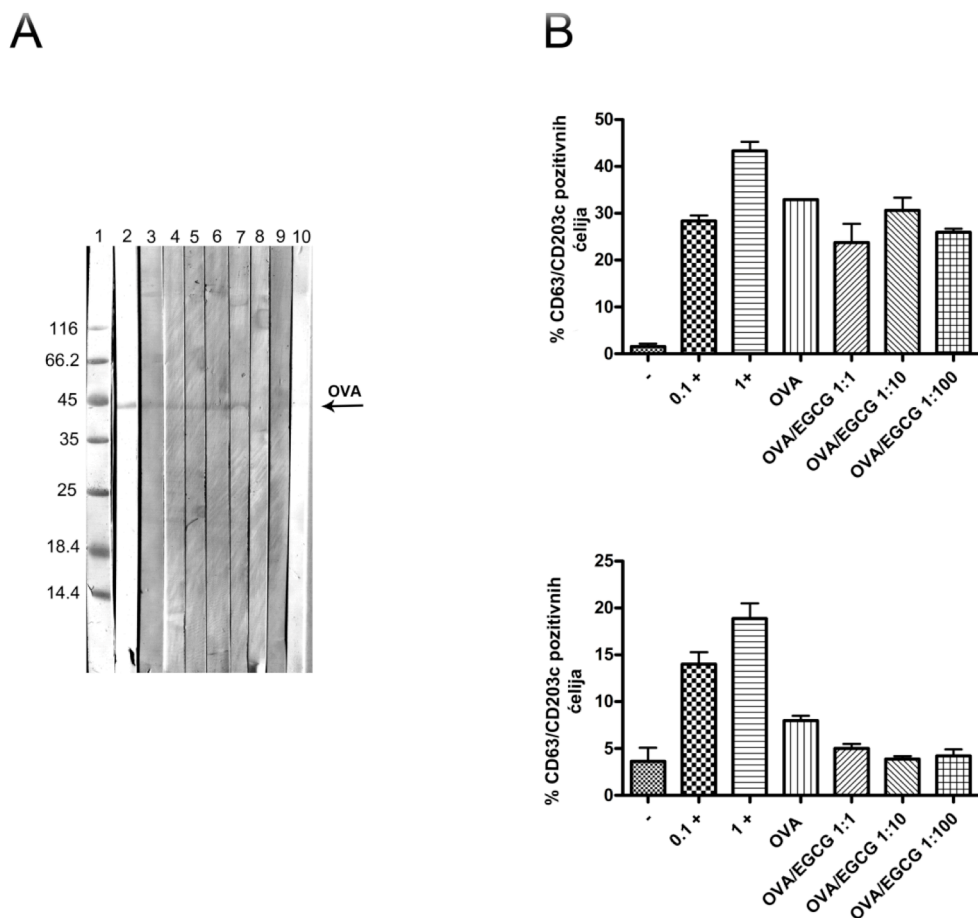
#### **4.3.4. Vezivanje EGCG za OVA ne sprečava aktivaciju bazofila u pacijentima alergičnim na kokošije jaje**

Promene u konformaciji i površinskoj hidrofobnosti proteina mogu da izazovu maskiranje IgE epitopa, što opet može da utiče na interakcije alergena sa antitelima i receptorima na ćelijskoj površini. Posledično, te promene u proteinskoj strukturi mogu da utiču na biološke procese koji su zavisni od površinskog prepoznavanja, kao što je endocitoza kod antigen-prezentujućih ćelija (APĆ). Sa ciljem da se utvrdi da li binarni OVA/EGCG kompleks moduliše pomenute biološke procese, mi smo upotrebili test inhibicije IgE vezivanja i test aktivacije bazofila.

Test inhibicije vezivanja IgE molekula je upotrebljen da se utvrdi da li EGCG sprečava specifičnu interakciju između OVA i IgE antitela iz seruma pacijenata alergičnih na kokošije jaje. Naši rezultati jasno pokazuju da EGCG ne sprečava IgE-OVA interakciju (*Slika 4.13. A*), što ukazuje da je vezivno mesto za EGCG na različitoj lokaciji od vezivnog mesta za IgE, kao i da je interakcija EGCG-OVA nižeg afiniteta u poređenju sa IgE-OVA interakcijom. Važno je naglasiti da su isti rezultati dobijeni bez obzira na koncentraciju EGCG-a koja je korišćena u eksperimentu (*Slika 4.13. A*).

Cilj testa aktivacije bazofila je bio da se utvrdi da li OVA/EGCG kompleks zadržava sposobnost da spoji anti-OVA IgE antitela sa bazofilima izolovanim iz alergičnih pacijenata. Interakcija IgE sa bazofilima aktivira Fcε I receptor, degranulaciju bazofila i ekspresiju CD63 i CD203c na površini ćelije. Neposredni efekti dodatka EGCGa na alergene hrane nisu sprečili degranulaciju bazofila kod alergičnih pacijenata. Ovim testom smo odredili procenat bazofila koji eksprimira CD63 i CD203c aktivacione markere, pomoću protočne citometrije, nakon *in vitro* stimulacije sa OVA i

OVA/EGCG kompleksima, koristeći dvostruko obeležavanje monoklonalnim antitelima anti-CD63-FITC i anti-CD203c-PE. Naši rezultati pokazuju da i u prisustvu EGCG-a OVA efikasno spaja specifične IgE molekule sa receptorima na površini bazofila i da izaziva njihovu anafilaktičku degranulaciju (Slika 4.13. B). Bazofili su izolovani iz dva pacijenta alergična na kokošije jaje. Takođe, nivo aktivacije bazofila ne menja se u zavisnosti od toga da li je korišćen samo OVA kao stimulus ili, pak, smesa koja sadrži i OVA i EGCG (Slika 4.13. B).



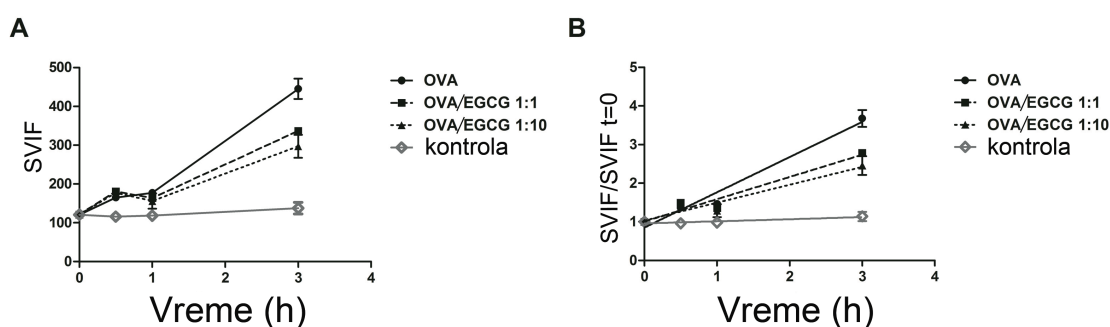
Slika 4.13. – IgE-ovalbumin inhibitorni esej i aktivacija bazofila ovalbuminom u prisustvu EGCGa. (A) Uticaj OVA/EGCG kompleksa na vezivanje specifičnih IgE antitela za OVA. Traka 1 - molekularni markeri, traka 2 – transferovani protein na membrani, obojen Ponceau S bojom, traka 3 – pozitivni serum, trake 4 – 7 - varirajuće koncentracije EGCGa (1, 5, 10, 15 i 100  $\mu$ M) inkubirane sa pozitivnim serumom, traka 8 – 100  $\mu$ M EGCG i pozitivni serum, traka 9 – OVA/EGCG bez prisustva seruma, traka 10 – OVA/EGCG i negativni serum. (B) U testu aktivacije bazofila hteli smo da proverimo da li dodatak EGCGa ovalbuminu utiče na aktivaciju bazofila na dva pacijenta (gornji i donji histogram) alergična na kokošije jaje. Negativna kontrola (-) predstavlja netretirani uzorak, dok su pozitivne kontrole uzorak krvi alergičnih pacijenata tretiran sa dve koncentracije anti-humanog IgE antitela (0.1+ i 1+). Četvrti tretman na oba histograma predstavlja dodatak samog ovalbumina, a potom slede uzorci sa dodatim EGCGom u odgovarajućoj koncentraciji (OVA/EGCG 1:1, 1:10,

1:100).

#### 4.3.5. EGCG sprečava apsorpciju OVA od strane monocita

Monociti i druge ćelije imunskog sistema koje mogu da služe kao APC predstavljaju prihvatljiv model sistem za izučavanje apsorpcije i obrade modifikovanih alergena i alergena asociраних sa bioaktivnim jedinjenjima ili polimerima (Marengo, Bonomi, Iametti, Prinz, Hempelmann, Boye, et al., 2011). U cilju efikasnog “hvatanja” stranog molekula, APC koriste nekoliko endocitotskih mehanizama (Kitzmuller, Wallner, Deifl, Mutschlechner, Walterskirchen, Zlabinger, et al., 2012). Međutim, promene u strukturi alergena mogu da promene apsorpciju alergena od strane APC i da utiču na alergijski odgovor kao što je već prikazano za varijante Bet v1 alergena kod kojih je uvijanje proteina bilo promenjeno (Thumann, Moc, Humrich, Berger, Schultz, Schuler, et al., 2003).

Sa ciljem da utvrdimo da li EGCG može da spreči apsorpciju OVA, uradili smo testove apsorpcije alergena u kojima smo koristili humane monocite. CD14<sup>+</sup> monociti su prečišćeni pozitivnom selekcijom i izloženi dejstvu ili OVA obeleženim FITC bojom (FITC-OVA) ili različitim smesama OVA-FITC/EGCG u dužini do 3 sata. Uzorci su nakon toga analizirani pomoću protočnog citometra i rezultati su izraženi preko srednje vrednosti intenziteta fluorescence u određenom vremenskom intervalu.

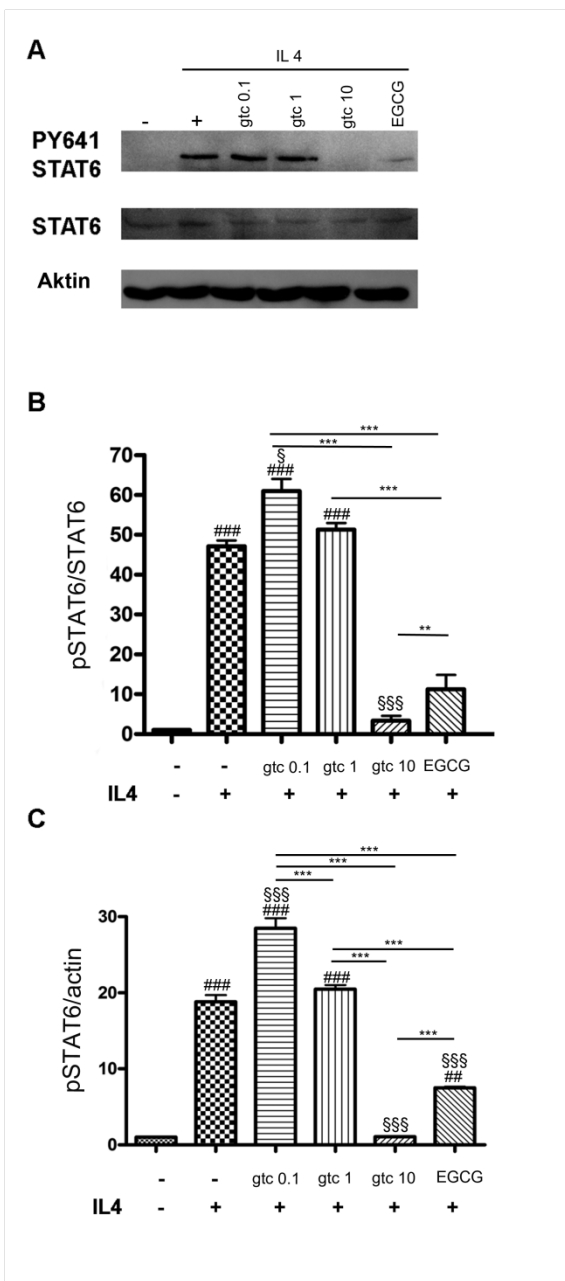


Slika 4.14. – EGCG dovodi do smanjenog preuzimanja FITCom obeleženog ovalbumina od strane humanih monocita izolovanih iz krvi nealergičnih pacijenata. (A) Srednja vrednost intenziteta fluorescence (SVIF) CD14<sup>+</sup> monocita je merena pomoću protočne citometrije nakon 0, 0.5, 1 i 3 sata od preuzimanja. (B) Analiza kinetike preuzimanja: linearna regresija je postignuta kada su SVIF vrednosti za uzorke u vremenu t=0.5, 1 i 3 h podeljeni sa prosečnom vrednošću za SVIF u t=0 h. Odnosi 1:1 i 1:10 predstavljaju finalni odnos OVA/EGCG.

Naši rezultati pokazuju da sveže izolovani monociti efikasno apsorbuju FITC-OVA (*Slika 4.14. A*). Svakako, važniji rezultat je da EGCG smanjuje nivo apsorpcije FITC-OVA kod monocita, tako što smanjuje njenu brzinu. Ovaj rezultat ukazuje na mogući mehanizam kojim kompleksi između polifenola i alergena modifikuju imuni odgovor čoveka.

#### **4.3.6. Katehini zelenog čaja inhibiraju fosforilaciju STAT6 od strane IL-4**

Signalna kaskada IL-4/IL-4R tipa I u hemopoetskim ćelijama rezultuje fosforilacijom Tyr461 i aktivacijom STAT6. STAT6 je transkripcioni factor odgovoran za kritične biološke funkcije citokina IL-4 (Nelms, Keegan, Zamorano, Ryan, & Paul, 1999). Ovde smo pokazali da tretman PBMC sa IL-4 rezultira fosforilacijom Tyr461 u STAT6 (*Slika 4.15.*). Fosforilovani STAT6 je detektovan Western blot analizom lizata PBMC ćelija koje su prethodno tretirane sa IL-4. Dodatak viših koncentracija katehina ili 10  $\mu$ M EGCG PBMC ćelijama koje su istovremeno tretirane sa IL-4, smanjilo je nivo fosforilacije STAT6 do nivoa primećenog kod kontrolnih uzoraka; ovo se najbolje vidi po odnosima fosfoSTAT6/STAT6 i fosfoSTAT6/ $\beta$ -aktin u ćelijskim lizatima (*Slika 4.15.*).



Slika 4.15. – Određivanje IL-4 indukovane fosforilacije STAT6 molekula u monojedarnim ćelijama periferne krvi tretiranim katehinima zelenog čaja i EGCGom. (A) Western blot fosforilovanog STAT6. Jednake količine ćelijskih lizata su analizirane SDS-PAGE elektroforezom, a zatim transferovane na PVDF membranu. Fosforilovani STAT6 je identifikovan korišćenjem antitela specifičnih na fosforilovani Tyr641 na STAT6 molekulu. Membrane su ponovo korišćene sa anti-STAT6 antitelima. Kao kontrola ravnomernog nanošenja razvijeni su blotovi i sa antitelima na  $\beta$ -aktin. (B) Finalna vrednost zastupljenosti fosforilovanog STAT6 proteina je normalizovana u odnosu na zastupljenost STAT6 proteina u uzorku. Nivo statističke značajnosti: ### statistički se razlikuje od negativne kontrole za  $p < 0.001$ , ## statistički se razlikuje od negativne kontrole za  $p < 0.01$ , §§§ statistički se razlikuje od pozitivne kontrole za  $p < 0.001$ , §§ statistički se razlikuje od pozitivne kontrole za  $p < 0.01$ , \*\*\* statistički se razlikuje za  $p < 0.001$ , \*\* statistički se razlikuje za  $p < 0.01$ . (C) Finalna vrednost zastupljenosti fosforilovanog STAT6 proteina je normalizovana naspram  $\beta$ -aktinske trake istog uzorka.

## 5. Diskusija

### 5.1. Karakterizacija alergenosti polena lipe (*Tilia tomentosa*)

Lipa nije razmatrana kao alergeni izvor zato što je smatrano da se oprašivanje ove biljne vrste vrši samo insektima. Međutim, prečnik polenskog zrna u vrstama *Tilia* roda se kreće oko 35-45  $\mu\text{m}$ , a mi smo u ovom radu pokazali, koristeći mikroskopske tehnike, da je prečnik polenskog zrna srebrnolisne lipe (*Tilia tomentosa*) oko 35  $\mu\text{m}$ . Imajući u vidu da je za polene do prečnika 90-100  $\mu\text{m}$  utvrđeno da mogu da poliniraju vetrom, može se reći da se i lipa može oprašivati vetrom i da stoga predstavlja potencijalni izvor alergena. Pored toga, period polinacije lipe preklapa se sa periodima polinacije poznatih i dobro ispitanih izvora alergena, te čak i da alergijski odgovor na lipu zaista postoji, znatna je verovatnoća da bi takav odgovor bio ili zamaskiran drugim alergenima ili bi bio pogrešno interpretiran kao alergija na, recimo, polen breze ili neke druge vrste drveta, već dokazanog izvora alergije.

U literaturi je do sada opisan samo jedan slučaj pacijenta alergičnog na polen lipe. Stoga smo odlučili da ispitamo da li je alergija na lipu prisutna u Srbiji. Pacijente koji su ispoljili alergijske simptome u periodu polinacije lipe ispitali smo testom kožne probe da bismo utvrdili da li dolazi do *in vivo* odgovora na ekstrakt polena lipe. Zaista, naša analiza je pokazala da je od 18 pacijenata, 14 pozitivno reagovalo na ekstrakt lipe, što je dodatna potvrda o alergenom potencijalu polena lipe.

U cilju identifikacije proteina odgovornih za alergijski odgovor pacijenata na polen lipe, urađene su Western blot analize. Proteinske trake koje su najintenzivnije vezivale IgE iz seruma alergičnih pacijenata su molekulskih masa od 14, 18, 25, 35 i 45 kDa. Dalja detaljna analiza ovih proteinskih traka je preko potrebna da bi se utvrdio identitet ovih proteina polena lipe koji su potencijalni glavni alergeni. Takva analiza bi poboljšala dijagnostička sredstva i ukazala put ka razvoju terapijskih agenasa za suzbijanje alergijskog odgovora.

Aktivacija bazofila iz pune krvi osobe koja je bila pozitivna u kožnom testu na određeni alergen, je standardni dijagnostički *in vitro* test koji se koristi za utvrđivanje nivoa alergenosti. Mi smo uradili ovaj test koristeći bazofile 8 pacijenata koji su reagovali na polen lipe u kožnom testu. Izmerena razlika između aktiviranih bazofila

tretiranih ekstraktom polena lipe u odnosu na negativnu kontrolu govori da je ekstrakt lipe sposoban da dovede do dimerizacije FcεR receptora koji dalje nastavljaju signalnu kaskadu i započinju alergijski odgovor. Pored aktivacije bazofila, mi smo upotrebili test proliferacije T ćelija što je još jedan *in vitro* test koji se koristi za utvrđivanje alergeno potencijala izvora alergena. U ovom slučaju, izolovali smo T limfocite iz krvi 8 alergičnih pacijenata i inkubirali ih nedelju dana ili sa ekstraktom polena lipe ili odgovarajućim kontrolnim rastvorima. Zabeležen porast u broju CD3+/CD4+ pozitivnih ćelija u odnosu na kontrolne uzorke ubedljivo pokazuje da T limfociti izolovani iz alergičnih pacijenata pokreću alergijski odgovor nakon kontakta sa ekstraktom polena lipe. Ovaj rezultat ide u prilog hipotezi da je lipa izvor alergena.

Kako je lipa rasprostranjena širom Evrope, interesantno je bilo ispitati kako će geografski i klimatski različite populacije pacijenata, koji su inače izloženi drugim alergenim vrstama, da odreaguju na polen lipe. Analizirali smo populacije pacijenata Nemačke i Švedske, koji su alergični na polen breze i pacijente sa područja južne Španije koji su, pak, alergični na polen masline. Poređenje IgE reaktivnosti u ELISA testu pokazuje da obe populacije pacijenata imaju IgE-posredovan odgovor na polen lipe, baš kao i populacija iz Srbije. Međutim, postoje i razlike u karakteru alergijske reakcije. Naime, profil proteina koje prepoznaju pacijenti alergični na brezu razlikuje se od profila pacijenata alergičnih na maslinu; pacijenti alergični na brezu prepoznaju pre svega proteinsku traku od 36-38 kDa, dok pacijenti alergični na maslinu prepoznaju proteinsku traku od oko 18 kDa iz ekstrakta polena lipe. Zanimljivo, rezultati inhibitornih ELISA testova su utvrdili da je moguće inhibirati IgE vezivanje za polen lipe, preinkubiranjem seruma sa polenom breze/masline, što govori o postojanju izvesnog stepena ukrštene reaktivnosti između polena breze/masline i polena lipe.

U zaključku, naši rezultati nedvosmisleno upućuju da je lipa potencijalni izvor alergena i da je alergijska reakcija na lipu rasprostranjena u ljudskoj populaciji na Evropskom kontinentu. Takođe, pokazali smo da postoji ukrštena reaktivnost između lipe i poznatih alergena vrsta kao što su breza i maslina, i da karakter te reaktivnosti zavisi od geografskog područja i lokalnog klimata. Treba naglasiti da je dalja analiza glavnih alergena lipe preko potrebna kako bi se unapredila klinička dijagnostika i tretman alergičnih pacijenata. Na kraju, naši rezultati ukazuju da polen lipe treba uključiti u standardnu kliničku paletu polena koji se koriste u alergo-testovima.

## 5.2. Imunoproteomska karakterizacija alergena ambrozije (*Ambrosia artemisiifolia*) kod pasa

Alergijski odgovor na polene drveća i trava mogu da se proučavaju i na model sistemima životinja. Takve studije ne samo da mogu da pospeše tretman alergičnih životinja, već mogu da posluže i kao osnova za upoređenje alergijskih odgovora čoveka i domaćih životinja. U ovom delu studije analizirali smo alergijski odgovor domaćeg psa na ambroziju i uporedili ga sa alergijom na ambroziju kod čoveka. Takođe smo predstavili glavne alergene ambrozije na koje reaguju specifična IgE antitela iz seruma pasa sa AD, a koji su identifikovani metodama 2D PAGE, imunoblota i nano-tečne hromatografije spojene sa masenim spektrometrom.

Procenjuje se da 10-15% domaćih pasa pati od atopičnog dermatitisa i taj broj je u stalnom porastu (Hillier & Griffin, 2001; DW Scott, Miller, & Griffin, 2001). Glavni uzrok ovog oboljenja jeste alergija na polen i grinje, a posebno alergija na polen ambrozije. Isto tako, polen ambrozije je glavni sezonski izvor alergogenih proteina u SAD i procenjuje se da je alergija čoveka na polen ambrozije prisutna kod 50% atopičnih pacijenata (Boulet, Turcotte, Laprise, Lavertu, Bedard, Lavoie, et al., 1997; Wopfner, et al., 2009). U Evropi, broj slučajeva alergije na ambroziju je u porastu, a to se posebno odnosi na region Panonske ravnice na Balkanskom poluostrvu (Janjic & Vrbnicanin, 2007). U skladu sa ovim zapažanjima, čak dve trećine atopičnih pasa u Srbiji je pokazalo pozitivnu reakciju u IDK testu na polen ambrozije (Milcic-Matic, Ognjenovic, Burazer, Blagojevic, Popovic, & Stanic-Vucinic, 2013). Dakle, karakterizacija sastojaka polena *A. artemisiifolia* sa ciljem definisanja glavnih i sporednih alergena koji su odgovorni za izazivanje kliničkih manifestacija alergijske reakcije kod pasa je, pored ostalih razloga, potrebna kako bi se unapredili i dijagnostičke i terapijske metode.

U ekstraktu polena ambrozije do sada je detektovano 52 antigena. Od tog broja, najmanje 22 antigena klasifikovana su kao alergeni na osnovu reaktivnosti sa IgE čoveka i na osnovu sposobnosti da izazovu hipersenzitivnu reakciju I tipa. Nekoliko studija je pokazalo je da je glavni alergen ambrozije Amb a 1 grupa alergena (Lowenstein & Marsh, 1983). Ova grupa sadrži nekoliko kiselih jednonančanih proteinskih izoformi koje imaju molekulsku masu od 38 kDa (King, Alagon, Kochoumian, Kuan, Sobotka, & Lichtenstein, 1981). Prirodni protein biva



proteolizovan na dva lanca koja su označena kao  $\alpha$ - i  $\beta$ -fragment (King, Norman, & Tao, 1974);  $\alpha$ -lanac, koji je molekulske težine od 26 kDa, nekovalentnim se interakcijama vezuje za manji,  $\beta$ -lanac čija je molekulska težina 12 kDa (King, Alagon, Kochoumian, Kuan, Sobotka, & Lichtenstein, 1981; King, Norman, & Tao, 1974; Wopfner, et al., 2009).

Glavno pitanje ovog dela našeg rada je: koji su to alergeni polena ambrozije na koje psi sa AD reaguju? U ovoj studiji mi smo dali odgovor na ovo pitanje tako što smo 2-D imunoblot tehnikama analizirali koje proteine polena ambrozije združeni serumi alergičnih pasa i serumi alergičnih ljudi prepoznaju kao imunoreaktivne. Pošto su alergeni ambrozije detaljno obrađeni u ljudskoj populaciji, rezultati tih istraživanja su poslužili kao dobra okosnica. Posebnost naše studije ogleda se u činjenici da smo analizirali domaće pse koji pate od AD u toku sezone polinacije ambrozije i koji su pritom bili pozitivni u kožnom testu. U našoj studiji, 14 od 16 (88%) pasa sa pozitivnim IDK testom su pokazali da sadrže specifičan IgE in vivo. Međutim, poznato je da čak i zdravi psi sadrže povišen nivo IgE na alergene iz životne okoline kao što su grinje (Nuttall, Hill, Bensignor, Willemse, & members of the International Task Force on Canine Atopic, 2006). Zbog toga, u sledećoj studiji valjalo bi obraditi i slučajeve psećeg AD-a koji nisu pokazali pozitivnu reakciju u kožnom testu u vreme polinacije ambrozije. Takva studija bi doprinela boljem razumevanju patogeneze ovog oboljenja.

Treba napomenuti da je metodološki izuzetno teško detektovati IgE antitela koja su specifična na određeni allergen u serumu psa. Međutim, mi smo još ranije optimizovali uslove za detekciju ovih antitela imunoblotom uz korišćenje hromogenog supstrata, streptavidina i želatina koji je korišćen kao blokirajući/stabilizirajući agens umesto proteina mleka (Milcic-Matic, Ognjenovic, Burazer, Blagojevic, Popovic, & Stanic-Vucinic, 2013). Dalje, nespecifično vezivanje IgE je svedeno na najmanju moguću meru izvođenjem Western blota pod neredukujućim uslovima, i korišćenjem većih razblaženja anti-psećeg IgE i alkalne fosfataze spojene streptavidinom (streptavidin-AP). Razlog za korišćenje rezultata generisanih u neredukujućim uslovima je posledica visokog nivoa nespecifičnog vezivanja IgE u redukujućim uslovima. Naime, nakon SDS-PAGE elektroforeze u redukujućim uslovima, potpuno razvijeni proteini se prenose na membranu na kojoj, pak, mogu delimično da se uviju. Međutim, proteini se ne uviju u nativnu formu zbog nemogućnosti formiranja disulfidnih mostova. Stoga, redukujuća SDS-PAGE verovatno uklanja efikasno konformacione epitope, ali ostavlja

linearne epitope netaknute za interakciju sa IgE antitelima (Lombardero, Heymann, Platts-Mills, Fox, & Chapman, 1990; Nuttall, Hill, Bensignor, Willemse, & members of the International Task Force on Canine Atopic, 2006). Ovo je izuzetno važno, jer u slučaju kad IgE psa prevashodno vezuju konformacione epitope, intaktni linearni epitopi predstavljaju idealna mesta za nespecifično vezivanje IgE. Pošto su konformacioni epitopi manje-više uklonjeni redukcionim sredstvima, postaje jasno kako pod ovim uslovima nije moguće detektovati specifična IgE antitela. Pored toga, psi imaju povišeni nivo IgE u serumu ( $1-41 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) što je 100 puta više od nivoa IgE u serumu čoveka (Ledin, et al., 2006). Ovaj visoki nivo IgE je posledica prisustva mnoštva crevnih parazita kojima čovek nije izložen u toj meri (Meeusen, 1999) i on kod pasa ostaje povišen čak i nakon regularnog tretmana anti-parazitskim lekovima (Pullola, Vierimaa, Saari, Virtala, Nikander, & Sukura, 2006). Pošto praktično nema razlike u nivou ukupnog IgE kod atopičnih i zdravih pasa, za očekivati je da je veoma mali deo antitela specifičnih za određeni alergen prisutno u serumu. Taj mali udeo specifičnih IgE je dovoljan da izazove imunsku reakciju, ali nije dovoljan da značajno promeni nivo ukupnog IgE u serumu (DeBoer, 2004). Potrebno je naglasiti da postoje studije koje se bave imunološkom karakterizacijom glavnih alergena u atopičnom dermatitisu, ali se te studije bave alergenima u japanskom kedru i grinjama (Masuda, Tsujimoto, Fujiwara, Kurata, Hasegawa, Taniguchi, et al., 2000; Masuda, Tsujimoto, Fujiwara, Kurata, Hasegawa, Yasueda, et al., 1999; Nuttall, Hill, Bensignor, Willemse, & members of the International Task Force on Canine Atopic, 2006; Sakaguchi, Inouye, Taniai, Ando, Usui, & Matuhasi, 1990; Yasueda, Yui, Shimizu, & Shida, 1983). Po našim saznanjima, ovo je prva studija koja se bavi karakterizacijom alergena iz kratke ambrozije koji izazivaju AD kod domaćih pasa.

Naši rezultati ukazuju na tri proteina iz polena ambrozije koji jako interaguju sa IgE iz seruma psa: (i) protein molekulske težine 38 kDa (nalazi se u 81% seruma), (ii) protein molekulske težine od 45 kDa (u 38% seruma) i (iii) protein od 27-30 kDa (u 13% seruma). Prvi protein je najverovatnije glavni alergen ambrozije koji izaziva alergijske reakcije kod čoveka, Amb a 1, koji je i najprisutniji alergen u ovom polenu I koji čini skoro 6% od ukupnog proteinskog sadržaja (King, Norman, & Connell, 1964; Rafnar, Griffith, Kuo, Bond, Rogers, & Klapper, 1991). Preostala dva IgE-vezujuća proteina predstavljaju manje važne alergene. Na osnovu molekulske težine i izgleda trake na SDS-PAGE, pretpostavljali smo da bi treći protein mogao biti nedavno identifikovani alergen Amb a 4 (Leonard, Wopfner, Pabst, Stadlmann, Petersen, Duus,

et al., 2010) ili da bi u pitanju mogao biti  $\alpha$  fragment (26 kDa) izoforme Amb a 1 koji nastaje proteolizom alergena tokom pripremanja polenskog ekstrakta (King, Norman, & Tao, 1974; Wopfner, et al., 2009). Potvrda i konačno utvrđivanje identiteta ovog proteina dobijena je analizom peptida tandem-masenom spektrometrijom.

Naš cilj je bio da identifikujemo glavni, najprisutniji, alergogeni protein u polenskom ekstraktu i da našu analizu usmerimo ka glavnim imunoreaktivnim proteinima koji su reagovali sa IgE antitelima psa. Upotrebom imunoproteomičkih metoda, mi smo identifikovali dve izoforme Amb a 1 (dužine 396 i 398 amino kiselina) koje se razlikuju za samo jednu amino kiselinu. Na osnovu sekvence (*Slika 4.10.*) i molekularnih težina tačaka na 2-D gelu (*Slika 4.9.*), mi smo identifikovali  $\alpha$  i  $\beta$  fragmente Amb a 1 alergenske grupe što je u skladu sa prethodno objavljenim studijama (King, Norman, & Tao, 1974). Svi izoalergeni identifikovani su sa visokim stepenom sigurnosti uprkos visokom nivou sličnosti amino-kiselinske sekvence (1-29% različitost), izuzetno približnim molekularnim težinama i pI vrednostima (svi se nalaze u opsegu pH od 4,5-6). Takođe, ovo je prva studija koja je potvrdila, metodom masene spektrometrije, postojanje izoformi Amb a 1 na proteinskom nivou, a čije postojanje je ranije predloženo na osnovu analize mRNA transkripata. Uspeh našeg pristupa leži svakako i u činjenici da smo uspeli da dobijemo veliki broj peptida za analizu masenim spektrometrom (*Slika 4.10.*). Slično alergičnim ljudima, atopični psi takođe reaguju pre svega na glavni alergen ambrozije. Naime, naši rezultati pokazuju da psi reaguju na svih pet izoalergena Amb a 1 grupe alergena (poznat pod imenom: antigen E), uključiv i Amb a 1.05 izoalergen (od ranije poznat pod imenom Amb a 2 grupa ili antigen K). Protein mase od 27-30 kDa je  $\alpha$  fragment varijante polenskog alergena Amb a 1.0201 (*Tabela 4.3.*). Poznato je da rekombinantni Amb 1  $\alpha$  fragment ima hipoalergenska svojstva, da vezuje IgE smanjenim afinitetom, ali da zadržava sposobnost indukovanja reaktivnosti T-ćelija kod atopičnih pacijenata čoveka (Wopfner, et al., 2009). Nije jasno da li je smanjeni afinitet prema IgE uzrok niskom nivou prepoznavanja od strane seruma izolovanih iz atopičnih pasa (2/16) i ovaj aspekt studije zaslužuje više pažnje u budućnosti. Pored  $\alpha$  fragmenta, pridruženi serumi čoveka reaguju i na  $\beta$  fragment Amb a 1 i Amb a 8. Ovo nije iznenađujuće obzirom da  $\beta$  fragment sadrži većinu epitopa prirodnog Amb a 1 za koje se vezuju IgE antitela. Nasuprot tome, spojeni serumi pasa nisu pokazali reaktivnost ka proteinima ekstrakta ambrozije male molekulske težine uključiv i spomenuti Amb a 1  $\beta$  fragment. Na prvi pogled ovo izaziva pažnju pošto je

predloženo da  $\beta$  fragment vezuje IgE čoveka istim afinitetom kao i intaktni protein, pa je za očekivati da i IgE psa vezuje i fragment i celi alergen sličnim afinitetima. Međutim, na osnovu naših rezultata mi predlažemo da alergen-specifična IgE antitela psa prepoznaju pre svega protein veće molekulske težine i da su selektivni ka konformacionim epitopima. U prilog ovoj tvrdnji ide i studija iz 2001. godine (Nuttall, Hill, Bensignor, Willemse, & members of the International Task Force on Canine Atopic, 2006) koja je pokazala da psi reaguju na alergene iz familije *Dermatophagoides* koji su velike molekulske mase, a da praktično ne reaguju na alergene malih molekulskih masa grupe 1 i 2. Na kraju treba naglasiti da je potrebna je detaljna analiza imunoreaktivne trake mase 45 kDa. Od velike je važnosti da se odrede i karakterišu i glavni i sporedni alergeni kod domaćeg psa zato što se IDK test može raditi samo sa određenim alergenom ili grupom alergena. Karakterizacija alergena će, dakle, nesumnjivo poboljšati specifičnost i osetljivost dijagnostičkog intradermalnog testa.

U zaključku, ovaj deo naše studije je, po prvi put, okarakterisao i definisao imunoproteomskim metodama glavne alergene iz kratke ambrozije koji izazivaju AD kod domaćeg psa. Specifična proteinska traka molekulske mase 38 kDa, koju je prepoznalo 13 od 16 seruma iz atopičnih pasa, predstavlja glavnu alergensku grupu iz kratke ambrozije koja izaziva pseći AD. Ova traka, kao i kod čoveka, predstavlja svih pet izoalergena Amb a 1 grupe (pektin lijaza): Amb a 1.0101 i njegov prirodni varijetet E1XUL2; Amb a 1.0202; Amb a 1.0304; Amb a 1.0402; i prirodni varijetet alergena Amb a 1.0501, EXUM0. Pored toga, naši rezultati pokazuju da i  $\alpha$  fragment polenskog alergena Amb a 1.0201 igra važnu ulogu u razviću psećeg AD. Potrebno je još i naglasiti da je naša studija ukazala i na raličke između psa i čoveka. Naime, združeni serumski psa nisu reagovali na alergene male molekulske mase kao što su  $\beta$  fragment Amb a 1 i varijeteti Amb a 8 (profilini) za koje je poznato da su potentni alergeni kod čoveka.

### **5.3. Modulacija imunskog odgovora polifenolima zelenog čaja**

Interakcija prirodnih polifenola sa proteinima je opšte prihvaćena činjenica i smatra se da ove interakcije utiču na različite biološke procese. One su takođe, od

posebnog značaja za alergene, jer direktno vezivanje katehina za alergene proteine može da im promeni strukturu i da tako utiče na imuni odgovor.

Detaljno smo analizirali interakcije između glavnog katehina iz zelenog čaja, EGCG, i jednog od glavnih alergena hrane, ovalbumina (OVA), metodama fluorescencije, CD spektrometrije, kalorimetrije i *in silico* simulacijama protein-ligand interakcija. Pored toga, uloga EGCG/OVA interakcija u biološkim procesima je analizirana (i) testom inhibicije vezivanja IgE iz seruma pacijenata alergičnih na jaja, (ii) merenjem uticaja kompleksa na nivo aktivacije bazofila i (iii) merenjem nivoa reapsorpcije alergena od strane sveže izolovanih CD14<sup>+</sup> monocita. Naši rezultati pokazuju novi molekularni mehanizam delovanja EGCG koji utiče na alergijski potencijal OVA.

Interakcije jakog afiniteta i nespecifična adsorpcija polifenola za proteine su od značaja u složenim sistemima ishrane. Pošto je fiziološka koncentracija EGCG vrlo niska, za očekivati je da će visoko-afinitetna interakcija između EGCG i globularnih proteina hrane biti od naročitog značaja za biološke procese. Upravo smo ovaj tip interakcije ispitivali metodom “gašenja” fluorofore (Xiao, Mao, Yang, Zhao, Zhang, & Yamamoto, 2011). Tim pristupom smo izmerili da je konstanta vezivanja ( $K_a$ ) EGCG za OVA u nivou  $10^4 \text{ M}^{-1}$ , što je u nivou izmerenog afiniteta vezivanja EGCG za proteine mleka i purinskih alkaloida za OVA (I Hasni, Bourassa, Hamdani, Samson, Carpentier, & al., 2011; Kanakis, Hasni, Bourassa, Tarantilis, Polissiou, & Tajmir-Riahi, 2011). Međutim, važno je napomenuti da naša kalorimetrijska merenja pokazuju da EGCG, pored jakog i specifičnog vezivanja, gotovo sigurno uspostavlja nespecifične interakcije sa površinom OVA (Slika 4.11.C). Ovaj rezultat podržava hipotezu da je površinska adsorpcija polifenola odgovorna za agregiranje i taloženje proteina (Dobrev, Frazier, Mueller-Harvey, Clifton, Gea, & Green, 2011).

Naše *in silico* simulacije predviđaju postojanje visoko-afinitetnog EGCG-vezivnog mesta na površini OVA, koje je verovatno okupirano pri niskim koncentracijama EGCG. Ovo vezivno mesto se nalazi pored Trp160 koji je okrenut ka rastvoru i koji se nalazi u blizini heliksa F (hF). Heliks F je najdinamičniji deo serpinske strukture okrenut ka rastvoru i često se koristi kao proba za praćenje konformacionih promena kod serpina. Dakle, vezivanje EGCG pored Trp160 objašnjava “gašenje” fluorescentnog signala i promene u CD spektrima OVA po dodatku EGCG. Konačno, predviđeno EGCG-vezivno mesto se samo delimično preklapa sa IgE-vezivnim mestom

na OVA, što je, pak, u saglasju sa našim rezultatima da EGCG ne inhibira direktnu interakciju između IgE i OVA. Značajno je napomenuti da naše *in silico* simulacije pokazuju da se i kofein, fiziološki aktivni alkaloid, vezuje pre svega za isto mesto na OVA za koje se vezuje EGCG. Ova karakteristika hidrofilnog “džepa” u OVA da vezuje fiziološki aktivne supstance nije primećena ranije i upućuje na novu ulogu OVA u vezivanju, zaštiti i transportu hidrofilnih supstanci složenih sistema hrane do mesta njihovog fiziološkog delovanja. Takođe, važno je napomenuti da molekulske simulacije i ITC merenja predviđaju nekoliko vezivnih mesta niskog afiniteta koja bi mogla da budu od značaja pri višim fiziološkim koncentracijama EGCG. Jedno od najzanimljivijih nisko-afinitetnih vezivnih mesta je pored Asn298 što je jedino mesto N-glikozilacije u OVA (Sheares & Robbins, 1986).

Promene u CD spektrima i u sadržaju sekundarnih struktura u OVA predlažu da vezivanje EGCG za OVA izaziva suptilne promene u strukturi alergena. Naša merenja pokazuju da segment od ~20 amino kiselina menja konformaciju iz neuređene petlje u  $\beta$ -strukturu. Analiza kristalne strukture OVA je pokazala da postoje tri petlje koje mogu da promene svoju konformaciju nakon vezivanja EGCG za OVA: (1) N-terminalni deo hB, (2) petlja koja spaja hD i s2A, i (3) petlja između hE i s1A. Uređenje petlje između hD i s2A je vrlo moguće pošto je slična promena strukture već primećena u serpinu crmA. U tom slučaju, petlja hD-s2A je promenila konformaciju u  $\beta$ -strukturu koja je nazvana s1'A (Simonovic, Gettins, & Volz, 2000). Dakle, svakako je moguće da vezivanje EGCG za OVA ne utiče samo na globalnu strukturu proteina, već i na strukturu i konformaciju epitopa za vezivanje IgE.

Međutim, kod većine alergena hrane, uključujući i OVA, linearni epitopi su važniji za vezivanje IgE od konformacionih epitope (Honma, Kohno, Saito, Shimojo, Horiuchi, Hayashi, et al., 1996; Johnsen & Elsayed, 1990; Kahlert, Petersen, Becker, & Schlaak, 1992; Stanic-Vucinic, Stojadinovic, Atanaskovic-Markovic, Ognjenovic, Gronlund, van Hage, et al., 2012). Naši rezultati takođe predviđaju da su IgE-vezivni epitopi otporni na konformacione promene u OVA koje su izazvane EGCG vezivanjem. Zaista, *in vitro* i *ex vivo* merenja nivoa vezivanja IgE upućuju da su vezivna mesta za EGCG i IgE na površini OVA potpuno različita. Ovo je u saglasju sa ranije objavljenom studijom koja je pokazala da se glavni epitopi za vezivanje IgE na površini OVA nalaze na N- (region 1; amino kiseline 24-33 i 56-182) i C-terminusu (region 2; amino kiseline 307-391), dok se najsnažniji epitop nalazi pored petlje reaktivnog centra (RCL; amino

kiseline 364-372). Vezivno mesto na OVA za EGCG je različito od sva tri epitopa i samo delimično se preklapa sa regionom 1 IgE-vezivnog mesta. Dakle, nije iznenađujuće da EGCG ne utiče na direktnu interakciju između IgE i OVA.

Zbog činjenice da se vezivna mesta za EGCG i IgE na OVA ne preklapaju, mi zaključujemo da je uticaj EGCG na interakcije između OVA i IgE od malog značaja za razumevanje mehanizma alergije na proteine hrane. Od mnogo veće važnosti je uticaj EGCG na razne ćelijske procese kao što su signalne kaskade, ekspresija receptora i regulacija imunskog sistema. Na primer, interakcija EGCG sa membranskim strukturama ("lipid rafts") može da utiče na endocitozu, koja je, pak, značajna za transdukciju signala, reapsorpciju antigena, ukrštnu prezentaciju, praćenje imunih procesa i održavanje ćelijske homeostaze.

Reapsorpcija antigena od strane antigen-prezentujućih ćelija je obično posredovana različitim endocitotskim procesima koji uvećavaju efikasnost "hvatanja" struktura i molekula stranih organizmu. Zanimljivo, OVA se često koristi kao model sistem za izučavanje endocitoze i pinocitoze koje su posredovane manoznim receptorom na površini "nezrelih" dendritskih ćelija (DĆ) (Kindberg, Magnusson, Berg, & Smedsrod, 1990). Za razliku od toga, sveži monociti "hvataju" OVA preko endocitoze posredovane tečnom fazom i ne koriste receptore (Hilmenyuk, Bellinghausen, Heydenreich, Ilchmann, Toda, Grabbe, et al., 2010). Monociti igraju važnu ulogu u inicijaciji i razvoju imunskog odgovora, kao i određivanju sudbine imunskog odgovora. Pod odgovarajućim uslovima, monociti se razvijaju u izuzetno potentne antigen-prezentujuće DĆ koje imaju efikasne makropinocitozne mehanizme i koje su efikasne u procesovanju antigena.

U vezi sa ovim, pokazano je da EGCG može efikasno da inhibira endocitozu FITC-dekstrana od strane "nezrelih" DĆ, ali da ne može da spreči endocitozu od strane "nezrelih" DC tretiranih LPS-om (Yoneyama, et al., 2008). Dalje, EGCG možda igra ulogu u regulaciji rane faze makropinocitoze, poznatije kao "ruffling" ("talasanje"). Naime, EGCG inhibira protein kinazu C i fosfolipazu A2 (Moraru, Laky, Stanescu, Buzila, & Popescu, 1990). Poznato je da je protein kinaza C bitna za endocitozu u neutrofilima, dok proizvodi enzimske aktivnosti fosfatidil-3-kinaze i fosfolipaze A2 modulišu polimerizaciju aktina koja je važna za "ruffling". EGCG takođe inhibira internalizaciju kaveola u endotelijskim ćelijama verovatno kroz direktno vezivanje sa lipidima membrane i mikrostrukturama membrana ("lipid rafts"). Konačno, EGCG se vezuje visokim afinitetom za laminin receptor koji igra važnu ulogu u remodeliranju

aktina kroz supresiju fosforilacije regulatornog lakog lanca miozina II (Fujimura, Umeda, Kiyohara, Sunada, Yamada, & Tachibana, 2006).

Zaključno, naši rezultati daju podršku hipotezi da direktno vezivanje EGCG za antigene hrane igra važnu ulogu u biološkim funkcijama EGCG. Inhibicija reapsorpcije OVA/EGCG kompleksa od strane antigen-prezentujućih ćelija gotovo sigurno utiče na transport i prezentaciju antigena, kao i na modulaciju imunskog odgovora. Na osnovu naših i rezultata drugih istraživačkih grupa, mi predlažemo da glavni proteini hrane služe kao specifični prenosiooci biološki aktivnih i potentnih polifenola do ciljnih ćelija i membranskih receptora gde polifenoli ostvaruju svoju fiziološku ulogu.

Pored uloge i uticaja na nivou strukture alergena, polifenoli takođe mogu da učestvuju u modulaciji alergijskog odgovora na ćelijskom nivou, tj. na nivou specifičnih signalnih kaskada koje su aktivirane od strane definisanih citokina. U ovom delu studije smo upravo analizirali ulogu katehina zelenog čaja i glavne komponente, EGCG-a, u prenošenju signala posredovanih citokinom IL-4, koji igra važnu ulogu u alergijskom odgovoru.

Tačna doza polifenola zelenog čaja koja ima blagotvorno dejstvo na zdravlje čoveka nije poznata i predstavlja predmet rasprave u naučnim krugovima. Uprkos tome, opšte je prihvaćena činjenica da katehini zelenog čaja, a posebno EGCG, imaju jako antiinflamatorno, antialergijsko i imunosupresivno dejstvo *in vitro* i *in vivo* (Braicu, Pilecki, Balacescu, Irimie, & Neagoe, 2011; R. Singh, Akhtar, & Haqqi, 2010; J. Wang, Pae, Meydani, & Wu, 2012; Wong, Nguyen, Noh, Bray, Bruno, & Ho, 2011). EGCG je glavni sastojak ekstrakta zelenog čaja i on predstavlja do 45% od ukupnog polifenolnog sadržaja. Fiziološka koncentracija EGCG je od 0.1 do 0.6  $\mu\text{M}$ , a oralna doza od 1600 mg EGCG-a pod uslovima posta rezultira maksimalnim nivoom EGCG-a u plazmi čoveka od 3.4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (ili oko 7,4  $\mu\text{M}$ ) (Ullmann, Haller, Decourt, Girault, Girault, Richard-Caudron, et al., 2003). EGCG je glavna komponenta zelenog čaja sa najjačim dejstvom, ali treba reći da ostali katehini mogu ili da pojačaju korisne efekte EGCG-a (S. Y. Wu, Silverberg, Joks, Durkin, & Smith-Norowitz, 2012) ili da podstiču već utvrđene štetne efekte nekontrolisane upotrebe dijetalnih dodataka na bazi zelenog čaja (Schontal, 2011).

U ovom delu studije, mi smo se usredsredili na izučavanje efekata glavnih polifenola zelenog čaja, katehina, na IL-4/IL-4R signalnu kaskadu. Analizirali smo uticaj širokog spektra koncentracija katehina, od fizioloških do onih koje se dostižu nakon unošenja suplemenata koji sadrže koncentrat katehina zelenog čaja.



Da bismo utvrdili efekat katehina i EGCG-a na IL-4/IL-4R signalnu kaskadu, merili smo nivo fosforilacije STAT6 molekula u PBMC ćelijama koji su stimulisne IL-4, u prisustvu i odsustvu katehina/EGCG-a. U poređenju sa kontrolnim ćelijama koje su bile izložene uticaju samo IL-4, fosforilacija STAT6 je bila inhibirana i u prisustvu visokih koncentracija katehina i samog EGCG-a.

Nekoliko inhibitornih mehanizama na nivou IL-4/IL-4R sprega mogu da doprinesu opisanom efektu katehina na nivo fosforilacije STAT6. Već je opisan efekat EGCGa na fosforilaciju STAT molekula koje su posredovane različitim citokinima: STAT 5 kao odgovor na citokine IL-2, IL-7 i IL-15 (Hillier & Griffin, 2001), STAT3 kao odgovor na IL-6 (Lin, Hou, Chen, Kao, Yu, Funayama, et al., 2012) i STAT1 kao odgovor na INF- $\gamma$  (Cheng, Shieh, Lin, Chen, Lin, Kuo, et al., 2010), te je verovatno inhibicija IL-4/IL-4R signalnog puta posledica direktnog uticaja katehina i EGCGa na nivo fosforilacije STAT6.

IL-4 aktivira nekoliko puteva transdukcije signala u imunim ćelijama, sa tim da STAT6 predstavlja najvažniji molekul za biološke funkcije IL-4. Ovaj značaj je pojačan činjenicom da nekoliko lekova koji se koriste za lečenje i prevenciju alergijskih oboljenja upravo napada aktivnost STAT6. Inhibicija signalne sprege IL-4/IL-4R od strane EGCG može se dovesti u vezu sa odranije poznatim procesima u kojima EGCG i srodna jedinjenja utiču na aktivnost IL-4: inhibicija sazrevanja dendritskih ćelija koja je posredovana IL-4, smanjenje nivoa formiranja IgE u PBMC i U266 ćelijama i pojačanje inhibitornog efekta INF- $\gamma$  na sekreciju eotaksin-3 iz alveolarnih epitelijalnih ćelija, a koja je posredovana IL-4.

U zaključku, naši i rezultati drugih istraživačkih grupa ukazuju da glavni polifenoli zelenog čaja utiču na IL-4/IL-4R signalnu spregu i aktivaciju STAT6, proteina u različitim ćelijskim tipovima. Na taj način, polifenoli inhibiraju nekoliko značajnih funkcija IL-4 citokina u inicijaciji i održavanju alergijskog odgovora, kao što su promena klase i produkcija IgE u B ćelijama, diferencijacija Th2 ćelija, i ekspresija MHC II molekula na površini B ćelija.

## 6. Zaključak

Na osnovu rezultata ove doktorske disertacije možemo da izvedemo sledeće zaključke:

- Po prvi put je pokazano da je polen lipa je bitan izvor alergena u četiri geografski i klimatski različite populacije pacijenata Evrope.
- Utvrđeno je da postoji određeni stepen ukrštene reaktivnosti između polena lipa i ranije utvrđenih izvora alergena polena breze i masline.
- Potvrđeno je da populacija kućnih pasa pati od alergije na ambroziju, koja je uzročnik atopičnog dermatitisa kod ovih životinja i savremenim imunoproteomičkim metodama smo odredili i opisali glavne alergene polena ambrozije, uzročnike atopičnog dermatitisa kod pasa, uporedivši taj alergijski odgovor sa alergijom na ambroziju kod čoveka.
- Detaljno je proučen uticaj katehina zelenog čaja na strukturu jednog od glavnog alergena hrane, ovalbumina i pokazali smo da interakcije katehina zelenog čaja i ovalbumina dovode do modulacije imunskog odgovora na ćelijskom nivou.
- Pratili smo uticaj katehina zelenog čaja na signalni put pod uticajem citokina IL-4, koji je glavni citokin alergijskog odgovora, i na osnovu dobijenih rezultata predložen je mehanizam modulacije ovog signalnog puta.

## 7. Eksperimentalni deo

### 7.1. Konfokalna mikroskopija polena

Polen lipe (*Tilia tomentosa*) i ambrozije (*Ambrosia artemisiifolia*) korišćeni u ovom radu, nabavljeni su od Instituta za imunologiju, vakcine i serume - Torlak (Beograd), gde je proveren njihov kvalitet i ispravnost. Polen lipe je pomešan sa čistim glicerolom, nanet na predmetno staklo, poklopljen predmetnim stakalcem i nakon sušenja posmatran pod konfokalnim mikroskopom. Autofluorescencija polena posmatrana je na uveličanju 40x sa konfokalnim laser-skenirajućim mikroskopom FluoView FV-1200 (Olympus, Japan) istovremeno koristeći plavi, zeleni i crveni filter.

### 7.2. Priprema ekstrakta polena

Za ekstrakciju proteina iz polena lipe korišćen je 20 mM fosfatni puffer pH 7.4 u odnosu 1:10 u odnosu na masu polena. Ekstrakcija je obavljena na +4°C preko noći uz konstantno mešanje. Nakon toga ekstrakt je centrifugiran 30 minuta na 3000 x g. Uzorak je zatim stavljen u celulozno crevo za dijalizu (MWCO 3000 Da, Spectropor), dijalizovan naspram odgovarajuće zapremine 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pufera pH 8.0, uz mešanje i tri izmene pufera u toku 24 h. Zatim je određena koncentracija proteina u uzorku Bradford-ovom metodom. Uzorak je izdvojen u alikvote od po 500 µg proteina i zatim koncentrovan liofilizovanjem.

### 7.3. Određivanje koncentracije proteina - Metoda po Bradfordu

Jedna od najčešće korišćenih metoda za određivanje koncentracije proteina je Bradford-ova metoda (Bradford, 1976). Ovaj metod je zasnovan na merenju pomeranja maksimuma apsorpcije boje Comassie Brilliant Blue sa 470 nm na 595 nm u zavisnosti od toga da li je boja slobodna u rastvoru ili vezana za protein. Metoda je brza, jeftina, specifična za proteine (ne vezuje slobodne aminokiseline i kratke peptidne fragmente) i vrlo osetljiva. Mane ove metode su u tome što standardna prava nije linearna u širem opsegu koncentracija, a odgovor na različite proteine varira.

Postupak rada:

Test je rađen u mikrotitar pločicama (F tip), a apsorbancija je očitavana ELISA čitačem (LKB Micro plate reader 5060-006), upotrebom filtera talasne dužine od 595 nm. Boja je rastvorena u etanolu uz mešanje na magnetnoj mešalici, zatim su dodate kiselina i voda do potrebne zapremine. Pre upotrebe, boja je razblažena pet puta vodom i filtrirana. U 200  $\mu$ L rastvora boje odmereno je 5  $\mu$ L uzorka za makro test, odnosno 20  $\mu$ L uzorka za mikro test. Apsorbancija je očitavana nakon 5 minuta.

Rastvor boje:

CBB G-250	250 mg
95% etanol	50 mL
fosforna kiselina, 96%	100 mL
destilovana voda do	200 mL

Za konstruisanje kalibracione prave korišćen je rastvor goveđeg serum albumina (*Bovine Serum Albumin*, BSA) koncentracije 1,0 mg/mL, razblažen vodom do finalnih koncentracija od 0,75 mg/mL, 0,50 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,10 mg/mL. Za mikro metode, rastvor koncentracije 0,1 mg/mL razblaži se vodom do finalnih koncentracija 0,075 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,025 mg/mL i 0,010 mg/mL.

Vrednosti za koncentraciju proteina su izračunate iz jednačine prave:

Apsorbancija = f(koncentracija proteina (mg/ml)), dobijene metodom linearne regresione analize.

## 7.4. Elektroforetske tehnike

### 7.4.1 Natrijum dodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Elektroforetska razdvajanja proteina su rađena na Hoeffler SCI aparaturi po instrukcijama proizvođača. SDS-PAGE je rađena po originalnoj Laemmli-jevoj proceduri (Laemmli, 1970).

Rastvori:

A: monomerni rastvor akrilamida (30%)

akrilamid	58.4 g
bisakrilamid	1.6 g
destilovana voda do	200 mL

B: Puffer za razdvajajući gel (1.5 M Tris HCl, pH 8.8)

Tris	36.3 g
destilovana voda do	200 mL

\*pH se podešava dodatkom 4M HCl

C: Puffer za koncentrujući gel (0.5 M Tris HCl, pH 6.8)

Tris	6.0 g
destilovana voda do	100 mL

\*pH se podešava dodatkom 4M HCl

D: 10 % rastvor SDS-a

SDS	10 g
destilovana voda do	10 mL

E: 10 % rastvor APS-a

APS	0.1 g
destilovana voda do	1.0 mL

\*poželjno je rastvor inicijatora polimerizacije napraviti pre upotrebe

F: Puffer za nadslojavanje gela pri polimerizaciji

-n-butanol zasićen vodom

G: Pufer za elektroforezu (0.25 M Tris, 0.192 Gly, 0.1% SDS, pH 8.3)

Tris	3.0 g
Gly	14.4 g
SDS	1.0 g
destilovana voda do	1000 mL

H: Pufer za pripremu uzorka (5x koncentrovan)

reagens	zapremina (mL)	finalna koncentracija
0,5 M Tris, pH 6,8	1.2	60 mM
98 % glicerol	5.0	25 %
10 % SDS	2.0	2 %
2-merkaptetanol*	0.5	14.4 mM
1 % bromfenol plavo	1.0	0.1 %
destilovana voda do	10.0	

\*Rastvor H za neredukujuću elektroforezu ne sadrži 2-merkaptetanol, tako da se u ovom koraku dodaje destilovana voda.

I: Rastvor boje za PAA gelove (0.1 % CBB, 50 % metanol, 10 % sirćetna kiselina)

CBB G ili R 250	0.5 g
metanol	100 mL
sirćetna kiselina	10 mL
destilovana voda do	200 mL

J: Rastvor za fiksiranje (50 % metanol, 10 % sirćetna kiselina)

metanol	500 mL
sirćetna kiselina	100 mL
destilovana voda do	1000 mL

K: Rastvor za obezbojavanje (25 % metanol, 5 % sirćetna kiselina)

metanol	250 mL
sirćetna kiselina	50 mL
destilovana voda do	1000 mL

## Pripremanje PAA gelova različite koncentracije

-10 ml gela za razdvajanje

*Tabela 7.1 Priprema poliakrilamidnog gela za razdvajanje*

finalna koncentracija akrilamida u gelu (%)				
rastvor	8	10	12	14
A (mL)	2.67	3.33	4.00	4.67
B (mL)	2.50	2.50	2.50	2.50
H <sub>2</sub> O (mL)	4.67	4.00	3.33	2.67
TEMED (μL)	5	5	5	5
D (mL)	0.10	0.10	0.10	0.10
E (mL)	0.05	0.05	0.05	0.05

- 4 % gel za koncentrovanje

*Tabela 7.2 Priprema poliakrilamidnog gela za koncentrovanje*

finalna zapremina gela za koncentrovanje (mL)	
rastvor	4
A (ml)	0.53
C (ml)	1.00
H <sub>2</sub> O(ml)	2.40
TEMED(μL)	2
D (μl)	40
E (μl)	20

### Postupak:

Gel za razdvajanje napravljen je prema Tabeli 7.1. i iz njega uklonjen vazduh. Nakon deaeracije dodati su rastvori SDS-a i APS-a. Deaerisani rastvor je naliven između staklenih ploča (10x8 cm) i nadslojen rastvorom n-butanola. Nakon polimerizacije, površina gela je isprana vodom i nalivena rastvorom gela za razdvajanje koji je pripremljen prema Tabeli 7.2. U gel je potom uronjen češalj. Ploče se nakon polimerizacije gela za koncentrovanje i nalivanja uzoraka u bunare urone u kadu sa puferom (rastvor G).

Uzorci su pripremljeni zagrevanjem na 95°C u periodu od 5 minuta u rastvoru H vodeći računa o razblaženju (5x). Nakon zagrevanja, uzorci su centrifugirani i nakon hlađenja do sobne temperature nanešeni u bunare.

Elektroforeza je rađena na konstantnoj struji od 25 mA (dok BFP ne stigne na oko 0.5 cm od donje ivice gela). Nakon završetka elektroforeze, ploče su pažljivo razdvojene i gel je prebačen u odgovarajuću posudu. Nakon brzog ispiranja vodom, gel je tretiran na sledeći način:

Fiksiranje (rastvor J)	15 min
Bojenje (rastvor I)	15 min
Obezbojavanje 1 (rastvor J)	30 min
Obezbojavanje 2 (rastvor K)	do potpunog obezbojavanja

#### 7.4.2.1. Izoelektrično fokusiranje (IEF)

PAA gel sa inkorporiranim amfolitima je naliven između ploča dimenzija 8 x 13 cm, debljine 0.75 mm i ostavljen da polimerizuje. Elektrode su potom natopljene u katodnom i anodnom rastvoru, višak rastvora je pokupljen papirnom vatom i pažljivo su nanešene na krajeve gela, pritom vodeći računa da su postavljene paralelno. Uzorci su nanešeni nakon predfokusiranja gela u periodu od 30 min na 800 V. Elektroforeza je trajala 1 h i 45 min pri uslovima: maksimalna jačina struje 50 mA, maksimalni napon 2000 V i maksimalna snaga 10 W. Nakon završetka elektroforeze, gel je pažljivo sklonjen sa staklene ploče, ispran vodom i fiksiran. Po završetku fiksiranja gel je ostavljen preko noći u 200 mL 1% TCA i zatim sutradan obojen rastvorom za bojenje PAA gelova.

30% akrilamid	3.75 mL
Amfoliti širokog opsega	1.25 mL
voda	9.9 mL
TEMED	10 mL
APS	100 mL



Katodni rastvor (150 mM NaOH)

NaOH	0.6 g
vode	100 mL
dezaeracija	15 min

Anodni rastvor (75 mM sumporna kiselina)

sumporne kiseline	0.42 mL
destilovana voda	100 mL

Rastvor za fiksiranje ( 30 % TCA)

TCA	60 g
destilovana voda do	200 mL
vreme	1 h

#### 7.4.2.2. Izoelektrično fokusiranje visoke rezolucije na IPGphore trakama

Za visoko-rezolutivno razdvajanje proteina prema pI vrednost ima korišćene su imobilinske IPG trake pH opsega od 3 do 10, 13 cm.

Imobilinske trake su rehidratirane preko noći rehidratacionim puferom sa rastvorenim uzorkom. Uzorci su pripremljeni tako što je 950  $\mu$ L pufera pomešano sa 50  $\mu$ L sveže mapravljenog rastvora 1 M DTT-a. U liofilizovani ekstrakt polena lipe (250  $\mu$ g proteina po uzorku) dodato je 250  $\mu$ L rehidratacionog pufera sa DTT-jem

Rehidratacioni pufer:

Reagens	Količina	finalna koncentracija
Urea	12 g	8 M
Triton X-100	0.5 g	2%
IPG pufer (istog opseg kao IPG traka)	125 $\mu$ L	0.5%
1% BFP štok rastvor	50 $\mu$ L	0.002%
destilovana voda do	25 mL	

Nakon prekonodne rehidracije proteini su razdvajani prema pI vrednostima korišćenjem sledećeg protokola:

<b>Korak</b>	<b>Voltaža</b>	<b>Vreme</b>	<b>kVh</b>
<b>1</b> Step and Hold	500	1:00	0.5
<b>2</b> Gradient	1000	1:00	0.8
<b>3</b> Gradient	8000	2:30	11.3
<b>4</b> Step and Hold	8000	0:30	4.4
<b>5</b> Ukupno		5:00	17.0

Posle završenog izoelektrofokuseranja trake su ekvilibrisane potapanjem 15 min u ekvilibracioni pufer sa DTT-om, a zatim 15 min u ekvilibracionom puferu sa dodatim jodacetamidom.

SDS ekvilibracioni pufer:

Reagens	količina	finalna koncentracija
Urea	72.1 g	6 M
Tris-HCl, pH 8.8	10.0 mL	75 mM
Glicerol (87% w/w)	69 mL	29.3%
SDS	4.0 g	2%
1% BFP štok rastvor	400 µL	0.002%
destilovana voda do	200 mL	

SDS ekvilibracioni pufer sa DTT-om:

DTT	100 mg
SDS ekvilibracioni pufer	10 ml

SDS ekvilibracioni pufer sa jodacetamidom:

Jodacetamid	250 mg
SDS ekvilibracioni pufer	10 ml

### 7.4.3 Dvodimenzionalna poliakrilamid gel elektroforeza (2D PAGE)

U prvoj dimenziji proteini su razdvajani prema pI vrednosti (IEF), a u drugoj dimenziji prema njihovoj molekularnoj masi (redukujuća SDS-PAGE). Nakon završenog IEF, traka gela koja sadrži razdvojene proteine kratko je inkubirana u redukujućem puferu za ekvilibraciju i zatim pažljivo prenešena na površinu gela u bunar odgovarajućih dimenzija (dimenzija se bira prema dužini trake). Nakon 40 min inkubacije u puferu, elektroforeza je rađena prema opisanoj proceduri za SDS-PAGE.

Pufer za ekvilibraciju (redukujući):

$\beta$ -merkapt etanol	0.5 mL
0.5M TRIS pH 6.8	1.25 mL
glicerol	1 mL
10% SDS	2.3 mL
BFP	do pune plave boje
destilovana voda do	5 mL

### 7.5. Digestija proteina u gelu i analiza peptida masenom spektrometrijom

Nakon razdajanja proteina polena ambrozije 2D elektroforezom, prvo prema pI vrednosti, a zatim i molekularnoj masi, gel je obojen CBB bojom. Tačke od interesa su isecane iz gela, obezbojene i digestovane preko noći tripsinom iz goveđeg pankreasa po protokolu (Shevchenko, Tomas, Havlis, Olsen, & Mann, 2006).

- Isecane tačke sa 2D gela su ispirane sa 100  $\mu$ L 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  puferom, 60 min uz mešanje na 600 rpm
- Nakon inkubacije sledi centrifugiranje 5 min, 13400 rpm i ispiranje 45 min. sa 100  $\mu$ L 50%  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /50% acetonitril smešom
- Posle centrifugiranja uklonjen je supernatant i dalje je tretman nastavljen na 57°C, u mraku, dodatkom 100  $\mu$ L 10 mM DTT rastvorenog u  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  puferu.
- Centrifugiranjem je uklonjen supernatant i dodato je 100  $\mu$ L acetonitrila. Uzorak je inkubiran 6 min sa mućkanjem na vorteksu, nakon čega je centrifugiran.

- Uklonjeni supernatant je zamenjen sa 100  $\mu\text{L}$  50 mM IAA u  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  puferu i uzorak je inkubiran 45 min u mraku.
- Nakon inkubacije uzorak je centrifugiran, supernatan uklonjen, a zatim se kreće u seriju ispiranja. Prvo se doda 100  $\mu\text{L}$  25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  i uzorak se inkubira pola sata.
- Sledi centrifugiranje i odlivanje supernatanta i dodatak 100  $\mu\text{L}$  50%  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /50% acetonitrila. Ponovo inkubacija traje 30 min na sobnoj temperaturi, bez mešanja.
- Nakon toga sledi centrifugiranje, odlivanje supernatanta i dodatak 100  $\mu\text{L}$  100% acetonitrila.
- Odliti supernatan i dodati 10  $\mu\text{L}$  15 ng  $\text{mL}^{-1}$  tripsina MS-stepena čistoće, rastvorenog u 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  puferu. Inkubirati uzorak preko noći na 37°C.
- Reakcija se zaustavlja dodatkom 1  $\mu\text{L}$  1% mravlje kiseline. Uzorak se potom vorteksira, centrifugira i odvojeni supernatan je spreman za analizu peptida u njemu.

Nakon tripsinske digestije, peptidino mapiranje je rađeno na Easy nano-Liquid Chromatography II masenom spektrometru povezanim sa linearnim jono-vezujućim i kvadrupolnim filterom masa (LTQ Orbitrap XL, Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). Razdvajanje peptida je rađeno pomoću EASYPrecolumn C18-A1 kolone, pri čemu je rastvarač A bila 0.1% mravlja kiselina u vodi, a rastvarač B 0.1% mravlja kiselina u 98% acetonitrilu. Primenjen je linearni gradijent od 5 – 95% rastvarača B (70 min) sa protokom od 300  $\text{nL min}^{-1}$ . Injekciona zapremina uzorka bila je 2  $\mu\text{L}$ . Voltaža spreja podešena je na 1.8 kV, kapilarna voltaža na 6V i temperatura na 250°C. Podaci su prikupljeni pomoću Xcalibur 2.1 programa, dok je analiza rađena u programu Proteom Discoverer 1.3.0339. Pretraga je ograničena na UniProtKB/Swiss-Prot bazu koristeći SEQUEST algoritam. Zadati parametri bili su: dve nekontrolisane tripsinske digestije (“missed cleavages”) po peptidu, peptidna tolerancija je podešena na 10 ppm, a MS/MS na 0.5 Da. Pretraga je sužena time što su rezultati filtrirani tako da je minimum podešen na 2 peptida od visoke uverljivosti po proteinu.

## 7.6. Elektrotransfer proteina sa PAA gela na nitroceluloznu ili PVDF membranu

Za potrebe detekcije proteina u imunoblotu upotrebom specifičnih antitela, neki uzorci su posle razdvajanja elektroforezom (SDS PAGE) prenešeni sa PAA gela na nitroceluloznu membranu. Pufer za polu-suvi transfer:

TRIS	2,900 g
Glicin	1,450 g
SDS	0,185 g
metanol	100 mL
destilovana voda do	500 mL

Polu-suvi (eng. semi-dry) transfer proteina na nitroceluloznu membranu nakon SDS-PAGE rađen je pod dejstvom električne struje jačine  $1 \text{ mA/cm}^2$  gela u sendviču od 3 sloja kvantitativnog filter papira odgovarajućih dimenzija. Nitroceluloza je postavljena prema pozitivnoj elektrodi. Polu-suvi uslovi podrazumevaju da sendvič mora dobro da bude oceden od pufera za blot. Elektrotransfer traje 1 h.

Vizualizacija proteina na membrani rađena je petominutnim bojenjem u 0.2% rastvoru Ponceau-S u 5% sirćetnoj kiselini uz naknadno ispiranje viška boje destilovanom vodom.

## 7.7. Detekcija proteina u imunoblotu

### 7.7.1 Opšti protokol

Potrebni puferi:

1. Fiziološki rastvor puferisan Trisom (TBS): 30 mM Tris, pH 7,6 150 mM NaCl

TRIS	3.63 g
NaCl	9 g
destilovana voda	1L

2. tTBS: 0,1% Tween 20 u TBS

3. Rastvor za blokiranje: 5% odmašćeno mleko u tTBS

4. Rastvor za razblaživanje antitela: 0.1% rastvor odmašćenog mleka u tTBS

5. Pufer za AP: 100 mM TRIS, pH 9,6, 50 mM MgCl<sub>2</sub>

TRIS	1,21 g
MgCl <sub>2</sub> x5H <sub>2</sub> O	10 mg
destilovana voda	100 mL

\* pH podesiti 3M NaOH.

Priprema supstrata

Supstrat 1		Supstrat 2	
BCIP	50 mg	NBT	100 mg
pufer za AP	20 mL	pufer za AP	300 mL

Smeša supstrata je pripremana neposredno pred upotrebu. Pomešana je jedna zapremina supstrata 1 sa 9 zapremina supstrata 2 i nakon toga procedena. Proizvod ima plavo-ljubičastu boju.

Protokol:

- Obezbojavanje NC membrane u tTBS, 10 min
- Blokiranje membrane u 5% odmašćenom mleku (u tTBS-u), 1 h na ST uz mešanje.
- Ispiranje, tTBS 3 x 10 min.
- Inkubiranje sa prethodno optimizovanom količinom primarnog antitela, 2-4 h na ST uz mešanje.
- Ispiranje, tTBS 3 x 10 min.
- Inkubiranje sa sekundarnim antitelom, 1 h na ST uz mešanje.
- Ispiranje, tTBS 3 x 10 min.
- Inkubiranje sa tercijarnim antitelom obeleženim alkalnom fosfatazom, 1h na ST uz mešanje
- Ispiranje, tTBS 3 x 10 min.
- Ispiranje, TBS 1 x 10 min
- Detekcija: BCIP/NBT (precipitirajući supstrat alkalne fosfataze)

### 7.7.2 Detekcija alergena korišćenjem seruma pacijenata

Nakon elektrotransfera, immunoblot je razvijan prema opštem protokolu uz upotrebu sledećih antitela:

Primarna antitela: Serum pacijenata alergičnih na lipu/ambroziju (4h na ST uz mešanje, razblaženje 1: 10, v:v u tTBS puferu sa 0.5% odmašćenim mlekom)

Sekundarna antitela: kozija anti-humana IgE antitela (Sigma-Aldrich) (2 h na ST uz mešanje, razblaženje 1: 5 000, v:v u tTBS puferu sa 0.5% odmašćenim mlekom)

Tercijarna antitela: mišja anti-kozija IgG antitela obeležena alkalnom fosfatazom (Sigma-Aldrich) (1h na ST uz mešanje, razblaženje 1: 30 000, v:v, u tTBS puferu sa 0.1% odmašćenim mlekom).

## 7.8. ELISA testovi

ELISA testovi su modifikacija metode po Voller-u (Barlow, Thompson, Cuckle, Wald, & Voller, 1986; Ebruster, 1959).

### 7.8.1. Indirektni ELISA test

ELISA testovi rađeni su po modifikovanoj Voller-ovoj metodi. ELISA testovi rađeni su na mikrotitar pločama sa ravnim dnom za detekciju IgE (''MaxiSorb''). Svi postupci su izvođeni na 37 °C bez mešanja.

1. Kuplovanje antigena za mikrotitar pločicu: Antigen koncentracije 5 µg/ml u 50 mM karbonatno-bikarbonatnom puferu pH 9,6 je naliven u bunare (po 50 µl) i ostavljen tokom noći na sobnoj temperaturi.

Pufer za kuplovanje:

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.159 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,293 g
Destilovana voda do	100 mL

\* pH se podesi na 9,6

2. Ispiranje: Nevezani antigen je ispran 3 puta po 10 min sa TTBS (300 µL).

3. Blokiranje: Bunari mikrotitar pločice su inkubirani tokom 1 h sa 1 % BSA u TTBS radi blokiranja antigenom neokupiranih mesta u bunarima.

4. Vezivanje primarnog antitela: Primarno antitelo može biti IgG ili IgE iz seruma alergičnih pacijenta, ili IgG iz seruma zeca imunizovanog na dati antigen. Za dobijanje saturacione prave vezivanja IgG ili IgE, humani serum je nanešen u dvostrukim razblaženjima po 50  $\mu$ L. Svaka proba je rađena u tri ponovka. Serum nealergičnih osoba, tj. preimuni zečiji serum je korišćen kao negativna kontrola. Primarno antitelo razblaženo je sa 0.1 % BSA u TTBS. Pločica je inkubirana tokom 2 h za IgG, tj. 3.5 - 4 h za IgE.

5. Ispiranje: Ispiranje nevezanog primarnog antitela rađeno je 3 puta po 10 min sa TTBS (300  $\mu$ L).

6. Vezivanje sekundarnog antitela: Sekundarno antitelo je anti humani IgG ili IgE ili anti zečiji IgG sa vezanom alkalnom fosfatazom (Sigma). Sekundarno antitelo je razblaženo po uputstvu proizvođača u 0.1 % BSA u TTBS. Nakon nanošenja u bunare (50  $\mu$ L), pločica je inkubirana tokom 2 h.

7. Ispiranje: Nevezano sekundarno antitelo isprano je 2 puta po 10 min sa TTBS (300  $\mu$ L) i jednom sa TBS (300  $\mu$ L) tokom 10 min kako bi se uklonio deterdžent.

8. Vizuelizacija: Bunari su inkubirani sa supstratom (50  $\mu$ L) za alkalnu fosfatazu koji daje rastvoran proizvod do razvijanja žute boje. Rastvor 0.1 % p-nitrofenil fosfata (pNPP) u DEAE puferu pripremljen je neposredno pred upotrebu. Apsorbanca razvijene boje merena je 405nm u ELISA čitaču. U suprotnom, reakcija se može zaustaviti dodatkom 50  $\mu$ L 3 M NaOH.

DEAE pufer za alkalnu fosfatazu:

dietanolamin	2,10 g
Na Cl	1,17 g
100 mM MgCl <sub>2</sub>	10 mL
Destilovana voda do	200 mL

\* pH podesiti na 9,5

### 7.8.2. Inhibitorna ELISA

Sve faze izvođenja ELISA inhibicije, kao i svi rastvori koji su korišćeni bili su isti kao kod indirektna ELISA osim koraka vezivanja primarnog antitela.



1. Humani serum je razblažen u 0.1 % BSA u TTBS na 80-90% platoa u prethodno određenoj saturacionoj krivoj.
2. Ovaj serum je zatim inkubiran tokom 30 min na sobnoj temperaturi sa standardnim razblaženjima inhibitora koji je testiran.
3. Nakon toga humani serum je nanešen u mikrotitar pločicu i test je dalje rađen po proceduri za indirektan ELISA test. Kao kontrola (bez inhibitora) korišćen je razblaženi humani serum inkubiran u puferu u kom je rastvoren inhibitor. Za negativnu kontrolu se umesto seruma primarnog antitela (u koraku vezivanja) dodaje 0.1 % BSA u TTBS.
4. IC50 vrednost inhibitora predstavlja onu koncentraciju inhibitora koja je potrebna da bi se postigao nivo od 50 % inhibicije u odnosu na kontrolu. Metodom linearne regresione analize na linearnom delu prave (% inhibicije = f(log konc. Inhib.)) određena je koncentracija inhibitora kojom se postiže 50 % inhibicije (A50%) u odnosu na kontrolu (Ac).

% inhibicije =  $((Ac - Ai) / Ac) \times 100$  gde je

Ac – srednja vrednost dobijena za apsorbancu kontrolnog uzorka (humani serum bez inhibitora)

Ai – srednja vrednost apsorbance dobijene za određenu koncentraciju ispitivanog inhibitora.

## 7.9. Kožne probe

Kožne probe su rađene na dobrovoljcima sa prethodnom kliničkom istorijom alergije na polen lipe i ambrozije. Pacijentima je dezinfikovana koža unutrašnjeg dela podlaktice i zatim nanesena kap različitih ekstrakata polena: lipe, breze i masline koncentracije od  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  (u rastvoru PBS pufer/glicerol, 1:2 v:v). Kao pozitivna kontrola nanešena je kap histamin-fosfata ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ), a kao negativna kap fiziološkog rastvora (0.9% rastvor NaCl). Nakon toga, koža na mestu nanošenja je blago probodena lancetom i posle 20 minuta izmeren je prečnik nastalog otoka. Pozitivnom reakcijom smatra se pojava otoka čiji je prečnik za više od 3 mm veći od onog koji nastaje na mestu nanošenja negativne kontrole (Ebruster, 1959).

## 7.10. Funkcionalni *in vitro* testovi

Svi funkcionalni *in vitro* testovi rađeni su na FACSCalibur protočnom citometru (Becton Dickinson Biosciences, USA) uz odgovarajući potrošni materijal istog proizvođača.

### 7.10.1. Test aktivacije bazofila

Za test aktivacije bazofila su korišćeni alikvoti od 100  $\mu$ L heparinizirane pune krvi pacijenta sa prethodnom kliničkom historijom alergije. Uzorak krvi je stimulisan serijskim razblaženjem koncentracija ekstrakta polena lipe rasponu od 0.0001 do 100  $\mu$ g  $\text{mL}^{-1}$ . Nestimulisane ćelije i ćelije stimulisane sa anti-humanim IgE su služile kao negativna, tj. pozitivna kontrola. Uzorci su inkubirani 20 min na 37°C. Nakon toga 5  $\mu$ L FITC-konjugovanih anti CD63 i 5  $\mu$ L fikoerittrin-konjugovanih anti-CD203c antitela (Immunotech, Marseille, France) je dodato u svaki uzorak i uzorci su zatim inkubirani 20 min na 37°C. Nakon lize eritrocita i centrifugiranja (400 g, 5 min) merenja su rađena na protočnom citometru (FACS Calibur, BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

### 7.10.2. Test proliferacije limfocita

Za postavljanje primarne kulture limfocita korišćena je sterilno vađena heparinizirana puna krv alergičnog pacijenta koja nije stara duže od 6 h od vađenja. Kompletan postupak zasejavanja ćelija vršen je u sterilnim uslovima. Limfociti izolovani prema protokolu (Bøyum, A. 1968) i koncentracije  $1,05 \times 10^6$  ćelija  $\text{mL}^{-1}$ , razliveni su u FACS epruvete po 190  $\mu$ L suspenzije ćelija i po 10  $\mu$ L rastvora alergena (finalno 10  $\mu$ g  $\text{mL}^{-1}$ ). U epruvetu sa negativnom kontrolom umesto alergena je dodato 10  $\mu$ L kompletnog medijuma, a u pozitivne kontrole po 10  $\mu$ L PHA (finalno 25  $\mu$ g  $\text{mL}^{-1}$ ) tj. TTD (finalno 6,25  $\mu$ g  $\text{mL}^{-1}$ ). Ćelije su zatim ostavljene da rastu na 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5 %  $\text{CO}_2$ . Proliferativni odgovor ćelija na PHA (fitohemaglutinin koji je jak mitogen) meren je nakon 72h, a na TTD i alergene nakon sedam dana. Takođe, supernatant je čuvan za svaki uzorak koji je dalje korišćen u testu određivanja citokina.

Nakon proliferacije, ćelije su staložene centrifugiranjem na 400 xg tokom 10 min na 4°C. Po 100  $\mu$ L supernatanta sterilno je odvojeno za određivanje količine citokina i odmah ostavljeno na -80°C, jer su citokini jako nestabilni proteini. U ostatak

(proliferisanih ćelija) dodat je 1  $\mu\text{L}$  anti-humanog CD3 antitela obeleženog sa FITS i 1  $\mu\text{L}$  anti-humanog CD4 antitela obeleženog sa PE. Tube su zatim kratko promešane na vortexu (2-3 sekunde) i inkubirane tokom 30 min na  $4^\circ\text{C}$  u mraku. Nevezana antitela su isprana dodatkom 1 mL PBS. Nakon centrifugiranja (400 xg tokom 10 min na  $4^\circ\text{C}$ ) supernatant je pažljivo aspiriran (ostavljajući oko 100  $\mu\text{L}$  na dnu epruvete), a ćelije su resuspendovane u 400  $\mu\text{L}$  PBS-a. Analiza je dalje rađena na protočnom citometru.

### 7.11. Cirkularni dihiroizam (CD)

Uzorci ovalbumina su dijalizovani preko noći naspram 10 mM natrijum fosfatnog pufera, pH 6.5. Korišćena je koncentracija ovalbumina od  $1\text{ mg mL}^{-1}$ , a zatim je dodavan EGCG u molarnim odnosima 1:1 i 1:10. CD spektri su zabeleženi na J-815 spektrometru (Jasco Corporation, Tokyo, Japan).

CD spektri u dalekom ultravioletnom spektru su obuhvatali spektralnu oblast od 185-250 nm i načinjeni su u kiveti širine 0.001 cm i na  $25^\circ\text{C}$ . Podaci su prikupljeni u intervalu od 0.1 nm, pri brzini od 100 nm po minutu i sa osetljivošću od  $\pm 200$  mdeg. Za merenja u bliskom delu ultravioletnog spektra (260-320 nm) korišćena je kiveta širine 0.1 cm.

Svi spektri su mereni sa četiri akumulacije, nakon čega je od spektra uzorka oduziman referentni spektar pufera (10 mM natrijum fosfatni pufer, pH 6.5) (Stanic-Vucinic, et al., 2012). Grafici su predstavljeni u jedinicama srednje vrednosti eliptičnosti po aminokiselinskom ostatku ( $\text{deg cm}^2\text{ dmol}^{-1}\text{ residue}^{-1}$ ).

### 7.12. Spektrofluorimetrija

Fluorescentni spektri su snimani na FluoroMax-4 spektrofluorimetru (Horiba Scientific, Kyoto, Japan). Eksperimenti su rađeni na  $22^\circ\text{C}$  u kvarcnim kivetama od 3.5 mL, 20 mM fosfatnom puferu pH 7.2. Proteinski rastvor ( $25\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ) je titrovan sa 11 x 1  $\mu\text{L}$  i 4 x 1.25  $\mu\text{L}$  EGCG rastvora ( $2.5\text{ mg mL}^{-1}$ ) pri pH 7.2. Nakon dodatka svakog alikvota sniman je fluorescentni spektar sa ekscitacijom na 280 nm i emisijom u intervalu od 290-500 nm. Između svakog merenja kiveta je ispirana tri puta destilovanom vodom, a slepa proba je pravljena za svaku koncentraciju polifenola. Spektar slepe probe je oduziman od emisionog spektra odgovarajućeg rastvora. Svi

eksperimenti su rađeni u tri ponovka i srednje vrednosti su korišćene za izračunavanje parametara vezivanja. Spektri su dalje analizirani pomoću programa OriginPro8 (Northampton, MA, USA). Fluorescentni spektri su analizirani pomoću Štern-Volmerove jednačine (Lakowicz, Gryczynski, Gryczynski, & Dattelbaum, 1999).

“Gašenje” fluorescence je opisano Štern-Volmerovom jednačinom:

$$F_0/F=1+K_{sv}*[Q]$$

gde su  $F_0$  i  $F$  intenziteti fluorescence pre i nakon dodatka “kvenčera”,  $K_{sv}$  – Štern-Volmerova konstanta gašenja, a  $[Q]$  koncentracija “kvenčera”.

Deo fluorofore koja je dostupna rastvaraču ( $f_a$ ) može se izračunati prema modifikovanog Štern-Volmarovoj jednačini:

$$F_0/(F_0-F)=(1+1/K_{sv}*[Q])*1/f_a.$$

Srednja vrednost tri merenja je korišćena za računanje vezujućih parametara.

### **7.13. Izotermalna titraciona kalorimetrija (ITC)**

Svi ITC eksperimenti su urađeni na MicroCal iTC200 (GE Lifesciences, USA). Rastvor ovalbumina (30  $\mu$ M) stavljen je u 1.4 mL ćeliju za uzorke na kalorimetru i rastvor EGCG-a (370  $\mu$ M) je nanešen u injekcioni špric. EGCG je injektovan u ćeliju sa OVA u sekvenci od 20 injekcija od po 10  $\mu$ L. Vreme ostavljeno za ekvibraciju između dva dodavanja je bilo 60 sekundi. Sadržaj u ćeliji sa uzorkom je tokom eksperimenta mešan na 100 rpm. Sirovi podaci su dobijeni kao grafik toplote, izražene u  $\mu$ J naspram broja injekcije, a zatim je obrađen da se dobije grafik promene entalpije po molu injektanta ( $\Delta H_{obs}$ ,  $\text{kJ mol}^{-1}$ ) naspram molarnog odnosa. Kontrolni eksperimenti su uključivali titrovanje pufera EGCG-om. Korigovani rezultati su dobijeni kada su od eksperimentalnih oduzete vrednosti dobijene titrovanjem samog pufera. Podaci dobijeni na ITC-u analizirani su pomoću MicroCal ITC programa.

### **7.14. *In silico* simulacija vezivanja katehina za ovalbumin**

#### **7.14.1. Priprema proteinske strukture**

Svi ostaci vode i atomi liganda su uklonjeni iz structure pre analize. Kiselost svake aminokiseline koja je podložna titrovanju procenjeno je korišćenjem H++ programa (Anandakrishnan, Aguilar, & Onufriev, 2012). Da bi se uklonili mogući sterni

sudari između aminokiselinskih bočnih ostataka, struktura ovalbumina je optimizovana u CHARMM programu (verzija c35b1).

#### **7.14.2. Priprema strukture liganda**

Struktura je optimizovana pomoću kvantnog hemijskog MP2 metoda korišćenjem standardnog 6-31G\*\* seta u Gaussian03 programskom paketu (Frisch, Trucks, Schlegel, Scuseria, & al., 2004).

#### **7.14.3. Studija “ukotvljavanja”**

Optimizovane strukture proteina i liganda dodatno su pripremljene za analizu u AutoDockTools programu. Svi proteinski ostaci postavljeni su da budu rigidni, a sve veze liganda rotacione. Ukupno 420 pokušaja je učinjeno u cilju pokrivanja cele površine proteina. Ova simulacija ukotvljavanja je odrađena uz pomoć AutoDock Vina programa (Trott & Olson, 2010).

### **7.15. Preuzimanje proteina od strane monocita**

Monojedarne ćelije periferne krvi su izolovane iz venske krvi 3 zdrava donora pomoću gradijenta gustine Ficoll-a (Histopaque, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Nemačka). Monociti su izolovani iz PBMC imunomagnetnim sortiranjem ćelija prema uputstvima proizvođača (MACS; MiltenyiBiotec, Bergish-Gladbach, Nemačka) sa čistoćom preko 95% CD14+ ćelija. Da bismo ispitali preuzimanje proteina, FITCom obeleženi ovalbumin (1.1  $\mu\text{M}$ ) bez ili sa dodatkom EGCG-a (1.1  $\mu\text{M}$ , 11  $\mu\text{M}$ )  $50 \times 10^5$  sveže izolovanih monocita je razblaženo u 200  $\mu\text{L}$  medijuma za kultivisanje ćelija (RPMI 1640 medijum sa 10% fetalnog telećeg seruma i antibioticima 0.1% gentamicin, 100  $\text{U mL}^{-1}$  penicilina i 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  streptomicina). Preuzimanje je praćeno na 0, 0.5, 1 i 3 sata na 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5%  $\text{CO}_2$ . Srednja vrednost intenziteta fluorescence FITC-pozitivnih monocita merena je na protočnom citometru (FACS Calibur, BD Biosciences, SAD). Kao kontrola, monociti su inkubirani sa FITC-om obeleženim ovalbuminom (1.1  $\mu\text{M}$ ) u svim vremenskim intervalima na 4°C. Za analizu podataka korišćen je GraphPad program.

## **7.16. Priprema i karakterizacija katehina zelenog čaja**

Suplementi zelenog čaja (Pharmanova, Obrenovac, Srbija) kupljeni su u lokalnoj prodavnici i pripremljeni prema ranije opisanom protokolu (Tagliazucchi, Verzelloni, & Conte, 2005).

### **7.16.1. Priprema ukupnih fenolnih jedinjenja iz suplemenata zelenog čaja**

Na 0.8 g suplemenata zelenog čaja dodato je 20 mL 70% etanola i smesa je ostavljena 60 min u vodenom kupatilu na 75°C, uz mešanje. Fenolni ekstrakt je prikupljen nakon centrifugiranja 15 min na 3500 rpm.

### **7.16.2. Određivanje ukupne koncentracije katehina zelenog čaja**

Određivanje ukupne koncentracije katehina zelenog čaja rađeno je spektrofotometrijski i korišćenjem Folin-Ciocalteu-vog reagensa. Rezultat je izražen preko mg ekvivalenata galne kiseline po mL ekstrakta zelenog čaja. Fenolni sastav je određen pomoću tačno masenog spektrometra i utvrđeno je da su najprisutniji katehini EGCG, EGC i ECG.

Esej je izvođen u mikrotitar pločicama (F tip), a apsorbancija je očitavana ELISA čitačem UNISKAN II, uz odgovarajući filter.

- U 0.1 ml razblaženog uzorka dodati 0,9 ml vode i 0.1 ml Folin-Ciocalteu-ovog reagensa.
- Posle 5 min dodati 1.4 ml 5 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i ostaviti reakcionu smešu da stoji 90 min na sobnoj temperaturi.
- Naspram slepe probe meriti A<sub>750</sub>. Za konstruisanje kalibracione krive koristiti standardni rastvore galne kiseline u vodi u opsegu 50-500 µg mL<sup>-1</sup>. Vrednosti za koncentraciju ukupnih fenola izračunavati iz jednačine prave: A<sub>750</sub> = f (mg mL<sup>-1</sup> ekvivalenata galne kiseline), dobijene metodom linearne regresione analize na vrednostima za standardne rastvore galne kiseline.

### **7.17. Primarna kultura monojedarnih ćelija periferne krvi (PBMC)**

PBMC ćelije su uzgajane u RPMI1640 medijumu sa 10% fetalnog telećeg seruma i dodatim antibioticima: 0.1% gentamicin, 100 U mL<sup>-1</sup> penicilina i 100 µg mL<sup>-1</sup> streptomicina.

## 8. Reference

- Anandakrishnan, R., Aguilar, B., & Onufriev, A. V. (2012). H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. *Nucleic Acids Res*, 40(Web Server issue), W537-541.
- Antunes, J., Borrego, L., Romeira, A., & Pinto, P. (2009). Skin prick tests and allergy diagnosis. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 37(3), 155-164.
- Asero, R., Wopfner, N., Gruber, P., Gadermaier, G., & Ferreira, F. (2006). Artemisia and Ambrosia hypersensitivity: co-sensitization or co-recognition? *Clin Exp Allergy*, 36(5), 658-665.
- Bagarozzi, D. A., Jr., Potempa, J., & Travis, J. (1998). Purification and characterization of an arginine-specific peptidase from ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) pollen. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 18(3), 363-369.
- Barlow, R. D., Thompson, S. G., Cuckle, H. S., Wald, N. J., & Voller, A. (1986). Comparison of an ELISA with a RIA method for serum alpha-fetoprotein determination in screening for fetal neural tube defects. *Ann Clin Biochem*, 23 (Pt 3), 334-339.
- Boulet, L. P., Turcotte, H., Laprise, C., Lavertu, C., Bedard, P. M., Lavoie, A., & Hebert, J. (1997). Comparative degree and type of sensitization to common indoor and outdoor allergens in subjects with allergic rhinitis and/or asthma. *Clin Exp Allergy*, 27(1), 52-59.
- Bousquet, J., Lockey, R., Malling, H. J., Alvarez-Cuesta, E., Canonica, G. W., Chapman, M. D., Creticos, P. J., Dayer, J. M., Durham, S. R., Demoly, P., Goldstein, R. J., Ishikawa, T., Ito, K., Kraft, D., Lambert, P. H., Lowenstein, H., Muller, U., Norman, P. S., Reisman, R. E., Valenta, R., Valovirta, E., & Yssel, H. (1998). Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. World Health Organization. American academy of Allergy, Asthma and Immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 81(5 Pt 1), 401-405.
- Bøyum, A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. (Paper IV) *Scand J Clin Lab Invest* 21(97) 77-89.



- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Braicu, C., Pilecki, V., Balacescu, O., Irimie, A., & Neagoe, I. B. (2011). The relationships between biological activities and structure of flavan-3-ols. *Int J Mol Sci*, 12(12), 9342-9353.
- Burbach, G. J., Heinzerling, L. M., Rohnelt, C., Bergmann, K. C., Behrendt, H., Zuberbier, T., & study, G. (2009). Ragweed sensitization in Europe - GA(2)LEN study suggests increasing prevalence. *Allergy*, 64(4), 664-665.
- Butt, M. S., & Sultan, M. T. (2009). Green tea: nature's defense against malignancies. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 49(5), 463-473.
- Caruana, M., Hogen, T., Levin, J., Hillmer, A., Giese, A., & Vassallo, N. (2011). Inhibition and disaggregation of alpha-synuclein oligomers by natural polyphenolic compounds. *FEBS Lett*, 585(8), 1113-1120.
- Chapman, M. D. (2008). Allergen nomenclature. *Clin Allergy Immunol*, 21, 47-58.
- Cheng, C. W., Shieh, P. C., Lin, Y. C., Chen, Y. J., Lin, Y. H., Kuo, D. H., Liu, J. Y., Kao, J. Y., Kao, M. C., & Way, T. D. (2010). Indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunomodulatory protein, is suppressed by (-)-epigallocatechin-3-gallate via blocking of gamma-interferon-induced JAK-PKC-delta-STAT1 signaling in human oral cancer cells. *J Agric Food Chem*, 58(2), 887-894.
- Cunze, S., Leiblein, M., & Tackenberg, O. (2013). Range expansion of *Ambrosia artemisiifolia* in Europe is promoted by climate change. *ISRN Ecology*, 9.
- D'Amato, G., Cecchi, L., Bonini, S., Nunes, C., Annesi-Maesano, I., Behrendt, H., Liccardi, G., Popov, T., & van Cauwenberge, P. (2007). Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy*, 62(9), 976-990.
- D'Amato, G., & Liccardi, G. (1994). Pollen-related allergy in the European Mediterranean area. *Clin Exp Allergy*, 24(3), 210-219.
- Danesi, F., Philpott, M., Huebner, C., Bordoni, A., & Ferguson, L. R. (2010). Food-derived bioactives as potential regulators of the IL-12/IL-23 pathway implicated in inflammatory bowel diseases. *Mutat Res*, 690(1-2), 139-144.
- DeBoer, D. J. (2004). Canine atopic dermatitis: new targets, new therapies. *J Nutr*, 134(8 Suppl), 2056S-2061S.

- Dobрева, M. A., Frazier, R. A., Mueller-Harvey, I., Clifton, L. A., Gea, A., & Green, R. J. (2011). Binding of pentagalloyl glucose to two globular proteins occurs via multiple surface sites. *Biomacromolecules*, *12*(3), 710-715.
- Durham, S. R., Walker, S. M., Varga, E. M., Jacobson, M. R., O'Brien, F., Noble, W., Till, S. J., Hamid, Q. A., & Nouri-Aria, K. T. (1999). Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N Engl J Med*, *341*(7), 468-475.
- Ebruster, H. (1959). The prick test, a recent cutaneous test for the diagnosis of allergic disorders. *Wien Klin Wochenschr*, *71*, 551-554.
- Edlund, A. F., Swanson, R., & Preuss, D. (2004). Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. *Plant Cell*, *16 Suppl*, S84-97.
- Favrot, C., Linek, M., Mueller, R., Zini, E., & International Task Force on Canine Atopic, D. (2010). Development of a questionnaire to assess the impact of atopic dermatitis on health-related quality of life of affected dogs and their owners. *Vet Dermatol*, *21*(1), 63-69.
- Frisch, M., Trucks, G., Schlegel, H., Scuseria, G., & al., e. (2004). Gaussian 03. In Revision C.02. ed.). Wallingford CT: Gaussian Inc.
- Fujimura, Y., Umeda, D., Kiyohara, Y., Sunada, Y., Yamada, K., & Tachibana, H. (2006). The involvement of the 67 kDa laminin receptor-mediated modulation of cytoskeleton in the degranulation inhibition induced by epigallocatechin-3-O-gallate. *Biochem Biophys Res Commun*, *348*(2), 524-531.
- Fujimura, Y., Umeda, D., Yamada, K., & Tachibana, H. (2008). The impact of the 67kDa laminin receptor on both cell-surface binding and anti-allergic action of tea catechins. *Arch Biochem Biophys*, *476*(2), 133-138.
- Griffith, I. J., Pollock, J., Klapper, D. G., Rogers, B. L., & Nault, A. K. (1991). Sequence polymorphism of Amb a I and Amb a II, the major allergens in *Ambrosia artemisiifolia* (short ragweed). *Int Arch Allergy Appl Immunol*, *96*(4), 296-304.
- Gruber, P., Vieths, S., Wangorsch, A., Nerkamp, J., & Hofmann, T. (2004). Maillard reaction and enzymatic browning affect the allergenicity of Pru av 1, the major allergen from cherry (*Prunus avium*). *J Agric Food Chem*, *52*(12), 4002-4007.
- Gudgin, R., William, L., & Ware, R. (1981). Photophysics of tryptophane in water, deuterium oxide and nonaqueous solvents. *Can J Chem*.
- Halliwell, R. (2006). Revised nomenclature for veterinary allergy. *Vet Immunol Immunopathol*, *114*(3-4), 207-208.

- Hasni, I., Bourassa, P., Hamdani, S., Samson, G., Carpentier, R., & al., e. (2011). Interaction of milk alpha- and beta-caseins with tea polyphenols. *Food Chem*, *126*, 630-639.
- Hasni, I., Bourassa, P., & Tajmir-Riahi, H. A. (2011). Binding of cationic lipids to milk beta-lactoglobulin. *J Phys Chem B*, *115*(20), 6683-6690.
- Hassanain, E., Silverberg, J. I., Norowitz, K. B., Chice, S., Bluth, M. H., Brody, N., Joks, R., Durkin, H. G., & Smith-Norowitz, T. A. (2010). Green tea (*Camelia sinensis*) suppresses B cell production of IgE without inducing apoptosis. *Ann Clin Lab Sci*, *40*(2), 135-143.
- Heidenreich, S. (1999). Monocyte CD14: a multifunctional receptor engaged in apoptosis from both sides. *J Leukoc Biol*, *65*(6), 737-743.
- Hill, P. B., & DeBoer, D. J. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IV): environmental allergens. *Vet Immunol Immunopathol*, *81*(3-4), 169-186.
- Hillier, A., & Griffin, C. E. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence. *Vet Immunol Immunopathol*, *81*(3-4), 147-151.
- Hilmenyuk, T., Bellinghausen, I., Heydenreich, B., Ilchmann, A., Toda, M., Grabbe, S., & Saloga, J. (2010). Effects of glycation of the model food allergen ovalbumin on antigen uptake and presentation by human dendritic cells. *Immunology*, *129*(3), 437-445.
- Honma, K., Kohno, Y., Saito, K., Shimojo, N., Horiuchi, T., Hayashi, H., Suzuki, N., Hosoya, T., Tsunoo, H., & Niimi, H. (1996). Allergenic epitopes of ovalbumin (OVA) in patients with hen's egg allergy: inhibition of basophil histamine release by haptenic ovalbumin peptide. *Clin Exp Immunol*, *103*(3), 446-453.
- Inoue, T., Suzuki, Y., & Ra, C. (2010). Epigallocatechin-3-gallate inhibits mast cell degranulation, leukotriene C4 secretion, and calcium influx via mitochondrial calcium dysfunction. *Free Radic Biol Med*, *49*(4), 632-640.
- Jager, S. (2000). Ragweed (*Ambrosia*) sensitisation rates correlate with the amount of inhaled airborne pollen. A 14-year study in Vienna, Austria. *Aerobiologia*, *16*, 4.
- Janjic, S., & Vrbnicanin, S. (2007). Poreklo i rasprostranjenost ambrozije. In V. Janjic (Ed.), *Ambrozija*, (pp. 11-18): Herbološko Društvo Srbije, Belgrade.
- Javady, T., & Arzani, K. (2001). Pollen morphology of five Iranian olive (*Olea europea* L.) cultivars. *J Agric Sci Technol*, *3*, 37-42.

- Johnsen, G., & Elsayed, S. (1990). Antigenic and allergenic determinants of ovalbumin-III. MHC Ia-binding peptide (OA 323-339) interacts with human and rabbit specific antibodies. *Mol Immunol*, 27(9), 821-827.
- Kahlert, H., Petersen, A., Becker, W. M., & Schlaak, M. (1992). Epitope analysis of the allergen ovalbumin (Gal d II) with monoclonal antibodies and patients' IgE. *Mol Immunol*, 29(10), 1191-1201.
- Kanakis, C., Hasni, I., Bourassa, P., Tarantilis, P., Polissiou, M., & Tajmir-Riahi, H. (2011). Milk beta-lactoglobulin complexes with tea polyphenols. *Food Chemistry*, 127(3), 1046-1055.
- Kawai, K., Tsuno, N. H., Kitayama, J., Okaji, Y., Yazawa, K., Asakage, M., Sasaki, S., Watanabe, T., Takahashi, K., & Nagawa, H. (2005). Epigallocatechin gallate induces apoptosis of monocytes. *J Allergy Clin Immunol*, 115(1), 186-191.
- Kidd, P. (2003). Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev*, 8(3), 223-246.
- Kindberg, G. M., Magnusson, S., Berg, T., & Smedsrod, B. (1990). Receptor-mediated endocytosis of ovalbumin by two carbohydrate-specific receptors in rat liver cells. The intracellular transport of ovalbumin to lysosomes is faster in liver endothelial cells than in parenchymal cells. *Biochem J*, 270(1), 197-203.
- King, T. P., Alagon, A., Kochoumian, L., Kuan, J., Sobotka, A., & Lichtenstein, L. M. (1981). Limited proteolysis of antigens E and K from ragweed pollen. *Arch Biochem Biophys*, 212(1), 127-135.
- King, T. P., Norman, P. S., & Connell, J. T. (1964). Isolation and Characterization of Allergens from Ragweed Pollen. Ii. *Biochemistry*, 3, 458-468.
- King, T. P., Norman, P. S., & Tao, N. (1974). Chemical modifications of the major allergen of ragweed pollen, antigen E. *Immunochemistry*, 11(2), 83-92.
- Kitzmuller, C., Wallner, M., Deifl, S., Mutschlechner, S., Walterskirchen, C., Zlabinger, G. J., Ferreira, F., & Bohle, B. (2012). A hypoallergenic variant of the major birch pollen allergen shows distinct characteristics in antigen processing and T-cell activation. *Allergy*, 67(11), 1375-1382.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lakowicz, J. R., Gryczynski, I., Gryczynski, Z., & Dattelbaum, J. D. (1999). Anisotropy-based sensing with reference fluorophores. *Anal Biochem*, 267(2), 397-405.

- Lambert, J. D., Kennett, M. J., Sang, S., Reuhl, K. R., Ju, J., & Yang, C. S. (2010). Hepatotoxicity of high oral dose (-)-epigallocatechin-3-gallate in mice. *Food Chem Toxicol*, 48(1), 409-416.
- Ledin, A., Bergvall, K., Hillbertz, N. S., Hansson, H., Andersson, G., Hedhammar, A., & Hellman, L. (2006). Generation of therapeutic antibody responses against IgE in dogs, an animal species with exceptionally high plasma IgE levels. *Vaccine*, 24(1), 66-74.
- Leonard, R., Wopfner, N., Pabst, M., Stadlmann, J., Petersen, B. O., Duus, J. O., Himly, M., Radauer, C., Gadermaier, G., Razzazi-Fazeli, E., Ferreira, F., & Altmann, F. (2010). A new allergen from ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) with homology to art v 1 from mugwort. *J Biol Chem*, 285(35), 27192-27200.
- Li, W., Nie, S., Yu, Q., & Xie, M. (2009). (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis of human hepatoma cells by mitochondrial pathways related to reactive oxygen species. *J Agric Food Chem*, 57(15), 6685-6691.
- Lin, H. Y., Hou, S. C., Chen, S. C., Kao, M. C., Yu, C. C., Funayama, S., Ho, C. T., & Way, T. D. (2012). (-)-Epigallocatechin gallate induces Fas/CD95-mediated apoptosis through inhibiting constitutive and IL-6-induced JAK/STAT3 signaling in head and neck squamous cell carcinoma cells. *J Agric Food Chem*, 60(10), 2480-2489.
- Lombardero, M., Heymann, P. W., Platts-Mills, T. A., Fox, J. W., & Chapman, M. D. (1990). Conformational stability of B cell epitopes on group I and group II Dermatophagoides spp. allergens. Effect of thermal and chemical denaturation on the binding of murine IgG and human IgE antibodies. *J Immunol*, 144(4), 1353-1360.
- Long, L. H., & Halliwell, B. (2009). Artefacts in cell culture: pyruvate as a scavenger of hydrogen peroxide generated by ascorbate or epigallocatechin gallate in cell culture media. *Biochem Biophys Res Commun*, 388(4), 700-704.
- Lowenstein, H. (1978). Quantitative immunoelectrophoretic methods as a tool for the analysis and isolation of allergens. *Prog Allergy*, 25, 1-62.
- Lowenstein, H., & Marsh, D. G. (1983). Antigens of *Ambrosia elatior* (short ragweed) pollen. III. Crossed radioimmuno-electrophoresis of ragweed-allergic patients' sera with special attention to quantification of IgE responses. *J Immunol*, 130(2), 727-731.

- Mackay, I., & Rosen, F. (2001). Allergy and allergic diseases. *N Engl J Med*, 344, 109-113.
- Marengo, M., Bonomi, F., Iametti, S., Prinz, E., Hempelmann, R., Boye, M., & Frokiaer, H. (2011). Recognition and uptake of free and nanoparticle-bound betalactoglobulin--a food allergen--by human monocytes. *Mol Nutr Food Res*, 55(11), 1708-1716.
- Marsh, D. G. (1975). Allergens and the genetics of allergy. In M. Sela (Ed.), *The Antigens* 3rd ed., (pp. 271-350). New York: Academic Press.
- Masuda, K., Tsujimoto, H., Fujiwara, S., Kurata, K., Hasegawa, A., Taniguchi, Y., Yamashita, K., Yasueda, H., DeBoer, D. J., de Weck, A. L., & Sakaguchi, M. (2000). IgE-reactivity to major Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen allergens (Cry j 1 and Cry j 2) by ELISA in dogs with atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol*, 74(3-4), 263-270.
- Masuda, K., Tsujimoto, H., Fujiwara, S., Kurata, K., Hasegawa, A., Yasueda, H., Yamashita, K., DeBoer, D. J., de Weck, A. L., & Sakaguchi, M. (1999). IgE sensitivity and cross-reactivity to crude and purified mite allergens (Der f 1, Der f 2, Der p 1, Der p 2) in atopic dogs sensitive to *Dermatophagoides* mite allergens. *Vet Immunol Immunopathol*, 72(3-4), 303-313.
- Meeusen, E. N. (1999). Immunology of helminth infections, with special reference to immunopathology. *Vet Parasitol*, 84(3-4), 259-273.
- Melgarejo, E., Medina, M. A., Sanchez-Jimenez, F., & Urdiales, J. L. (2010). Targeting of histamine producing cells by EGCG: a green dart against inflammation? *J Physiol Biochem*, 66(3), 265-270.
- Milcic-Matic, N., Ognjenovic, J., Burazer, L., Blagojevic, G., Popovic, N., & Stanic-Vucinic, D. (2013). Evaluation of criteria for diagnosis of atopic dermatitis and detection of allergen specific IgE antibodies in dogs allergic to *Ambrosia artemisiifolia* pollen. *Acta Vet*, 63, in press.
- Milcic-Matic, N., Popovic, N., Lazarevic, M., & Medenica, L. (2010). The role of *Ambrosia artemisiifolia* allergen in canine atopic dermatitis. *Acta Vet*, 60, 183-196.
- Moraru, II, Laky, M., Stanescu, T., Buzila, L., & Popescu, L. M. (1990). Protein kinase C controls Fc gamma receptor-mediated endocytosis in human neutrophils. *FEBS Lett*, 274(1-2), 93-95.

- Mur, P., Feo Brito, F., Lombardero, M., Barber, D., Galindo, P. A., Gomez, E., & Borja, J. (2001). Allergy to linden pollen (*Tilia cordata*). *Allergy*, *56*(5), 457-458.
- Muraille, E., & Leo, O. (1998). Revisiting the Th1/Th2 paradigm. *Scand J Immunol*, *47*(1), 1-9.
- Nelms, K., Keegan, A. D., Zamorano, J., Ryan, J. J., & Paul, W. E. (1999). The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol*, *17*, 701-738.
- Nesbitt, G., Kedan, G., & Cacciolo, P. (1984). Canine atopy 1. Etiology and diagnosis. Compendium on continuing education of practicing veterinarian. *6*, 73-84.
- Nuttall, T. J., Hill, P. B., Bensignor, E., Willemse, T., & members of the International Task Force on Canine Atopic, D. (2006). House dust and forage mite allergens and their role in human and canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol*, *17*(4), 223-235.
- Olivry, T., Dunston, S., Murphy, K., & Moore, P. (2001). Characterization of the inflammatory infiltrate during IgE-mediated late phase reactions in the skin of normal and atopic dogs. *Vet Dermatol*, *12*(1), 49-58.
- Phelps, J. (2007). Ragweed subpollen particles reach deep into lungs. *Environ Health Perspect*, *115*(4), A193.
- Pleasants, J. M., Hellmich, R. L., Dively, G. P., Sears, M. K., Stanley-Horn, D. E., Mattila, H. R., Foster, J. E., Clark, P., & Jones, G. D. (2001). Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(21), 11919-11924.
- Pullola, T., Vierimaa, J., Saari, S., Virtala, A. M., Nikander, S., & Sukura, A. (2006). Canine intestinal helminths in Finland: prevalence, risk factors and endoparasite control practices. *Vet Parasitol*, *140*(3-4), 321-326.
- Radoglou, K., Dobrowolska, D., Spyroglou, G., & Nicolescu, V. (2008). A review on the ecology and silviculture of limes (*Tilia cordata* Mill., *Tilia platyphyllos* Scop. And *Tilia tomentosa* Moench.) in Europe. <http://www.valbro.uni-freiburg.de/>, 29.
- Rafnar, T., Griffith, I. J., Kuo, M. C., Bond, J. F., Rogers, B. L., & Klapper, D. G. (1991). Cloning of Amb a I (antigen E), the major allergen family of short ragweed pollen. *J Biol Chem*, *266*(2), 1229-1236.
- Reedy, L., Miller, W., & Willemse, T. (1997). *Allergic Skin Diseases of Dogs and Cats* (2nd ed.). London: WB Saunders.

- Rodriguez, R., Villalba, M., Monsalve, R. I., & Batanero, E. (2001). The spectrum of olive pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol*, *125*(3), 185-195.
- Rogers, B. L., Morgenstern, J. P., Griffith, I. J., Yu, X. B., Counsell, C. M., Brauer, A. W., King, T. P., Garman, R. D., & Kuo, M. C. (1991). Complete sequence of the allergen Amb alpha II. Recombinant expression and reactivity with T cells from ragweed allergic patients. *J Immunol*, *147*(8), 2547-2552.
- Rosen, F. S., & Mackay, I. (2001). The immunology series comes to an end. *N Engl J Med*, *345*(18), 1343-1344.
- Sahoo, G. C. (1999). A clinico-pathological study of the role of allergy on larynx in children. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*, *52*(1), 54-57.
- Sakaguchi, M., Inouye, S., Taniai, M., Ando, S., Usui, M., & Matuhasi, T. (1990). Identification of the second major allergen of Japanese cedar pollen. *Allergy*, *45*(4), 309-312.
- Sampson, H. A. (2004). Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, *113*(5), 805-819; quiz 820.
- Sarkar, F. H., Li, Y., Wang, Z., & Kong, D. (2009). Cellular signaling perturbation by natural products. *Cell Signal*, *21*(11), 1541-1547.
- Schontal, A. (2011). Adverse effects of concentrated green tea extracts. *Mol Nutr Food Res*, *55*, 874-885.
- Scott, D. (1981). Observations on canine atopy. *J Am Anim Hosp Assoc*, *17*, 91-100.
- Scott, D., Miller, W., & Griffin, C. (2001). *Animal Dermatology, 6th Ed.* Philadelphia: WB Saunders.
- Sheares, B. T., & Robbins, P. W. (1986). Glycosylation of ovalbumin in a heterologous cell: analysis of oligosaccharide chains of the cloned glycoprotein in mouse L cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *83*(7), 1993-1997.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*, *1*(6), 2856-2860.
- Si-Yin Chung, E. (2009). Reducing the allergenic potential of peanut extracts and liquid peanut butter by phenolic compounds. *Food Chemistry*, *115*, 1345-1349.
- Sikoparija, B., Smith, M., Skjoth, C. A., Radisic, P., Milkovska, S., Simic, S., & Brandt, J. (2009). The Pannonian plain as a source of Ambrosia pollen in the Balkans. *Int J Biometeorol*, *53*(3), 263-272.



- Simonovic, M., Gettins, P. G. W., & Volz, K. (2000). Crystal structure of viral serpin crmA provides insights into its mechanism of cysteine proteinase inhibition. *Protein Sci*, 9(8), 1423-1427.
- Singh, A., Holvoet, S., & Mercenier, A. (2011). Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases. *Clin Exp Allergy*, 41(10), 1346-1359.
- Singh, R., Akhtar, N., & Haqqi, T. M. (2010). Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate: inflammation and arthritis. [corrected]. *Life Sci*, 86(25-26), 907-918.
- Sofiev, M., Siljamo, P., Ranta, H., & Rantio-Lehtimäki, A. (2006). Towards numerical forecasting of long-range air transport of birch pollen: theoretical considerations and a feasibility study. *Int J Biometeorol*, 50(6), 392-402.
- Stanic-Vucinic, D., Stojadinovic, M., Atanaskovic-Markovic, M., Ognjenovic, J., Gronlund, H., van Hage, M., Lantto, R., Sancho, A. I., & Velickovic, T. C. (2012). Structural changes and allergenic properties of beta-lactoglobulin upon exposure to high-intensity ultrasound. *Mol Nutr Food Res*, 56(12), 1894-1905.
- Sture, G. H., Halliwell, R. E., Thoday, K. L., van den Broek, A. H., Henfrey, J. I., Lloyd, D. H., Mason, I. S., & Ferguson, E. (1995). Canine atopic disease: the prevalence of positive intradermal skin tests at two sites in the north and south of Great Britain. *Vet Immunol Immunopathol*, 44(3-4), 293-308.
- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., & Conte, A. (2005). Effect of some phenolic compounds and beverages on pepsin activity during simulated gastric digestion. *J Agric Food Chem*, 53(22), 8706-8713.
- Takeda, K., Tanaka, T., Shi, W., Matsumoto, M., Minami, M., Kashiwamura, S., Nakanishi, K., Yoshida, N., Kishimoto, T., & Akira, S. (1996). Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature*, 380(6575), 627-630.
- Tantoush, Z., Apostolovic, D., Kravic, B., Prodic, I., Mihajlovic, L., Stanic-Vucinic, D., & Cirkovic Velickovic, T. (2013). Green tea catechins of food supplements facilitate pepsin digestion of major food allergens, but hampers their digestion if oxidized by phenol oxidase. *J Funct Foods*, 4, 650-660.
- Taszkun, I. (2011). The results of intradermal skin tests (IDST) in dogs with atopic dermatitis from the Lublin voivodeship. *Pol J Vet Sci*, 14(1), 95-101.
- Thumann, P., Moc, I., Humrich, J., Berger, T. G., Schultz, E. S., Schuler, G., & Jenne, L. (2003). Antigen loading of dendritic cells with whole tumor cell preparations. *J Immunol Methods*, 277(1-2), 1-16.

- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*, *31*(2), 455-461.
- Ullmann, U., Haller, J., Decourt, J. P., Girault, N., Girault, J., Richard-Caudron, A. S., Pineau, B., & Weber, P. (2003). A single ascending dose study of epigallocatechin gallate in healthy volunteers. *J Int Med Res*, *31*(2), 88-101.
- Valenta, R. (2002). The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nat Rev Immunol*, *2*(6), 446-453.
- Vissers, Y. M., Blanc, F., Skov, P. S., Johnson, P. E., Rigby, N. M., Przybylski-Nicaise, L., Bernard, H., Wal, J. M., Ballmer-Weber, B., Zuidmeer-Jongejan, L., Szepfalusi, Z., Ruinemans-Koerts, J., Jansen, A. P., Savelkoul, H. F., Wichers, H. J., Mackie, A. R., Mills, C. E., & Adel-Patient, K. (2011). Effect of heating and glycation on the allergenicity of 2S albumins (Ara h 2/6) from peanut. *PLoS One*, *6*(8), e23998.
- von Mutius, E. (2007). Allergies, infections and the hygiene hypothesis--the epidemiological evidence. *Immunobiology*, *212*(6), 433-439.
- Wang, J., Pae, M., Meydani, S. N., & Wu, D. (2012). Epigallocatechin-3-gallate inhibits expression of receptors for T cell regulatory cytokines and their downstream signaling in mouse CD4+ T cells. *J Nutr*, *142*(3), 566-571.
- Wang, R. Q., Yin, Y. J., Li, H., Wang, Y., Pu, J. J., Wang, R., Dou, H. J., Song, C. J., & Wang, R. Y. (2013). Comparative study of the interactions between ovalbumin and three alkaloids by spectrofluorimetry. *Mol Biol Rep*, *40*(4), 3409-3418.
- Weber, R. W. (2005). Ambrosia psilostoschya. *Ann Allergy Asthma Immunol*, *95*(2), A-6.
- Wide, L., Bennich, H., & Johansson, S. G. (1967). Diagnosis of allergy by an in-vitro test for allergen antibodies. *Lancet*, *2*(7526), 1105-1107.
- Wjst, M. (2009). Introduction of oral vitamin D supplementation and the rise of the allergy pandemic. *Allergy Asthma & Clinical Immunology*, *5*(1), 8.
- Wolthers, O. D. (2012). Component-resolved diagnosis in pediatrics. *ISRN Pediatr*, *2012*, 806920.
- Wong, C. P., Nguyen, L. P., Noh, S. K., Bray, T. M., Bruno, R. S., & Ho, E. (2011). Induction of regulatory T cells by green tea polyphenol EGCG. *Immunol Lett*, *139*(1-2), 7-13.
- Wopfner, N., Jahn-Schmid, B., Schmidt, G., Christ, T., Hubinger, G., Briza, P., Radauer, C., Bohle, B., Vogel, L., Ebner, C., Asero, R., Ferreira, F., & Schwarzenbacher,

- R. (2009). The alpha and beta subchain of Amb a 1, the major ragweed-pollen allergen show divergent reactivity at the IgE and T-cell level. *Mol Immunol*, *46*(10), 2090-2097.
- Wu, D., Guo, Z., Ren, Z., Guo, W., & Meydani, S. N. (2009). Green tea EGCG suppresses T cell proliferation through impairment of IL-2/IL-2 receptor signaling. *Free Radic Biol Med*, *47*(5), 636-643.
- Wu, S. Y., Silverberg, J. I., Joks, R., Durkin, H. G., & Smith-Norowitz, T. A. (2012). Green tea (*Camelia sinensis*) mediated suppression of IgE production by peripheral blood mononuclear cells of allergic asthmatic humans. *Scand J Immunol*, *76*(3), 306-310.
- Xiao, J., Mao, F., Yang, F., Zhao, Y., Zhang, C., & Yamamoto, K. (2011). Interaction of dietary polyphenols with bovine milk proteins: molecular structure-affinity relationship and influencing bioactivity aspects. *Mol Nutr Food Res*, *55*(11), 1637-1645.
- Yang, C. S., Wang, X., Lu, G., & Picinich, S. C. (2009). Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nat Rev Cancer*, *9*(6), 429-439.
- Yasueda, H., Yui, Y., Shimizu, T., & Shida, T. (1983). Isolation and partial characterization of the major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *J Allergy Clin Immunol*, *71*(1 Pt 1), 77-86.
- Yoneyama, S., Kawai, K., Tsuno, N. H., Okaji, Y., Asakage, M., Tsuchiya, T., Yamada, J., Sunami, E., Osada, T., Kitayama, J., Takahashi, K., & Nagawa, H. (2008). Epigallocatechin gallate affects human dendritic cell differentiation and maturation. *J Allergy Clin Immunol*, *121*(1), 209-214.
- Yuksel, Z., Avci, E., & Erdem, Y. (2010). Characterization of binding interactions between green tea flavonoids and milk proteins. *Food Chem*, *121*, 450-456.
- Zuercher, A. W., Holvoet, S., Weiss, M., & Mercenier, A. (2010). Polyphenol-enriched apple extract attenuates food allergy in mice. *Clin Exp Allergy*, *40*(6), 942-950.
- Zur, G., Ihrke, P. J., White, S. D., & Kass, P. H. (2002). Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 266 cases examined at the University of California, Davis, 1992-1998. Part I. Clinical features and allergy testing results. *Vet Dermatol*, *13*(2), 89-102.

## 9. Prilog A: Radovi koji čine deo disertacije

1. Ognjenovic, J., Tantoush, Z.O., Jankov, R.M., Cirkovic Velickovic, T., Vukmirica, J. (2012) Isolation of functional total RNA from *Tilia cordata* leaves and pollen. *J Serb Chem Soc* 77, 1-19
2. Ognjenovic, J., Milcic-Matic, N., Smiljanic, K., Vuckovic, O., Burazer, L., Popovic, N., Stanic-Vucinic, D., Cirkovic Velickovic, T. (2013) Immunoproteomic characterization of *Ambrosia artemisiifolia* pollen allergens in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunop*, 155, 38-47.
3. Ognjenovic, J., Stojadinovic, M., Milcic, M., Apostolovic, D., Vesic J., Stambolic, I., Atanaskovic-Markovic, M., Simonovic, M., Cirkovic Velickovic, T. (2013), Interactions of epigallo-catechin 3-gallate and ovalbumin, the major allergen of egg white, *Food Chem*, under review.

## 10. Biografija autora

Jana Ognjenović je rođena 25. Oktobra 1985. godine u Zrenjaninu, Republika Srbija. Osnovnu i srednju školu završila je u Zrenjaninu. Hemijski fakultet, smer diplomirani biohemičar, upisala je 2004. godine, a diplomirala 2008. godine sa prosečnom ocenom 8.97 po ubrzanom programu studiranja i ocenom deset na diplomskom ispitu. Studijski program doktor biohemijskih nauka upisala je u oktobru 2008. godine. Od novembra 2010. godine radi kao istraživač saradnik na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Tokom doktorskih studija boravila je na tromesečnom usavršavanju u istraživačkom centru Borstel (Borstel, Nemačka), a potom i na tromesečnom usavršavanju na RWTH Univerzitetu (Ahen, Nemačka) tokom 2010. godine. Tokom 2012. godine boravila je na jednomesečnom usavršavanju u naučnom centru CSIC u Granadi, Španija.

Član je Srpskog hemijskog društva, Biohemijskog društva Srbije i Evropske akademije za alergiju i kliničku imunologiju. Autor je šest radova štampanih u međunarodnim časopisima i poglavlja u monografiji od međunarodnog značaja.

## Прилог 1.

### Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Јана Огњеновић \_\_\_\_\_  
број уписа \_\_\_\_\_ дб 5/2008 \_\_\_\_\_

#### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Имунолошка карактеризација полена липа и модулација имунског одговора  
природним ароматичним једињењима

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, 01.10.2013.

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије  
докторског рада**

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Јана Огњеновић \_\_\_\_\_

Број уписа \_\_\_\_\_ дб 05/2008 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Доктор биохемијских наука \_\_\_\_\_

Наслов рада Имунолошка карактеризација полена липа и модулација имунског  
одговора природним ароматичним једињењима

Ментор \_\_\_\_\_ проф. др Тања Ћирковић Величковић \_\_\_\_\_

Потписани/а \_\_\_\_\_ Јана Огњеновић \_\_\_\_\_

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, 01.10.2013.

\_\_\_\_\_

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Имунолошка карактеризација полена липа и модулација имунског одговора  
природним ароматичним једињењима

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, 01.10.2013.

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.



3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.