

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Милица М. Поповић

број уписа 7/2007

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ИЗОЛОВАЊЕ И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ПРИРОДНИХ И РЕКОМБИНАНТНО
ДОБИЈЕНИХ АЛЕРГЕНА ИЗ КИВИЈА (*ACTINIDIA DELICIOSA* LIANG, FERGUSON)
ЗА ПРИМЕНУ У АЛЕРГИЈСКОЈ ДИЈАГНОСТИЦИ И ТЕРАПИЈИ

- 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, 8.11.2012

Milica Popovic

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милица М. Поповић

Број уписа 7/2007

Студијски програм Доктор биохемијских наука

Наслов рада ИЗОЛОВАЊЕ И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ПРИРОДНИХ И РЕКОМБИНАНТНО ДОБИЈЕНИХ АЛЕРГЕНА ИЗ КИВИЈА (*ACTINIDIA DELICIOSA* LIANG, FERGUSON) ЗА ПРИМЕНУ У АЛЕРГИЈСКОЈ ДИЈАГНОСТИЦИ И ТЕРАПИЈИ

Ментор др Марија Гавровић-Јанкуловић

Потписани *Milica Popovic*

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, 08.11.2012

Milica Popovic

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

ИЗОЛОВАЊЕ И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ПРИРОДНИХ И РЕКОМБИНАНТНО ДОБИЈЕНИХ АЛЕРГЕНА ИЗ КИВИЈА (*ACTINIDIA DELICIOSA* LIANG, FERGUSON) ЗА ПРИМЕНУ У АЛЕРГИЈСКОЈ ДИЈАГНОСТИЦИ И ТЕРАПИЈИ

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, 08.11.2012

Milica Popovic

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Milica M. Popović

**IZOLOVANJE I KARAKTERIZACIJA
PRIRODNIH I REKOMBINANTNO
DOBIJENIH ALERGENA IZ KIVIJA
(*ACTINIDIA DELICIOSA* LIANG,
FERGUSON) ZA PRIMENU U
ALERGIJSKOJ DIJAGNOSTICI I
TERAPIJI**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Milica M. Popović

**ISOLATION AND CHARACTERISATION
OF NATURAL AND RECOMBINANT
ALLERGENS FROM GREEN KIWIFRUIT
(*ACTINIDIA DELICIOSA* LIANG,
FERGUSON) FOR ALLERGY DIAGNOSIS
AND THERAPY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

Članovi Komisije:

1. dr Marija Gavrović-Jankulović, vanredni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (mentor)
2. dr Ratko M. Jankov, redovni profesor u penziji Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. dr Radivoje Prodanović, docent Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
4. dr Ljiljana Dimitrijević, naučni savetnik Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak”
5. dr Marina Atanasković-Marković, naučni saradnik Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane:

Ova teza je urađena na Kateri za biohemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Fraunhofer institutu za molekularnu biologiju i primenjenu ekologiju u Ahenu Nemačkoj. Teza je podržana od strane Evropske federacije biohemijskih društava (FEBS) kroz dve FEBS Kolaborativne eksperimentalne stipendije za centralnu i istočnu Evropu.

Ovom prilikom želim da se zahvalim mentoru, vanrednom profesoru dr Mariji Gavrović-Jankulović na ukazanom poverenju, nesebičnoj pomoći, vrednim savetima, uvek inovativnom pristupu i prijateljskom stavu na koji sam naišla tokom izrade ovog rada.

Neizmernu zahvalnost dugujem profesoru dr Ratku M. Jankovu kako na podršci i poverenju tako i na brojnim naučnim diskusijama i savetima koji su mi u mnogome pomogli da izradim ovaj rad.

Takođe bih želela da se zahvalim i docentu dr Radivoju Prodanoviću na pomoći oko izrade praktičnog dela ovog rada, kao i tokom pisanja teksta. Njegova predanost, profesionalnost i podrška u izradi ovog rada su bili nezamenljivi.

Posebno bih želela da se zahvalim dr Ljiljani Dimitrijević na pružanju podrške, korisnim savetima tokom izrade ovog rada i ostvarivanju uslova za njegov završetak.

Želela bih da se zahvalim i dr Marini Atanasković-Marković na korisnim savetima tokom izrade i pisanja ove teze kao i ostvarivanju uslova za njen završetak.

Takođe zahvalnost dugujem dr Aleksandri Bulajić, dr Branki Krstić i Danijeli Ristić sa Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu za zajedničku saradnju vezanu za eksperimente na fitopatogenimn gljivama.

Zahvaljujem se i dr Urošu Anđelkoviću za pomoć oko masene analize.

Ova disertacija je i plod saradnje sa inostranim naučnicima dr Stefan Schillber (Nemačka), Raluca Ostafe (Nemačka), dr Arnd Petersen (Nemačka), dr Buko Lindner (Nemačka) i dr Karin Hoffman-Somergruber (Austrija),

Zahvalnost dugujem svim članovima laboratorije 429 na nesebičnoj pomoći i korisnim savetima koje su mi pružili tokom izrade ovog rada. Hvala Dragani, Milici, Nenadu, Jeleni, Jani i svim ostalima koje nisam navela po imenu.

Veliku zahvalnost dugujem i svojim dragim prijateljima/kolegama koji su sa mnom delili mnoge lepe trenutke, a one teške uvek činili malo lakšima. Veliko hvala Nataliji, Milici i Goranu.

Zahvaljujem se svim svojim prijateljima i kolegama na razumevanju i podršci.

Na kraju, želim da se zahvalim svojim roditeljima i bratu što su verovali u mene. Njihova ljubav i vera najzaslužniji su za moja dostignuća. Njima posvećujem ovaj rad.

Naziv: Izolovanje i karakterizacija prirodnih i rekombinantno dobijenih alergena iz kivija (*Actinidia deliciosa* Liang, Ferguson) za primenu u alergijskoj dijagnostici i terapiji

Izvod

Zamena alergeni ekstraktata pojedinačnim prirodnim i rekombinantnim alergenima u dijagnostici alergije je obećavajući koncept i naziva se dijagnostika razdvojena na komponente CRD (*engl.* component-resolved diagnosis). U tom smislu, neophodno je proceniti alergeni potencijal svakog pojedinačnog kandidata za primenu u CRD.

U ovoj tezi ocenjivane su biohemijske i alergene osobine cistein proteaznog inhibitora (nCPI) iz ploda zelenog kivija. Prečišćeni nCPI pokazao je IgE reaktivnosti *in vitro* (dot blot) i *in vivo* (kožne probe i aktivacija bazofila), dok je IgG reaktivnost pokazana u Western blotu i ELISA-i. Biološka aktivnost je ocenjena ispitivanjem antimikrobnog potencijala nCPI naspram tri soja fitopatogenih bakterija (*A. tumefaciens*, *B. cepacia* i u manjem obimu bakterije *E. carotovora*) kao i dva izolata fitopatogenih gljiva (*A. radicina* i *B. cinerea*), kako *in vitro*, tako i *in vivo*. Zbog slabe zastupljenosti nCPI u plodu kivija kodirajuća sekvenca nCPI je efikasno eksprimirana u *Escherichia coli*. Molekulska identičnost rCPI u odnosu na prirodni molekul pokazana je strukturnim (maseni otisak prsta) i imunohemijskim (imunoblot i ELISA) i biološkim (inhibicija proteazne aktivnosti papaina i rasta fitopatogenih gljiva) testovima. Na osnovu dobijenih rezultata jasno je da je CPI klinički relevantan alergen i kao takav trebalo bi da bude uključen u dijagnostiku alergije na kivi razdvojenu na komponente.

Standardni imunoterapijski pristup u tretmanu alergije na hranu nije adekvatan zbog visokog rizika, pa je primena hipoalergenih molekula koji smanjeno vezuju IgE obećavajući koncept. Diverzifikacija gena za aktinidin rađena je lančanom reakcijom polimeraze sklone greškama epPCR (*engl.* error-prone PCR) koja je praćena kloniranjem biblioteke u Aga2 ekspresioni sistem za ekspresiju na površini ćelija kvasca. Nakon tri runde sortiranja, nasumično odabrani klonovi su dalje analizirani dot blotom i ELISA testom koristeći serum 6 osoba alergičnih na kivi U poređenju sa prirodnim i rekombinantnim aktinidinom, dva mutanata su pokazala smanjenu sposobnost aktivacije bazofila. Ovakav tip mutacione analize mogao bi da bude korisna

tehnika u razvoju vakcina za terapiju alergije, s obzirom da supstitucija ili delecija aminokiselina u IgE vezujućim epitopima može da smanji ili eliminiše anafilaktički potencijal molekula.

Ključne reči: zeleni kivi/ karakterizacija proteina/ allergen/ cistein proteinazni inhibitor/ fitocistatin/ dijagnostika alergije / antimikrobna aktivnost/ aktinidin/ imunoterapija/ dirigovana evolucija

Naučna oblast: Prirodno-matematičke nauke

Uža naučna oblast: Biohemija

UDK broj: 577.112

Title: Isolation and characterisation of natural and recombinant allergens from green kiwifruit (*Actinidia deliciosa* Liang, Ferguson) for allergy diagnosis and therapy

Abstract

The replacement of fruit allergen extracts with component-resolved allergens seems to be a promising concept. In this regard, the evaluation of allergenic properties of a particular allergen candidate for component-resolved diagnosis needs to be performed.

In this study evaluation of the biochemical and allergenic properties of cysteine proteinase inhibitor purified from green kiwifruit (nCPI) was performed. The IgE reactivity was detected both *in vitro* (dot blot) and *in vivo* (skin prick test and basophile activation assay), while IgG reactivity in both Western blot analysis and ELISA test.

Biological activity was assessed by examining the growth inhibition of three plant pathogenic bacterial strains (*A.tumefaciens*, *B. cepacia* and, to a lesser extent, *E. carotovora*) and two phytopathogenic fungi (*A. radicina* and *B. cinerea*) both *in vitro* and *in vivo*. Due to low abundance of nCPI molecule in kiwifruit the coding sequence of kiwi CPI was efficiently expressed in *Escherichia coli*. Molecular identity of rCPI to its natural counterpart has been clearly demonstrated in structural (mass fingerprint), immunological (immunoblot and ELISA inhibition) and biological sense (inhibition of papain proteolytic activity and antifungal activity). Based on the obtained results it is clear that nCPI is a clinically relevant kiwifruit allergen, and as such should be involved in the component-resolved diagnosis of kiwifruit allergy.

Standard immunotherapeutic approaches in food allergy are not adequate due to unacceptably high risk-to-benefit ratio, however hypoallergenic forms of molecules with reduced IgE binding potential seem to be promising concept. Diversification of the gene encoding the mature form of the actinidin was done via error prone PCR, followed by cloning of the library into the Aga2 yeast surface display expression system. After three rounds of sorting by FACS, randomly picked colonies were further analyzed by dot blot and ELISA using pool of 6 kiwifruit allergic patients. Compared to both natural and recombinant wild type actinidin two of the mutants exhibited diminished ability to activate basophils. This kind of mutational analysis could be a useful technique in the

development of vaccines for allergy therapy, since substitution or deletion of amino acids within the IgE binding epitopes could result in reduction or elimination of the anaphylactic potential of the molecule.

Key words: green kiwi/ characterization of proteins/ allergen/ cistein proteinase inhibitor/ phytocistatin/ allergy diagnostic / antimicrobial activity/ actinidin/ imunotherapy/ directed evolution

Scientific field: Life sciences

Scientific discipline: Biochemistry

UDK number: 577.112

Sadržaj:

1	UVOD.....	13
2	OPŠTI DEO.....	16
2.1.	ALERGIJA.....	16
2.1.1	Uzroci alergija.....	16
2.1.2	Patofiziologija alergije.....	17
2.1.3	Alergija na hranu.....	19
2.1.4	Alergeni hrane biljnog porekla.....	20
2.1.5	Alergija na kivi.....	21
2.1.6	Aktinidin.....	22
2.1.7	Fitocistatin iz kivija.....	23
2.2	ODGOVOR BILJNE ĆELIJE NA STRES.....	24
2.2.1	Proteini povezani sa patogenezom, PR-proteini.....	25
2.2.2	Klasifikacija PR proteina.....	27
2.2.3	Inhibitori proteaza (PR-6 proteini).....	28
2.2.4	Biljni cistein proteazni inhibitori-fitocistatini.....	28
2.2.5	Endopeptidaze.....	28
2.2.6	PR proteini kao alergeni.....	29
2.3	TRETMAN ALERGIJSKIH OBOLJENJA.....	31
2.4	TEHNOLOGIJA REKOMBINANTNE DNK.....	33
2.4.1	Proizvodnja proteina u bakterijskim ćelijama.....	34
2.4.2	Proizvodnja proteina u ćelijama kvasca.....	35
2.4.3	Rekombinantni alergeni i dijagnostika alergije razdvojena na komponente.....	36
2.4.4	Primena dirigovane evolucije za proizvodnju hipoalergenih proteinskih terapeutika.....	39
3	CILJEVI.....	41
4	NAŠI RADOVI.....	42
4.1	KLONIRANJE I EKSPRESIJA _R CPI.....	42
4.1.1	Izolovanje DNK iz ploda kivija.....	42
4.1.2	Amplifikacija gena za rCPI lančanom reakcijom polimeraze.....	42
4.1.3	Kloniranje rCPI u pQE60 ekspresioni vektor.....	43
4.1.4	Optimizacija ekspresije rCPI.....	44
4.2	PREČIŠĆAVANJE PRIRODNOG I REKOMBINANTNOG CISTEIN PROTEAZNOG INHIBITORA (CPI).....	46
4.2.1	Izolovanje prirodnog CPI (nCPI).....	46
4.2.2	Prečišćavanje rCPI.....	46
4.3	KARAKTERIZACIJA _N CPI.....	48
4.3.1	Određivanje pI vrednosti nCPI.....	48

4.3.2	<i>N-terminalno sekvenciranje i masena analiza nCPI</i>	48
4.3.3	<i>Detekcija ugljeno-hidratnih ostataka na nCPI lektinima</i>	50
4.3.4	<i>IgE reaktivnost nCPI</i>	51
4.3.5	<i>IgG reaktivnost nCPI</i>	52
4.3.6	<i>Određivanje tkivne lokalizacije nCPI u plodu kivija</i>	53
4.3.7	<i>Određivanje inhibitorne sposobnosti nCPI</i>	54
4.3.8	<i>In vitro antibakterijska aktivnost nCPI</i>	55
4.3.9	<i>In vitro i in vivo antifungalna aktivnost nCPI</i>	57
4.4	KARAKTERIZACIJA_R CPI	61
4.4.1	<i>Određivanje pI vrednosti rCPI</i>	61
4.4.2	<i>N-terminalno sekvenciranje i masena analiza rCPI</i>	61
4.4.3	<i>CD spektroskopska analiza rCPI</i>	62
4.4.4	<i>Predviđanje trodimenzionalne strukture rCPI</i>	63
4.4.5	<i>IgE reaktivnost rCPI</i>	64
4.4.6	<i>IgG reaktivnost rCPI</i>	64
4.4.7	<i>Određivanje inhibitorne sposobnosti rCPI</i>	66
4.4.8	<i>In vitro antifungalna aktivnost rCPI</i>	67
4.5	KREIRANJE, SELEKCIJA I PROIZVODNJA MUTANATA AKTINIDINA	69
4.5.1	<i>Amplifikacija gena za aktinidin lančanom reakcijom polimeraze</i>	69
4.5.2	<i>Kloniranje aktinidina u pCTCON2 ekspresioni vektor</i>	69
4.5.3	<i>Diverzifikacija gena za aktinidin lančanom reakcijom polimeraze sklone greškama</i>	71
4.5.4	<i>Kloniranje diverzifikovanog gena za aktinidin u pCTCON2 vektor</i>	73
4.5.5	<i>Sortiranje biblioteka aktinidina protočnom citometrijom</i>	73
4.5.6	<i>Analiza sortiranih biblioteka imunohemijskim metodama</i>	74
4.5.7	<i>Određivanje sekvence mutanta i molekulsko modelovanje</i>	77
5	DISKUSIJA	79
6	ZAKLJUČAK	85
7	EKSPERIMENTALNI DEO	87
7.1	KLONIRANJE I EKSPRESIJA REKOMBINANTNOG FITOCISTATINA	87
7.1.1	<i>Priprema tečnih podloga i antibiotika</i>	87
7.1.2	<i>Izolovanje dezoksiribonukleinske kiselina (DNK) iz ploda zelenog kivija</i>	89
7.1.3	<i>Amplifikacija gena za fitocistatin lančanom reakcijom polimeraze (PCR - engl. polymerase chain reaction)</i>	90
7.1.4	<i>Prečišćavanje PCR proizvoda</i>	91
7.1.5	<i>Digestija PCR proizvoda i pQE60 vektora</i>	92
7.1.6	<i>Ligacija prečišćenog PRC proizvoda u pQE60 vektor</i>	92
7.1.7	<i>Transformacija DH5α ćelija ligacionim proizvodom</i>	93

7.1.8	<i>Izolovanje pQE60-fitocistatin konstrukta iz DH5a ćelija</i>	94
7.1.9	<i>Digestija izolovanih pQE60-fitocistatin konstrukata</i>	95
7.1.10	<i>Sekvenciranje konstrukata pQE60-fitocistatin</i>	95
7.1.11	<i>Transformacija BL21 RIPL ćelija pQE60-fitocistatin konstruktom</i>	96
7.1.12	<i>Optimizacija ekspresija rekombinantnog fitocistatina u BL 21 RIPL ćelijama</i>	96
7.1.13	<i>Ekspresija rekombinantno fitocistatina u BL 21 RIPL ćelijama</i>	97
7.2	ELEKTROFORETSKE TEHNIKE	98
7.2.1	<i>Agarozna gel elektroforeza</i>	98
7.2.2	<i>Natrijum dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS PAGE)</i>	99
7.2.3	<i>Izoelektričnofokusiranje (IEF)</i>	104
7.2.4	<i>Dvodimenziona elektroforeza</i>	105
7.3	PREČIŠĆAVANJE PRIRODNOG I REKOMBINANTNOG CISTEIN PROTEAZNOG INHIBITORA (CPI).....	107
7.3.1	<i>Izolovanje nCPI papain afinitetnom hromatografijom</i>	107
7.3.2	<i>Izolovanje rCPI metal afinitetnom hromatografijom</i>	109
7.4	IMUNOHEMIJSKE TEHNIKE.....	111
7.4.1	<i>Imunoblot</i>	111
7.4.2	<i>Elisa testovi</i>	116
7.5	ANALITIČKE TEHNIKE	119
7.5.1	<i>Određivanje koncentracije ukupnih proteina</i>	119
7.5.2	<i>Bradford-ov metod za određivanje koncentracije proteina</i>	120
7.5.3	<i>Određivanje koncentracije prečišćenih proteina</i>	121
7.5.4	<i>N-terminalno sekvenciranje nCPI i rCPI</i>	121
7.5.5	<i>Masena analiza nCPI</i>	122
7.5.6	<i>Masena analiza rCPI</i>	122
7.5.7	<i>Hromatografske tehnike</i>	123
7.6	FUNKCIONALNI TESTOVI.....	125
7.6.1	<i>Određivanje inhibitorne aktivnosti CPI</i>	125
7.6.2	<i>Test aktivacije bazofila</i>	125
7.6.3	<i>Kožne probe na pacijentima alergičnim na kivi</i>	127
7.6.4	<i>In vitro antifungalna aktivnost nCPI i rCPI</i>	127
7.6.5	<i>Uticaj nCPI na klijanje fungalnih konidija</i>	128
7.6.6	<i>In vivo antifungalna aktivnost nCPI-testovi patogenosti na voću i povrću</i>	129
7.6.7	<i>Određivanje inhibitorne aktivnosti nCPI prema unutarćelijskim i vanćelijskim proteazama gljiva A. radicina i B. cinerea</i>	130
7.6.8	<i>In vitro antibakterijska aktivnost nCPI</i>	131
7.6.9	<i>Određivanje inhibitorne aktivnosti nCPI prema unutarćelijskim i vanćelijskim proteazama bakterija A. tumefaciens LBA 4404, B. cepacia ATCC 2159, i E. carotovora</i>	131
7.7	STRUKTURNI TESTOVI.....	133
7.7.1	<i>Cirkularni dihiroizam (CD)</i>	133

7.7.2	<i>Predviđanje trodimenzionalne strukture nCPI i rCPI.....</i>	133
7.8	KREIRANJE, SELEKCIJA I PROIZVODNJA HIPOALERGENIH MUTANATA AKTINIDINA GLAVNOG ALERGENA KIVIJA	134
7.8.1	<i>Priprema rastvora i podloga</i>	134
7.8.2	<i>Kloniranje gena za aktinidin u pQE9</i>	137
7.8.3	<i>Amplifikacija gena za aktinidin</i>	137
7.8.4	<i>Kloniranje gena za aktinidin u pCTCON2 vektor.....</i>	139
7.8.5	<i>Transformacija DH5a ćelija ligacionim proizvodom.....</i>	140
7.8.6	<i>Sekvenciranje konstrukata pCTCON2-aktinidin.....</i>	140
7.8.7	<i>Diverzifikacija gena za aktinidin</i>	140
7.8.8	<i>Kloniranje biblioteka diverzifikovanog gena za aktinidin u pCTCON2 vektor</i>	142
7.8.9	<i>Transformacija ćelija kvasca (EBY 100) ligacionim proizvodom</i>	142
7.8.10	<i>Ekspresija rekombinantnog aktinidina i njegovih mutantata</i>	143
7.8.11	<i>Analiza i razdvajanje biblioteka mutanata aktinidina upotrebom protočne citometrije... 143</i>	
7.8.12	<i>Imunohemijska analiza aktinidina i biblioteka mutanata aktinidina.....</i>	144
7.8.13	<i>Izolovanje plazmida iz ćelija kvasca.....</i>	145
7.9	SERUMI	147
7.9.1	<i>Dobijanje zečjih antiseruma</i>	147
7.9.2	<i>Humani serumi</i>	147
8	LITERATURA.....	148
	PRILOG	155

Skraćenice

AAL - Aleuria aurantia lektin

ABTS - 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazoline-6-sulphonska kiselina)

AP – alkalna fosfataza

APS - amonijum-persulfat

BAPNA - N- α -benzoil-DL-arginine-p-nitroanilide

bp - bazni par

BCIP - 5-bromo-4-hloro-indolil fosfat

BFP - bromfenol plavo

BSA (*Bovine Serum Albumin*) - goveđi serum albumin

CB (*coating buffer*) – pufer za kuplovanje

CRD – dijagnostika alergije razdvojena na komponente

CRIT – imunoterapija alergije razdvojena na komponente

CBB - *Comasie Brilliant Blue*

Con A – konkanavalin A

CPI – cistein proteazni inhibitor

DMSO – dimetil-sulfoksid

DTT - di-tiotreitol

EDTA – etilendiamin-tetrasirćetna kiselina

FITC – fluorescein izotiocijanat

HRPO – peroksidaza iz rena

IFN γ – interferon γ

Ig – imunoglobulin

LPS - lipopolisaharid

LTP – protein za prenos lipida

MW – molekulska masa (*engl.* Molecular weight)

NBT - 4-nitroblue tetrazolium

NC membrana – nitrocelulozna membrana

OD – optička gustina

PBS – fosfatom puferisan fiziološki rastvor

PCR – lančana reakcija polimeraze (*engl.* Polymerase chain reaction)

PDA – krompir dekstrozni agar

PE - fikoeritrin

PEG – polietilenglikol

PMSF – fenilmetilsulfonil fluorid

PVPP - polivinilpolipirolidon

rBanLec – rekombinantni lektin banane

st – sobna temperatura

TNF- α – α faktor nekroze tumora

TCA – trihlor sirćetna kiselina

TCR - T ćelijski receptor

TLP – taumatinu sličan protein

TEMED- N,N,N',N'-tetrametiletlen-1,2-diamin

TFA – trifluorsirćetna kiselina

1 Uvod

Alergija ili atopija predstavlja preosetljivost imunog sistema na bezopasne čestice normalno prisutne u okolini. Supstance koje izazivaju alergijske reakcije nazivaju se alergeni. Alergija predstavlja jednu od četiri tipa preosetljivosti imunog sistema i naziva se tip I (rana) preosetljivost. Karakteristika alergijskih reakcija je preterana aktivacija mastocita i bazofila koje je posredovana imunoglobulinom E (IgE) što dovodi do spektra simptoma koji variraju od neprijatnih do opasnih po život [1]. Alergijske reakcije na hranu predstavljaju ozbiljan zdravstveni problem. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije smatra se da danas svaki četvrti čovek na planeti boluje od nekog tipa alergije, a predviđanja govore da će se u budućnosti taj broj povećavati. Iz tog razloga su alergije na polene trava i drveća, i od skoro alergije na hranu, dobile na značaju u okviru izučavanja u oblasti imunologije.

Kliničke reakcije na hranu koje uključuju kožne promene, gastrointestinalne i/ili respiratorne poremećaje, kao i sistemsku anafilaktičku reakciju [2] registruju se kod 8 % dece i 2 % odraslih. Alergije na hranu mogu da se jave kao izolovane reakcije (alergije na voće, ribu, mleko...) ili kao sekundarne reakcije nakon senzitivacije na polen (OAS – *engl.* oral-allergy syndrome) ili lateks (*engl.* latex-fruit syndrome).

Godine 1981. prvi put je dokumentovana IgE-posredovana alergijska reakcija na kivi (*Actinidia chinensis*) [3]. Ozbiljnost kliničkih simptoma do kojih alergijska reakcija na kivi može dovesti, naročito kod dece (od lokalnih simptoma ograničenih na oralnu mukozu do jakih anafilaktičkih reakcija) opravdava veliko interesovanje naučne javnosti za alergijsku reakciju na kivi u poslednjih dvadeset godina.

Alergijska reakcija na kivi je često udružena sa hiperosetljivošću na ostalo voće, lateks, kao i polene različitih trava i drveća ali može se javiti i kao izolovana [4]. U ekstraktu kivija do sada je detektovano 11 IgE vezujućih komponenti molekulske mase od 11-64 kDa [5], ali je detaljna biohemijska karakterizacija odrađena samo na dva glavna alergena. To su: aktinidin i protein sličan taumatinu TLP (*engl.* Thaumatin like protein) Aktinidin (Act d 1) [6] je protein molekulske mase 30 kDa, koji pripada familiji biljnih proteaza, dok TLP (Act d 2) [7], ima molekulsku mase od 24 kDa i pripada familiji proteina povezanih sa patogeneom (PR proteina *engl.* Pathogenesis related proteins).

Godine 2004. fitocistatin, protein molekulske mase 11 kDa, identifikovan je u plodu zlatnog i zelenog kivija i prijavljen je kao alergen - Act d 4 [4]. Act d 4 pripada superfamiliji inhibitora papainu sličnih cistein proteaza. Postoje tri izoforme fitocistatina od kojih je okarakterisana samo najzastupljenija, CPI1 [8].

Ekstrakt kivija, kao i drugi voćni ekstrakti koji se koriste u dijagnostici alergija predstavljaju kompleksne smeše velikog broja proteina, proteolitičkih enzima, ugljenih hidrata i malih molekula od čega mali broj njih ima sposobnost vezivanja IgE-a. Usled varijacija u količini alergijski aktivnih komponenti [9] u ekstraktima koji se koriste, dijagnostika alergija može oskudevati u osetljivosti. Zamena alergijskih ekstrakata precizno okarakterisanim relevantnim alergenima kao i njihovim rekombinantnim kopijama u *in vitro* dijagnostici alergija naziva se dijagnostika razdvojena na komponente (CRD - *engl.* component-resolved diagnostics). CRD predstavlja jedan od glavnih zadataka na polju alergološke dijagnostike danas [10].

Jedan od ciljeva proizvodnje i precizne karakterizacije rekombinantnih alergena je njihova primena u *in vitro* dijagnostici. Time se izbegavaju i nepogodnosti alergijskih ekstrakata kao što su: razlika od bača do bača, razlika u zastupljenosti pojedinačnih alergena u ekstraktu, uticaj izvora sirovog materijala i načina pripreme ekstrakta i za biljne alergene izvore varijacije u proteinskom sastavu koje zavise od doba godine u kome se sakuplja [11, 12].

Fitocistatin (CPI, *engl.* cistein protease inhibitor) je do sada okarakterisan kao IgE vezujuća komponenta ekstrakta ploda kivija [4]. Karakterizacija CPI pored fundamentalnog značaja u regulaciji životnog ciklusa biljne ćelije, važna je i za ispitivanje alergenosti i potencijalnu primenu.

Alergen specifična imunoterapija trenutno predstavlja jedini tretman alergijskih oboljenja koji ne podrazumeva samo tretman simptoma. Standardni imunoterapijski pristup alergije na hranu, koji uključuje vakcinaciju alergenim ekstraktima, nije prihvatljiv zbog visokog rizika [13]. Upotreba rekombinantno proizvedenih hipoalergena (molekula sa smanjenim IgE vezivanjem) predstavlja novi i veoma obećavajući koncept koji ima potencijal da izmeni trenutne protokole u imunoterapiji alergije na hranu [14]. Ovakav pristup se naziva terapija alergije razdvojena na

komponentne (CRIT *engl.* Component resolved immunotherapy) [15]. CRIT poseduje potencijal da izmeni trenutne protokole u imunoterapiji alergije na hranu.

Kreiranjem biblioteka rekombinantnih alergena (u ovom slučaju aktinidina, Act d 1) mogu da se dobiju molekuli koji imaju izmenjenu površinsku topografiju čime je smanjeno vezivanje IgE, ali zadržan strukturalni šablon uvijanja polipeptidne kičme. Na ovaj način se zadržavaju strukture sposobne da generišu protektivni IgG odgovor koji bi mogao da kompetira vezivanju IgE antitela za prirodni alergen [14].

2 Opšti deo

2.1. Alergija

Alergija je preosetljivost imunog sistema poznata i kao atopija. Alergijske reakcije dešavaju se na fakultativno bezopasne čestice normalno prisutne u okolini. Supstance koje izazivaju alergijske reakcije nazivaju se alergeni. Alergijske reakcije su stečene, predvidljive i brze. Alergija predstavlja jednu od četiri tipa preosetljivosti imunog sistema i naziva se tip I (rana) preosetljivost. Karakteristika alergijskih reakcija je povišen nivo aktivacije mastocita i bazofila koji je posredovan imunoglobulinom E (IgE) što uzrokuje spektar simptoma koji variraju od neprijatnih do opasnih po život [16].

Najčešći simptomi alergije su crvenilo i svrab očiju, curenje nosa, ekcem, koprivnjača ili astmatični napad. Kod nekih osoba moguća je burna reakcija na inhalatorne i/ili nutritivne alergene koja se naziva anafilaksa [16]. Anafilaksa je opasna po život i u slučaju neblagovremene reakcije može rezultovati smrću.

2.1.1 Uzroci alergija

Faktori rizika za razvoj alergije mogu se svrstati u dve kategorije, lične i faktore okoline [17]. Lični faktori rizika podrazumevaju nasledne, rasne i polne, pri čemu nasledni faktori igraju najveću ulogu. Četiri glavna faktora okoline su promene u izlaganju nekim infektivnim bolestima u ranom detinjstvu, zagađenje, visok nivo alergena u neposrednoj okolini i promene u načinu ishrane [18].

Postojanje genetičke predispozicije za razvoj alergijskih bolesti pokazano je u nekoliko studija. Kod jednojajčanih blizanaca verovatnoća da će imati iste alergije procenjuje se na čak 70%, dok je taj procenat kod dvojajčanih blizanaca manji i iznosi 40% [19]. Potomstvo osoba koje pate od alergija takođe ima veće šanse da i samo bude alergično i to sa većim stepenom alergije nego potomstvo osoba koje nisu alergične. Genetskim analizama identifikovani su lokusi na hromozomima odgovorni za genetsku predispoziciju prema razvoju alergijskih oboljenja čime je pokazano da razvoj alergije ne zavisi od tipa alergena uzročnika već od modifikacije imunog odgovora usled prisustva određenih formi citokina kod dece i roditelja [20, 21]. Pokazano je i da razvoj

astme zavisi od rase (belci, afrikanci, azijati, hispano), usled prisustva različitih genskih lokusa [22]. Rizik razvoja alergijskih oboljenja se smanjuje sa godinama, tako da je nivo IgE antitela najviši kod dece i pada između 10. i 30. godine [23], a alergije su češće kod osoba muškog nego kod osoba ženskog pola [20].

Uticaj okoline na razvoj alergijskih oboljenja nije u potpunosti razjašnjen, ali je primećeno da su alergije češće u razvijenim industrijalizovanim nego u poljoprivrednim zemljama, kao i u urbanim u poređenju sa ruralnim sredinama [24]. Na osnovu ovih zapažanja postulirana je tzv. higijenska hipoteza koja pretpostavlja da izlaganje mikroorganizmima – bakterijama i virusima, posebno tokom ranog detinjstva, doprinosi smanjenju rizika za razvoj alergija [24].

Izlaganje endotoksinu smanjuje nivo alergijske astme kod dece [25, 26], tako što menja nivo inflamatornih i regulatornih citokina (TNF- α , IFN γ , interleukina 10 i interleukina 12) [27]. S druge strane, nekoliko studija ukazuje na kontraverznu ulogu endotoksina u razvoju i održavanju alergijskih oboljenja. Dok visoke doze endotoksina (LPS – *engl.* lipopolysaccharide) uglavnom imaju protektivnu ulogu, pokazano je da LPS prisutan u manjim dozama pospešuje prethodno uspostavljen T_H2 imuni odgovor [28].

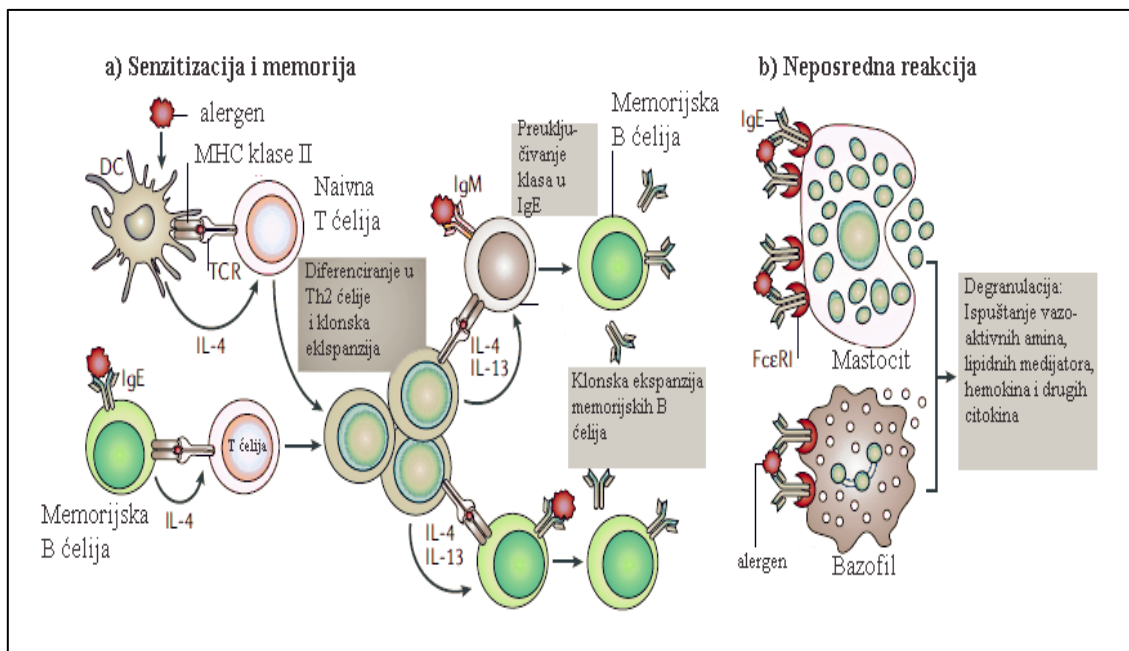
Paraziti koji napadaju intestinalni trakt (npr. intestinalni crvi) suprimiraju imuni odgovor sprečavajući organizam da ih napadne [29, 30], na osnovu čega neki naučnici pretpostavljaju da je koevolucija parazita i ljudskog imunog sistema dovela do toga da u odsustvu parazita imuni sistem reaguje preosetljivo [30].

2.1.2 Patofiziologija alergije

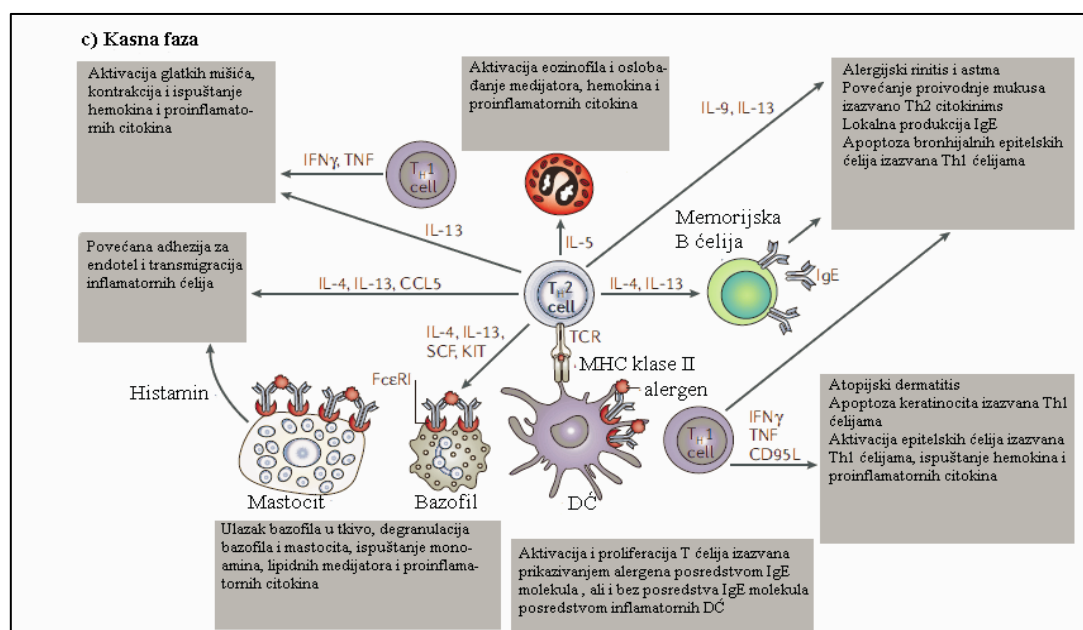
Alergijska reakcija započinje procesom senzitivacije. Proizvodnja IgE započinje u procesu senzitivacije, najčešće tokom prvog izlaganja organizma alergenom izvoru (Slika 2.1A) za šta su u slučaju respiratornih alergija dovoljne nanogramske količine alergena. Alergeni bivaju fagocitovani od strane antigen-prikazujućih ćelija (dendritske ćelije, B ćelije) i njihovi fragmenti (T ćelijski epitopi) se prikazuju naivnim T ćelijama u kontekstu MHC klase II. Diferencijacija naivnih CD4⁺ T ćelija u T pomoćničke ćelije T_H2 fenotipa koja se odigrava kao posledica mikrookoline okolnog tkiva praćena je klonskom ekspanzijom aktiviranih T_H2 ćelija. T ćelije koje pripadaju ovoj T_H2 podgrupi proizvode T_H2 specifične citokine (IL4, IL13) koji deluju na alergen-specifične B

ćelijske klonove u procesu preključivanja klasa imunoglobulina u pravcu nastanka IgE-a [31]. Tokom i nakon proces senzitivacije, B ćelije kod alergičnih osoba proizvode alergenspecifična antitela klase E. Kod nealergičnih individua može se detektovati nizak nivo alergenspecifičnih IgG molekula [32].

Neposredna reakcija (slika 2.1b) na prisustvo alergena pri svakom narednom kontaktu posledica je prisustva alergenspecifičnih memorijskih B i Th2 klonova diferenciranih u procesu senzitivacije. Iako je vreme života IgE antitela u cirkulaciji svega nekoliko sati, vezivanje ovog antitela za receptore visokog afiniteta (FcεRI) eksprimirane na površini krvnih bazofila ili tkivnih mastocita produžava mu vreme života na nekoliko nedelja [34]. Vezivanje alergena za IgE na mastocitima ili bazofilima vodi do pokretanja signalne kaskade koja rezultuje u trenutnom oslobađanju vazoaktivnih amina (uglavnom histamina), lipidnih medijatora (prostaglandina i leukotrijena), hemokina i drugih citokina karakterističnih za ranu fazu alergijske reakcije. IgE se takođe vezuje i za FcεRI na površini dendritskih ćelija i monocita, kao i za nisko afinitetni receptor za IgE, FcεRII (CD23) na površini B-ćelija čime se povećava fagocitoza i prikazivanje alergena CD4⁺ ćelijama [1].



Slika 2. 1 A) Senzitivacija i memorija B) Neposredna reakcija. Objašnjenje u tekstu. TCR T-ćelijski receptor; DC – dendrićka ćelija [33]



Slika 2. 2. Reakcija kasne faze. Objasnjenje je dato u tekstu. SCF Stem cell faktor takode poznat i kao KIT ligand; CD 95L CD 95 ligand; TCR T ćelijski receptor [33]

Nakon akutne (rane) faze često dolazi do reakcije kasne faze (slika 2.2.). Ova reakcija je posledica migracije neutrofila, limfocita, eozinofila i makrofaga na inicijalno mesto reakcije. Kasna faza se javlja od 2 do 24 h nakon početne reakcije [18].

Citokini koje mastociti proizvode doprinose ovim dugoročnijim efektima. Reakcija kasne faze je tipična za astmu [1].

2.1.3 Alergija na hranu

Alergija na hranu javlja se kako kod dece (6-8 %) tako i kod odraslih ljudi (1-2 %) [2]. Najznačajniji uzročnici alergija na hranu su jaja, mleko, morski mekušci, pšenica, kikiriki, soja i koštunjavo voće [35].

Proteini hrane dospevaju u čovekov organizam preko gastrointestinalnog trakta. Ukoliko se na unos određene hrane (npr. mleko, voće) javlja alergijski odgovor, kandidate za alergene treba tražiti među onim proteinima iz punog ekstrakta hrane koji su otporni na proteolizu enzimima želudca i pankreasa (bar delimično). Samo „čitavi“ proteini ili, eventualno, njihovi veći fragmenti mogu biti fagocitirani od strane antigen-prikazujućih ćelija i izazvati imunološki odgovor koji za posledicu u sledećem koraku ima povezivanje IgE na mastocitima i bazofilima [36].

Osobine oralno unetih antigena (alergena) mogu se razlikovati od osobina antigena parenteralno unetih u organizam. Oralno uneti antigeni prolaze kroz gastrointestinalni trakt, što je praćeno apsorpcijom u nivou mukoze gastrointestinalnog trakta i modifikacijom njihove strukture dejstvom želudačnih i pankreasnih enzima, niske pH vrednosti u želucu, žučnih soli i sl. te će njihova imunogenost zavisiti od toga jesu li u i u kojoj meri podlegli digestiji.

2.1.4 Alergeni hrane biljnog porekla

Alergeni hrane biljnog porekla mogu se, na osnovu razlike u imunološkim mehanizmima, kliničkim simptomima i strukturi podeliti na dve klase: klasu I ili kompletne alergene i klasu II ili nekompletne. Kod alergena klase I do procesa senzitivacije dolazi u gastrointestinalnom traktu. Karakteristično za ovu klasu alergena je da ne podležu digestiji unutar gastrointestinalnog trakta [37]. Ova vrsta alergije na hranu je retka kod odraslih, najčešće pogađa decu i može se smatrati jednom od prvih manifestacija atopičnog sindroma [38].

Klasa II alergena hrane uglavnom izaziva simptome kod odraslih i može se smatrati posledicom senzitivacije na inhalatorne alergene. Imunološka osnova reakcije na ove alergene je ukrštena reaktivnost posredovana IgE-om. U zavisnosti od ponašanja ovih alergena tokom procesa varenja simptomi koje izazivaju mogu da variraju od oralnog alergijskog sindroma [39] do anafilaktičke reakcije [40].

Većina alergena biljnog porekla može se svrtati u nekoliko proteinskih familija i superfamilija. Mnogi alergeni pripadaju kupinskoj superfamiliji (7S i 11S rezervni proteini semenja) ili prolaminskoj superfamiliji (2S albumini, nespecifični proteini za prenos lipida [nsLTP *engl.* nonspecific lipid transfer proteins], α -amilaza, prolamin itd.) Proteini povezani sa patogenezom (PR proteini - *engl.* Pathogenesis related proteins) predstavljaju heterogenu grupu proteina. Mogu se podeliti u 17 različitih proteinskih familija i uključeni su odbranu biljke od patogena ili nepovoljnih vremenskih uslova [41]. Mnogi od alergena hrane slični su PR proteinima [42]. PR proteini mogu se smatrati uzročnicima ukrštene reaktivnosti između polena i voća [43] i/ili lateksa i voća [44].

2.1.5 Alergija na kivi



Slika 2. 3. Plod zelenog kivija *Actinidia deliciosa*, Liang, Ferguson

Godine 1981. prvi put je dokumentovana IgE-posredovana alergijska reakcija na kivi [3]. Sve veća potražnja za kivijem na svetskoj trpezi, kao i ozbiljnost simptoma do kojih alergijska reakcija na kivi može dovesti naročito kod male dece, opravdava sve veći broj radova koji se u poslednje dve decenije bave detekcijom, izolovanjem i karakterizacijom alergena kivija.

U literaturi se alergijske reakcije na kivi često opisuju kao blage, mada ima i ozbiljnih slučajeva [45]. Spektar reakcija varira od kontaktnog dermatitisa [5], preko oralnog alergijskog sindroma [5, 46] do reakcija opasnih po život [5, 45].

Iako je u ekstraktu kivija prijavljeno postojanje bar 11 IgE vezujućih proteina molekulske mase između 12 i 64 kDa [4] (Tabela 2.1.), do danas su izolovana i biohemijски okarakterisana samo dva glavna alergena kivija: aktinidin (Act d 1; molekulske mase od 30 kD iz grupe biljnih cistein-proteaza) [6] i protein sličan taumatinu TLP (Act d 2; molekulske mase 24 kDa) [7].

Cistatin je 2004. godine prijavljen kao alergen Act d 4 [4]. Izolovan je kao IgE vezujuća komponenta iz ekstrakata zlatnog i zelenog kivija [4].

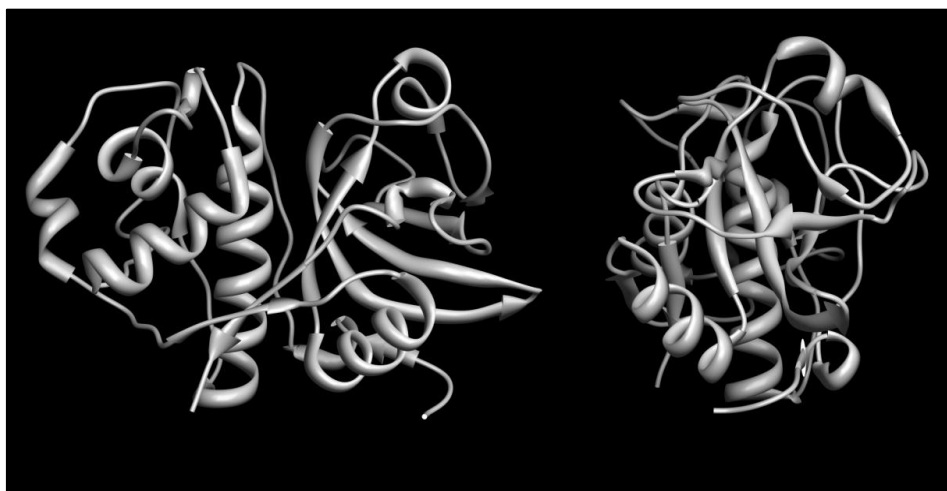
Kao i u slučaju drugih alergija na hranu, izbacivanje kivija iz ishrane je metoda izbora u lečenju. Potreba za standardizacijom ekstrakta kivija je očigledna. S obzirom na to da alergenost voća tokom sazrevanja zavisi od ekspresije IgE vezujućih proteina [11], pri standardizaciji ekstrakta kivija trebalo bi uzeti u obzir i fazu razvoja ploda. Plodovi kivija beru se u kasnu jesen u Mediteranskoj oblasti, tokom septembra i oktobra voće nije jestivo jer je plod tvrd, kiseo i bez arome. Plod kivija je najbolji za upotrebu tek u novembru i decembru. Faktor procenta alergena u odnosu na ukupnu koncentraciju proteina, kao i odnos različitih izoformi istog alergena, takođe treba uzeti u obzir jer su podložne promenama tokom sazrevanja ploda [11].

Tabela 2.1. Alergeni kivija

Alergen	Biohemijski naziv	MW (SDS-PAGE)
Act d 1 [47]	Cisteine proteaza (aktinidin)	30 kDa
Act d 2[47]	Protein sličan taumatinu	24 kDa
Act d 3	/	40 kDa
Act d 4 [4]	Fitocistatin	11 kDa
Act d 5 [48]	Kivelin	26 kDa
Act d 6	Inhibitor pektin metilesteraze	18 kDa
Act d 7	Pectin metilesteraza	50 kDa
Act d 8	Protein povezan sa patogenezom PR-10	17 kDa
Act d 9	Profilin	14 kDa
Act d 10	Protein za prenos lipida	10 kDa
Act d 11[49]	Protein povezan sa sazrevanjem	17 kDa

2.1.6 Aktinidin

Aktinidin (sinonim aktinidain, EC 3.4.22.14) je cistein proteaza od 23,8 kDa. Sintetiše se kao preproprotein, sa N- i C-terminalnim propeptidima i signalnom sekvencom koja ga upućuje na dalju obradu u endoplazmatični retikulum. Verovatno je da se sintetiše kao zimogen i da se obrađuje do aktivne forme nakon sekrecije ili sekvestracije u ćeliji. Pored jako proteinske detaljne karakterizacije fiziološka funkcija aktinidina nije još uvek poznata [50]. Smatra se da može da služi kao rezervni protein, poput patatina [51], ili da učestvuje u odbrani biljke od insekata i gljiva [52].



Slika 2. 4. Trodimenzionalna struktura aktinidina (pogled spreda i sa strane), određena na 1,86 Å [53].

Aktinidin predstavlja 50 % ukupnog proteinskog sadržaja ekstrakta kivija i smatra se molekularnim markerom alergije na kivi kod monosenzitiziranih pacijenata [6]. U zelenom kiviju postoje i kisela i bazna forma aktinidina [54]. Sadržaj i alergeni potencijal aktinidina se povećava sa zrenjem voća [11], kao i usled tretmana etilenom [55].

2.1.7 Fitocistatin iz kivija

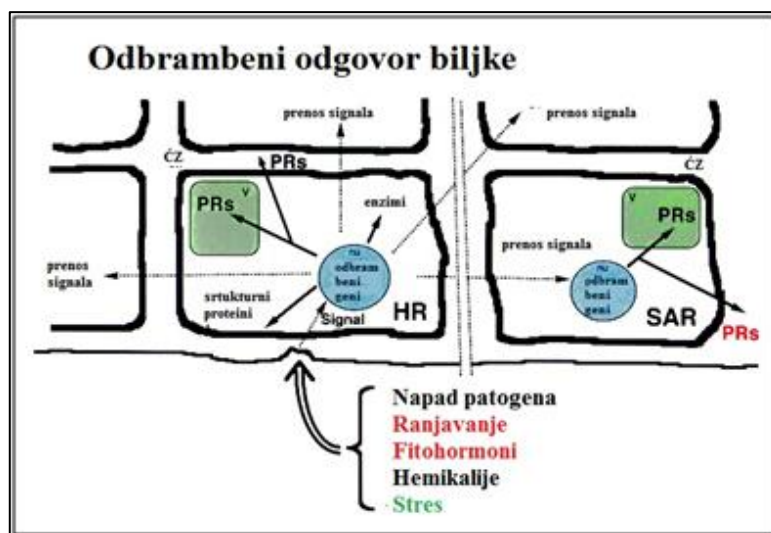
Fitocistatin je inhibitor cistein proteaza molekulske mase oko 11 kDa. Prisutan u korteksu i semenu i javlja se u četiri izoforme, tri poreklom iz korteksa i jedne iz semena. Najdominantnija izoforma u korteksu je CPI1 [8]. Ovaj protein se sintetiše kao preprotein. Prvih 26 aminokiselina se odseca da bi nastao zreo protein. CPI poseduje sposobnost da inhibira papainu slične cistein proteaze kao što su papain, himopapain, bromelain, ficin, humane kathepsine B, H i L, aktinidin i endopeptidazu 1 iz kućnih grinja [8].

Fitocistatin je 2004. godine prijavljen kao alergeni Act d 4 [4]. Opisan je kao 11 kDa IgE vezujuća komponenta iz ekstrakata zlatnog i zelenog kivija [4]. Pokazano je da na njega *in vitro* reaguju kako pacijenti monosenzitizirani na kivi, tako i pacijenti koji pored kivija reaguju na polene i lateks [56, 57].

2.2 Odgovor biljne ćelije na stres

U viševjekovnoj borbi sa patogenima, biljke su razvile mnoštvo komplikovanih mehanizama odbrane. Istovremeno, isti ti patogeni razvili su načine da savladaju odbrambene mehanizme biljaka [58]. Tokom vremena, koevolucija između patogena i njihovih domaćina dovela je do pojave kompleksnih interakcija [59] koje se mogu posmatrati kao otvoreni rat u kome proteini čine jedno od glavnih oružja koje koriste obe strane [60].

Kutikula i ćelijski zid su fizičke barijere koje se često smatraju prvom linijom odbrane od prodiranja patogena kod biljaka. Ove strukture takođe mogu da predstavljaju izvor aktivirajućih signala kako za nadiruće patogene, tako i za samu biljku [61].



Slika 2. 5. Odbrambeni odgovor biljke na napad patogena, ranjavanje, fitohormone, hemikalije i stres. Objašnjenje je dato u tekstu. HR- "hiper-osećljivi" odgovor, SAR- sistemski stečena rezistencija, PR- proteini povezani sa patogenezom, ČZ- ćelijski zid, V-vakuola, Nu-Jedro.

U odnosima domaćin-patogen koji su nekompatibilni (ne dolazi do značajne infekcije biljnog tkiva datim patogenom), šteta koju patogen nanosi biljnom tkivu je ograničena usled prisustva odbrambenog odgovora biljke (slika 2.5). Najveća efikasnost pokazana je kod "hiper-osećljivog" odgovora čija odlika je brza nekroza tkiva oko mesta infekcije. Ovakav odgovor posledica je koordinisanog i brzog metaboličkog odgovora na ulazak datog patogena [62]. Izmenjen fluks protona kroz membranu biljne ćelije, generisanje reaktivnih kiseoničnih vrsta, promena nivoa fosforilacije regulatornih proteina i aktivacija transkripcije dovode do ćelijske smrti, lokalne akumulacije fitoaleksina kao i

povećanja rigidnosti ćelijskog zida usled nagomilavanja lignina i suberina [63]. Pored ovoga, dolazi i do indukcije sinteze velikog broja proteina koji spadaju u grupu PR proteina. PR proteini su definisani kao proteini koje biljke sintetišu u odgovoru na patološke situacije [64]. Produkcija PR proteina nije samo lokalna i ograničena na mesto infekcije već se dešava sistemski i uključena je u sistemski stečenu rezistenciju (SAR - *engl.* systemic acquired resistance) na infekcije gljivama, bakterijama ili virusima. Indukcija ekspresije PR proteina pronađena je kod mnogih biljnih vrsta koje pripadaju različitim familijama [65] što potvrđuje njihovu ulogu u prilagođavanju na uslove biotičkog stresa.

2.2.1 Proteini povezani sa patogeneom, PR-proteini

Koncept PR proteina prvi put je uveden osamdesetih godina prošlog veka i koristio se da označi protein koji je sintetisan od strane ćelije domaćina kao odgovor na patološku situaciju uključujući viralne, fungalne ili bakterijske infekcije, parazitske napade od strane nematoda ili fitofagnih insekata kao i drugih životinjskih herbivora [66]. Smatralo se da abiotički stres i poremećaji ne indukuju sintezu PR proteina, iako su određeni neinfektivni uslovi (npr. toksinima indukovana nekroza ili hloroza) često okidač za proizvodnju određenih PR proteina [67]. U poslednje vreme pokazano je da kolonizacija ne-patogenim/korisnim gljivama i bakterijama može da indukuje sintezu PR proteina [68-70]. Glavni kriterijum po kome se neki protein može uvrstiti među PR proteine je da se eksprimira *de novo* tokom infekcije [64]. Prema ovoj definiciji, proteini koji se konstitutivno ekspimiraju u tkivima u malim ali detektabilnim količinama, a do čije indukcije dolazi tokom patoloških uslova ne smatraju se PR proteinima. Ova definicija bazirana je na eksperimentima koji su sedamdesetih godina prošlog veka rađeni na lišću duvana (*Nicotiana tabacum*) koji je hiper-osetljivo reagovao na mozaični virus duvana [71].

Prvobitno se smatralo da su PR proteini kiseli, niske molekulske mase, da su veoma otporni na proteolizu, stabilni na niskim pH vrednostima i da su lokalizovani u ekstracelularnom i intracelularnom prostoru listova. Nakon infekcije akumuliraju se u lišću i drugim organima i mogu da čine do 10 % ukupnih solubilnih proteina [72].

Termin PR-slični proteini koristio se da bi se opisali proteini homologni PR proteinima koji su prisutni u zdravom biljnom tkivu, koji se ekspimiraju tkivno-specifično tokom

razvoja. Ovi proteini, koji se ne sintetišu kao odgovor na prisustvo patogena su dominantno bazni i locirani unutar ćelije ili u vakuoli [64]. Međutim, kako su se otkrivali novi proteini postajalo je sve teže uspostaviti jasnu granicu između PR i PR-sličnih proteina. Primer ovoga su bazna hitinaza i glukanaza iz zrelog lišća duvana koje mogu da se eksprimiraju kontrolisano tokom razvoja ali i kao odgovor na infekciju [65]. Granica između PR proteina i PR-sličnih proteina dodatno je zamagljena otkrićima specifičnih PR proteina u zdravim biljnim tkivima, kao i otkrićem da se sinteza PR-sličnih proteina indukuje u uslovima infekcije. Suprotno početnim definicijama, mnogi autori su pod PR proteinima podrazumevali one čija sinteza je indukovana biotičkim stresom. Van Loon je uveo termin inducibilni odbrambeni proteini [73]. To su proteini koji se u zdravom tkivu najčešće ne mogu detektovati i čija je indukcija na proteinskom nivou pokazana nakon infekcije patogenom. Ovaj termin uključuje kako poznate PR proteine tako i one koju su do sada neklasifikovani ali koji zadovoljavaju zadati kriterijum. Termin inducibilni odbrambeni proteini ne uključuje proteine koji su prisutni u zdravom tkivu, a čija se ekspresija indukuje nakon mikrobne infekcije.

Indukcija ekspresije nekih proteina tokom mikrobne infekcije sugerise njihovu ulogu u odbrani biljke, ali je ne dokazuje [74]. Ovi proteini se najčešće posmatraju kao odbrambeni proteini čija uloga je u sprečavanju patogena ili ograničavanju širenja invazije. Njihova funkcija na inicijalnom mestu infekcije obično nije značajna ali ako su već prisutni u tkivu ili je njihova sinteza indukovana u okolnom tkivu koje nije inficirano mogu da pruže visok nivo zaštite [75].

Biljke sintetišu PR proteine i tokom normalnog razvoja ali i kao deo odbrane od raznih patogena. Za veliku grupu PR proteina pokazano je da se jako brzo sintetišu lokalno, na mestu infekcije ali i sistemski [76]. PR proteini se takođe indukuju u odgovoru na različite faktore iz okoline kao što su suša, salinitet, ranjavanje, teški metali i regulatori rasta biljke [77-79].

Kriterijumi za uključivanje nekog proteina među PR proteine su sledeći: (i) protein mora da bude indukovano patogenom u tkivu koje ga ne eksprimira u normalnim uslovima, (ii) mora se pokazati da do indukcije proteina dolazi u najmanje dve kombinacije patogen-domaćin ili ekspresija u slučaju samo jedne patogen-domaćin interakcije mora biti nezavisno potvrđena od strane dve različite laboratorije [41].

2.2.2 Klasifikacija PR proteina

U duvanu koji je hiper-osetljivo reagovao na napad patogena detektovane su proteinske frakcije nazvane I, II, III, IV i V na osnovu elektroforetske pokretljivosti [71]. Naknadno, ovi proteini su klasifikovani u pet grupa PR-1 do PR-5. Svaku od ovih klasa činile su dve potklase: (i) kisela, obično lokalizovana u ekstracelularnom prostoru i na čiju indukciju utiče salicilna kiselina i (ii) bazna, lokalizovana u vakuoli i na čiju indukciju utiče etilen ili jasmenska kiselina [80-84].

PR proteini su podeljeni u 17 familija po redosledu otkrivanja (Tabela 2.2.) [41]. Podela u familije izvršena je na osnovu sličnosti u sekvenci, seroloških i imunoloških reakcija i enzimske aktivnosti [64]. Različitim članovima iste familije dodeljena su slova na osnovu redosleda u kome su opisani. Funkcija mnogih PR proteina i danas je nepoznata.

Tabela 2. 2. Klasifikacija PR proteina

Familija	Predstavnik	Svojstva
PR-1	PR-1a iz duvana	Nepoznata
PR-2	PR-2 iz duvana	β -1,3-glukanaza
PR-3	P,Q iz duvana	Hitinaze tipa I,II,IV,VI,VII
PR-4	'R' iz duvana	Hitin vezujućí proteini
PR-5	S iz duvana	Taumatinu slični
PR-6	Inhibitor I iz paradajza	Inhibitori proteaza
PR-7	P69 iz paradajza	Endoproteinaze
PR-8	Hitinaza iz krastavca	Hitinaze tipa III
PR-9	Lignin sintetišuća peroksidaza iz duvana	Peroksidaza
PR-10	"PR1" iz peršuna	Ribonukleazi slična
PR-11	Hitinaza klase V iz duvana	Hitinaze tipa V
PR-12	Rs-AFR3 iz rotkve	Defenzin
PR-13	THI2.1 iz Arabidopsisa	Tionin
PR-14	LTP4 iz ječma	Protein za transport lipida
PR-15	OxOa (germin) iz ječma	Oksalat oksidaza
PR-16	OxOaLP iz ječma	Slični oksalat oksidazi
PR-17	PRp27 iz duvana	Nepoznata

2.2.3 Inhibitori proteaza (PR-6 proteini)

Klasa PR-6 proteina uključuje inhibitore metalo, aspartat, serin i cistein proteaza. Inhibitori serin proteaza, kao što su tripsin i himotripsin, su bifunkcionalni proteini jer mogu da inhibiraju i druge enzime kao što su amilaze [83]. Protein od 7,5 kDa, inhibitor tripsina i himotripsina izolovan je iz semena pasulja *Vicia faba* [85], dok je spormaninski-tip inhibitora tripsina izolovan iz semena biljke *Clausena lansium* [86].

2.2.4 Biljni cistein proteazni inhibitori-fitocistatini

Fitocistatini su inhibitori cistein proteaza i identifikovani su kod životinja [87, 88] i biljaka [89]. Biljni cistein proteazni inhibitori nazivaju se fitocistatini. Većina fitocistatina su mali proteini veličine od 10 do 16 kDa koji ne sadrže disulfidne mostove i dele homologiju sa familijom 2 animalnih cistatina. Fitocistatini su grupisani u posebnu subfamiliju cistatinske superfamilije. Prema Margis *et al.*, [88], uparivanjem (*engl.* alignment) i filogentskom analizom sekvenci 63 cistatina, od čega 32 fitocistatina pokazano je da se fitocistatini grupišu u posebnu evolutivnu granu što podržava njihovo odvajanje u posebnu cistatinsku familiju.

Postoje III tipa fitocistatina:

- tip I su molekuli od 12-16 kDa koji ne sadrže disulfidne mostove i inhibiraju papain i njemu slične cistein proteaze.
- tip II su molekuli od ~ 23 kDa koji poseduju karboksi terminalnu ekstenziju koja im omogućava da inhibiraju legumainu slične cistein proteaze.
- multicistatini 60-80 kDa koji sadrže nekoliko cistatinskih domena [88].

Uloga ovih molekula nije još uvek u potpunosti razjašnjena ali smatra se da pored regulacije aktivnosti endogenih cistein proteaza tokom sazrevanja i germinacije [90] doprinose i u odbrani biljke od patogena inhibirajući egzogene cistein proteaze te štite biljku od bakterija, gljiva, nematoda i insekata [91-94]. Pokazano je da transgene biljke koje preterano ekspimiraju fitocistatine pokazuju povećanu rezistenciju na insekte i nematode [95, 96].

2.2.5 Endopeptidaze

PR-7 familiju proteina sačinjavaju endoproteaze. Smatra se da utiču na razgradnju ćeliskog zida mikroba i da na taj način učestvuju u odbrani biljne ćelije [97]. Do sada je

najbolje opisana inducibilna substilizinu-slična proteaza od 69 kDa iz paradajza (*Lycopersicon esculentum*) koja se sintetise u odgovoru na napad patogenog virusnog tipa ali i kao odgovor na nematode i gljive [98].

2.2.6 PR proteini kao alergeni

Veliki broj do sada identifikovanih biljnih alergena može se svrstati u jednu od familija PR proteina. Do danas, biljni alergeni identifikovani su i na osnovu sličnosti u sekvenci svrstani u PR-2, 3, 4, 5, 8, 10 i 14 familiju proteina. Ovo su uglavnom mali proteini (molekulske mase 5-70 kDa), stabilni su na niskim pH i otporni na proteolizu. U tabeli 2.3 su navedeni PR-proteini koji su do sada identifikovani kao alergeni [42].

Tabela 2. 3. PR proteini koji su identifikovani kao alergeni

Familija	Oznaka	Izvor	Ime alergena
PR-2	β -1,3-Glukanaza	<i>Hevea Brasilensis</i> lateks, banana	Hev b 2, Mus a 5
PR-3	Hitinaza I klase	Avokado, <i>H. Brasilensis</i> lateks, kesten, banana	Pers a 1, Hev b 11, Cas a 5, Mus a 2
PR-4	Hitinaza	<i>H. Brasilensis</i> lateks	Hev b 6
PR-5	TLP	Trešnja, jabuka, kivi, paprika	Pru av 2, Mal d 2, Act d 2, Cap a 1
PR-8	Hitinaza III klase	<i>H. Brasilensis</i> lateks	Hevaine
PR-10	Nepoznata, Bet V1 homolozi	Breza, lešnik, kesten, jabuka trešnja, breskva, peršun	Bet v 1, Cor a 1, Cas s 1, Mal d 1, Pru p 1, PcPR-1
PR-14	LTP	Breskva, jabuka, trešnja, <i>H. Brasilensis</i> lateks, kesten, ambrozija, pelin, grožđe, hrast, kesten, maslina	Pru p 3, Mal d 3, Gly m 1, Pru av 3, Art v 3, Amb a 6, Par j 1,2, Cas s 8, Cor a 8, Vit v 1, Hev b 12, Ole e 7

Veliki broj biljnih alergena iz neke od familija PR proteina može se naći u raznim biljnim vrstama. Ovi proteini su odgovorni za ukrštenu reaktivnost između različitih alergeni izvora i predstavljaju molekulsku osnovu za sindrom ukrštene reaktivnosti između voća i polena i voća i lateksa [99, 100]. Poboljšanje znanja o metabolizmu

biljaka i odbrambenih mehanizama biljaka može da doprinesu boljem razumevanju alergijskih sindroma i poboljšanju dijagnostike alergija.

2.3 **Tretman alergijskih oboljenja**

Klasični klinički tretman alergije (farmakoterapija) podrazumeva upotrebu antihistaminika i kortikosteroida. Ovakav vid terapije, i pored visoke efikasnosti, bazira se isključivo na otklanjanju simptoma alergije dok na samu patogenezu bolesti nema nikakav uticaj [1].

Jedini, do sada opisan i primenjen tretman alergija koji utiče na uzroke bolesti je alergen-specifična imunoterapija. Prva primena ovakvog vida terapije vezuje se za pokušaj Noon-a i Freemana-a da izvrše desenzitizaciju pacijenta alergičnog na polen trava višestrukim subkutanom ubrizgavanjem ekstrakta polena trava daleke 1911. godine [33]. Imunološki mehanizmi uspešne alergen-specifične imunoterapije nisu u potpunosti poznati, ali se pretpostavlja da uključuju moduliranje aktivnosti T ćelija, B ćelija i antigen-prikazujućih ćelija [33].

Predloženi mehanizmi delovanja imunoterapije, postuliraju da u osnovi uspešne imunoterapije leži modulacija aktivnosti T ćelija bilo preko indukovanja stanja anergije i/ili kroz deleciju alergen-specifičnih T ćelijskih klonova, čime dolazi do promene dominantnog T_H2 u T_H1 funkcionalni fenotip [101, 102]. Formiranje regulatornih T ćelija smatra se jednom od imunoloških posledica imunoterapije [102]. Postoji i model delovanja imunoterapije koji predlaže stvaranje alergen-specifičnih blokirajućih antitela IgG klase. Proizvodnja blokirajućih antitela, pogotovu IgG4 potklase, sprečava vezivanje alergena za visokoafinitetne receptore na mastocitima i bazofilima čime se inhibira otpuštanje inflamatornih medijatora iz ovih ćelija, kao i IgE-om posredovano prikazivanje alergena T ćelijama, blokiranje reakcija kasne faze i dodatne proizvodnje alergen-specifičnog IgE-a [103, 104].

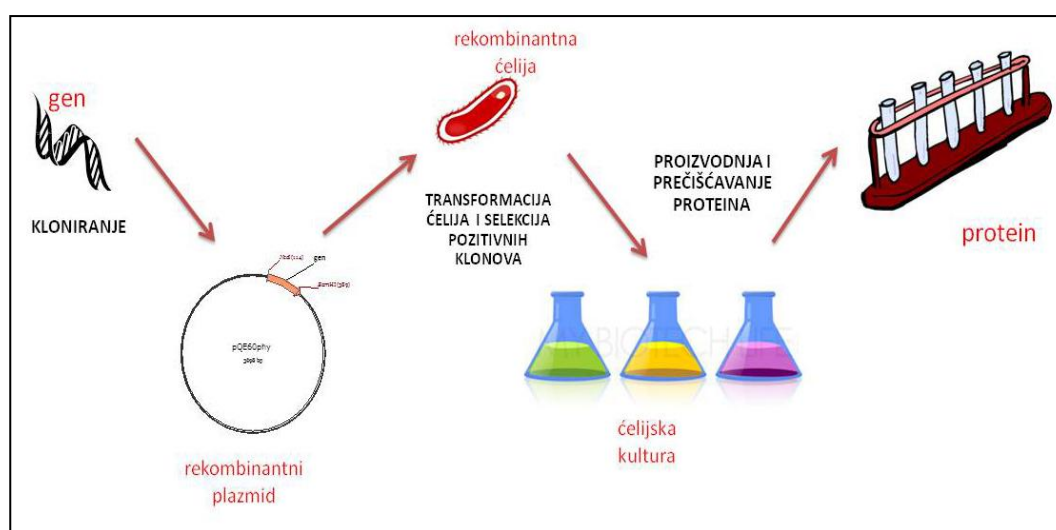
Standardni imunoterapijski pristup podrazumeva potkožno injektovanje rastućih doza alergena ili alergena ekstrakata alergičnim pacijenatima. Iako se klasična imunoterapija pokazala uspešnom u velikom broju kliničkih studija, postoji težnja za razvijanjem tretmana koji su sigurniji po pacijente. Klasični imunoterapijski pristup, posebno kod nekih vrsta alergije na hranu, nije prihvatljiv zbog visokih rizika koje ovakav način terapije nosi [13].

Sa ciljem razvoja sigurnijih formi imunoterapije razvijene su različite strategije u dizajnu novih alergena preparata sa smanjenim/promenjenim IgE ili TCR prepoznavanjem i/ili načina administracije alergena. Dizajn novih alergena preparata

obuhvata sintezu hemijski modifikovanih formi alergena (alergoidi) [105], genetički modifikovanih alergena (hipoalergeni) [14], upotrebu alergenijskih peptida [106, 107], hibridnih alergena [108] i alergena sa vezanim imunostimulativnim molekulima [109] ili adjuvantima koji bi vodili pojačavanju T_H1 imunog odgovora.

2.4 Tehnologija rekombinantne DNK

Tehnologija rekombinantne DNK ili genetsko inženjerstvo predstavlja novu oblast biotehnologije koja se razvila u poslednje tri decenije. Tehnike genetičkog inženjerstva pružaju mogućnost da se pristupi detaljnom upoznavanju i razumevanju složenih bioloških pojava kao što su mehanizmi kojim eukariotske ćelije kontrolišu ekspresiju svojih gena u toku razvića, imunološki odgovor, ćelijsku deoba itd. Ove tehnike su našle široku primenu ne samo u naučnim istraživanjima već i u mnogim drugim oblastima ljudske delatnosti [110].



Slika 2. 6. Šematski prikaz tehnologije rekombinantne DNK.

Kloniranje jednog segmenta DNK koji vodi poreklo iz bilo koje ćelije obuhvata sledeći niz postupaka:

- 1) Izolovanje DNK, totalne RNK pa informacione RNK (iRNK) ili samo iRNK i njeno prevođenje u komplementarnu DNK (cDNK). Željena sekvenca se potom amplifikuje lančanom reakcijom polimeraze (PCR-om) i iseca restrikcijom endonukleazama tipa II. Naravno preduslov je da je poznata proteinska ili nukleotidna sekvenca željenog proteina.
- 2) Spajanje dobijenog fragmenta DNK sa molekulom DNK koji ima sposobnost autonomne replikacije. Ovakvi molekuli DNK nazivaju se vektori za kloniranje ili replikoni. Najčešće korišćeni vektori za kloniranje dobijaju se od plazmidne ili

bakteriofagne DNK. Hibridni molekuli DNK koji nastaju spajanjem ispitivanog fragmenta DNK sa replikonom nazivaju se rekombinovanim molekulima DNK. Spajanje fragmenata DNK sa vektorima postiže se upotrebom enzima DNK ligaze.

3) Unošenje rekombinovanih molekula DNK u ćeliju čiji će enzimi obezbediti njegovu replikaciju naziva se transformacija.

4) Selektovanje ćelije domaćina u kojoj se nalazi ispitivani fragment DNK i njihovo izolovanje.

5) Umnožavanje i gajenje transformisanih ćelija

6) Ekspresija i izolovanje rekombinantnih proteina [110]

2.4.1 **Proizvodnja proteina u bakterijskim ćelijama**

Modifikovani bakterijski plazmidi koji su u komercijalnoj upotrebi poseduju gene koji kodiraju proteine odgovorne za razvoj rezistencije na određene antibiotike i tzv. višestruko klonirajuće mesto (MSC - *engl.* multiple cloning site) u okviru koga se nalaze restrikciona mesta za veći broj restrikcioni endonukleaza tipa II. Bakterijski plazmidi mogu da sadrže specifične obeležavajuće sekvence (*engl.* tags) koji omogućavaju lakšu detekciju i prečišćavanje proteina. Ovde najčešće spadaju GST (Glutation-S transferaza) tag, his (heksa histidinski rep) tag, GFP tag (zeleni fluorescentni protein *engl.* green fluorescent protein), mic epitop (polipeptidni tag izveden iz c-myc onkogen) itd. Bakterijski plazmidi se koriste za čuvanje i umnožavanje gena od interesa (tzv. klonirajući vektori) ali i za ekspresiju proteina (tzv. ekspresioni vektori). Veličina bakterijskih plazmida je od 1 do 10 kBp.

Proizvodnja rekombinantnih proteina u bakterijskim ćelijama podrazumeva konstruisanje plazmida koji sadrži gen za željeni protein, njegovo unošenje u ćeliju domaćina, gajenje ćelije domaćina, indukciju proteinske ekspresije, lizu ćelije domaćina, prečišćavanje proteina i njegovu analizu SDS PAG elektroforezom.

Proizvodnja proteina u bakterijskim ćelijama omogućava dobijanje veće količine proteina i umnogome olakšava njihovo prečišćavanje (upotrebom obeleživača odnosno tagova). Bakterije kao prokarioti ne poseduju sve potrebne enzime za post-translacionu

modifikaciju proteina i njihovo uvijanje. Ovo može imati za posledicu proizvodnju nefunkcionalnih proteina posebno kada je reč o eukariotskim proteinima koji sadrže više domena. Takođe, bakterije često „pakuju“ proteine u inkluziona tela. Proteini u inkluzionim telima su nerastvorni i potrebno je koristiti denaturišuća sredstva za njihovu ekstrakciju čime se stvara problem njihove ponovne renaturacije [110].

2.4.2 Proizvodnja proteina u ćelijama kvasca

Najčešće korišćeni vektor za ekspresiju u ćelijama kvasca je veštački plazmid pBR322. Ovaj vektor dobijen je genetičkom manipulacijom iz većeg broja plazmida i dugo godina bio je najčešće primenjivan vektor u tehnologiji rekombinovane DNK. Vektor pBR322 originalne dužine od 4.362 bp poseduje više mesta za dejstvo preko 40 restrikcionih endonukleaza kao i gene odgovorne za razvoj rezistentnosti na dva antibiotika, ampicilin (Ap^R) i tetraciklin (Tc^R) [111].

Plazmidi koji se koriste za ekspresione analize i sintezu proteina u kvascima dele se na:

- Integrišuće plazmide (*engl.* Yeast integrative plasmid, YIp) koji se ugrađuju u hromozom ćelije domaćina i obično se koriste za ispitivanje funkcionalnosti pojedinačnih gena.
- Replikativne plazmide (*engl.* Yeast replicative plasmid, YRp) koji se samostalno repliciraju što omogućava propagaciju i umnožavanje ovih plazmida unutar ćelije domaćina.
- Epizomalne plazmide (*engl.* Yeast episomal plasmid, YEpl) koji nose DNK sekvencu za autonomnu replikaciju. Veći broj kopija ovog plazmida u formi epizoma postoji unutar ćelije domaćina.
- Cen plazmidi (*engl.* Yeast cen plasmid, YCp) koji se ponašaju kao mikrohromozomi. Sadrže RS sekvencu koja je karakteristična za centromere što im omogućava stabilnu raspodelu tokom mitoze ali je broj samoreplicirajućih plazmida ograničen na jednu kopiju po ćeliji.

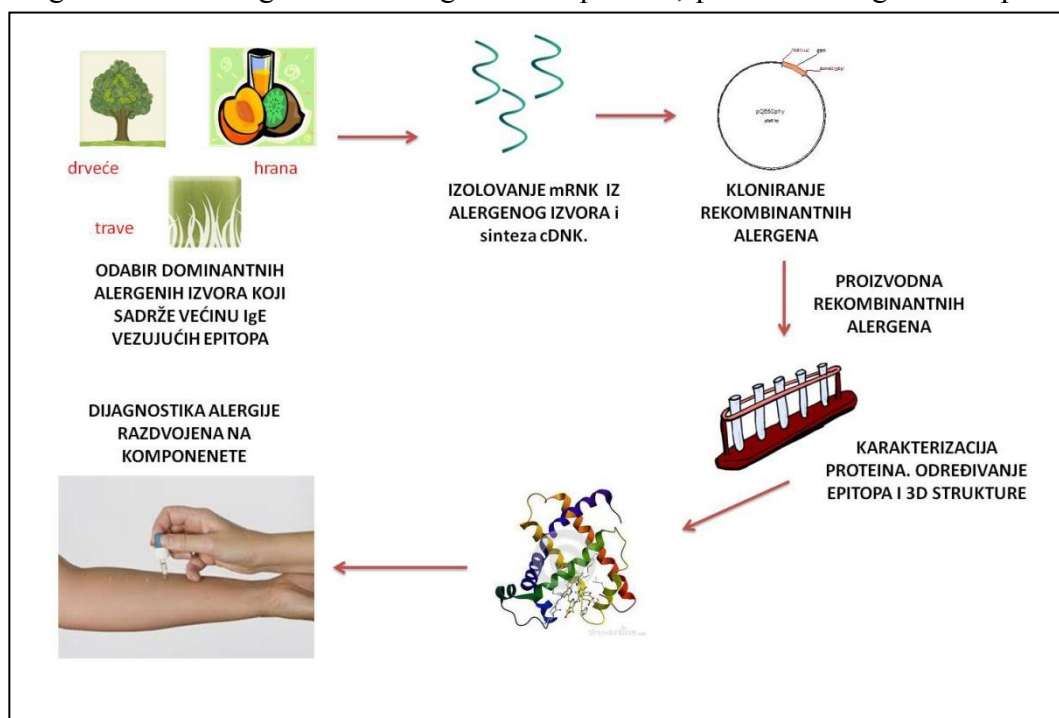
Iako strani proteini mogu da budu sekretovani na osnovu sopstvene signalne sekvence, mnogo bolji rezultati se postižu primenom homologih signalnih sekvenci. Signalne sekvence koje se najčešće koriste prilikom ekspresije proteina u ćelijama kvasca *S.*

cerevisiae su SUC2 (izvedena iz sekvence za invertazu), PHO5 (izvedena iz sekvence za kiselu fosfatazu), α -faktor itd.

Proizvodnja proteina u ćelijama kvasca omogućava da se izbegnu nedostaci proizvodnje u bakterijskim sistemima kao što su neadekvatna pos-translaciona obrada, nemogućnost uvijanja proteina u biološki aktivnu strukturu itd.

2.4.3 Rekombinantni alergeni i dijagnostika alergije razdvojena na komponente

Upotreba alergenskih ekstrakata u dijagnozi i terapiji je široko rasprostranjena i ima dugu i uspešnu kliničku tradiciju. Međutim, na osnovu znanja koje je sakupljeno u poslednjih 20 godina u *in vitro* alergološkoj dijagnostici, dijagnostički prilaz zasnovan na ekstraktima alergena nosi veliki broj kontradikcija. Naime, biološki ekstrakti su heterogene smeše alergeni i nealergeni komponenti, pri čemu alergene komponente

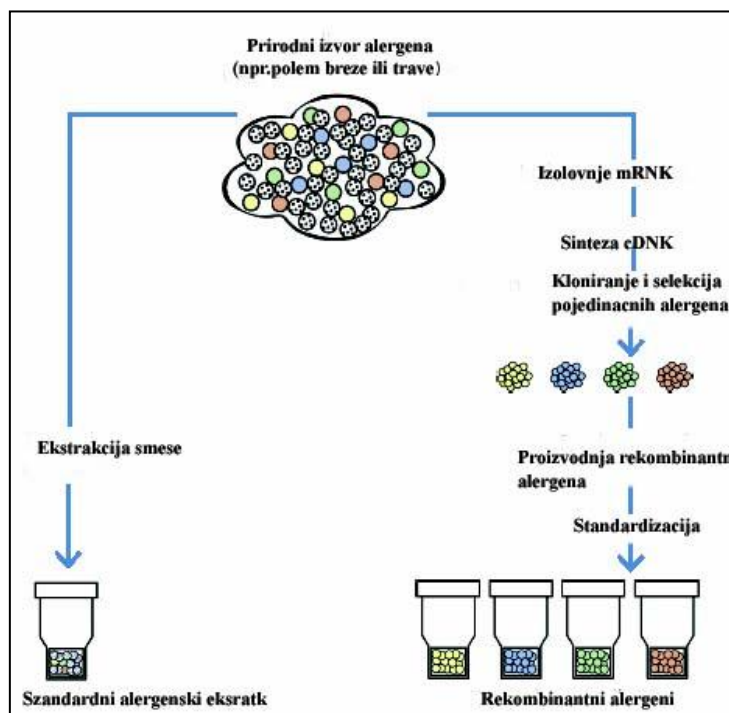


Slika 2. 7. Put od prirodnih alergenskih ekstrakata do rekombinantnih alergena za CRD

moгу da predstavljaju tek minornu frakciju ukupnog ekstrakta. Većina alergeni izvora (npr. polen breze, životinjska perut, grinje...) imaju veći broj glavnih i minornih alergena. Standardizovane mešavine koje sadrže sve relevantne alergene u biološki i dijagnostički odgovarajućim koncentracijama je teško ili gotovo nemoguće proizvesti

tako da komercijalno dostupni alergenski ekstrakti variraju od proizvođača do proizvođača [9].

Varijacije se javljaju usled nekoliko razloga: prvo, neki alergeni se ne mogu ekstrahovati čak ni najsofisticiranijim procedurama ekstrakcije pa mogu biti odsutni ili nedovoljno-prisutni u ekstraktu. Drugo, stabilnost raznih alergena varira usled parcijalne ili kompletne degradacije tokom procesa ekstrakcije te često može da smeta proizvodnji visokokvalitetnih ekstrakata. Treće, biološki materijali su jako heterogeni što se tiče sastava alergena. Na primer, prilikom sakupljanja polena-ekspresija određenih alergena zavisi od faktora sredine kao što su makro i mikro klimatski uslovi, zagađenje i razvojni preiod u toku života biljke [112, 113]. Kada je reč o alergenima hrane problem se javlja usled postojanja većeg broja kultivara za istu vrstu biljke kao i mogućnosti kontaminacije sirovog materijala faktorima iz spoljašnje sredine (pesticidi, herbicidi, buđi) koje mogu dati lažno pozitivan rezultat. Takođe, životinjska perut i dlaka može na sebi da sadrži grinje, a čak i tragovi ovih alergena mogu da daju lažno pozitivan rezultat. Prisustvo IgE antitela za strukturno slične epitope kod homologih proteina različitih vrsta može biti razlog lažno pozitivnih i klinički irelevantnih rezultata [114].



Slika 2. 8. Princip alergijskih ekstrakata i CRD (Component-Resolved Diagnosis)

Razvoj tehnologije rekombinantne DNK početkom 1980-tih godina doveo je do porasta broja alergenijskih molekula koji su okarakterisani na molekularnom nivou što se pre ovoga uglavnom zasnivalo na Western blot-u sa serumima pacijenata. Ova istraživanja su otkrila da sirovi alergijski ekstrakti imaju veći broj glavnih i minornih alergena, a takođe je uveden i koncept alergijske ukrštene reaktivnosti. Od kada je, pre trideset godina prvi rekombinantni alergen proizveden u *E.coli* pa do danas, veliki broj glavnih alergena iz raznih alergenijskih izvora okarakterisan je na molekularnom nivou: određena je njihova biološka uloga kao i struktura.

Danas je dostupan veliki broj rekombinantnih alergena iz najvažnijih alergijskih izvora. Testiranje sa prečišćenim rekombinantnim alergenima omogućava preciznu dijagnozu kod većine pacijenata. Kao prvo i najvažnije, standardizacija eseja sa dobro okarakterisanim molekulom superiornije je u odnosu na testiranje sa alergijskim ekstraktima, čak i dobro okarakterisanim, i ima pozitivne efekte na specifičnost i osetljivost. Takođe moguće je odrediti i IgE reaktivnost na nivou pojedinačnih molekula pa je stoga ovakav pristup nazvan "Dijagnostika razdvojena na komponente" (CRD - *engl.* Component-Resolved Diagnosis). Upotreba CRD može da pomogne da se otkrije put senzitivacije pacijenata kao i da se detektuju pacijenti koji su skloni sistemskoj anafilaktičkoj reakciji [15, 115].

Pored svih ovih obećavajućih rezultata CRD procedure još uvek nisu ustanovljene kao rutinske dijagnostičke metode iz više razloga. Pre svega, čak i ako se dobiju profili IgE reaktivnosti sa rekombinantnim molekulima upotreba ovih molekula u terapijske svrhe nije moguća jer se većina još uvek nalazi u nekoj od faza ispitivanja (biohemijska karakterizacija, farmakokinetička ispitivanja, preklinička ispitivanja, klinička ispitivanja). Takođe jako mali broj testova baziran na rekombinantnim alergenima je komercijalno dostupan, a čak i oni komercijalno dostupni često ne sadrže neke od glavnih alergena. Testiranje zasnovano na upotrebi pojedinačnih molekula zahtevalo bi korišćenje velikog broja individualnih alergenijskih molekula. Na primer, CRD testiranje na alergiju na polen trave, grinje i lateks zahtevalo bi više od 30 komponenti i pored toga mogle bi nedostajati komponente prisutne samo u nekim vrstama kao i alergeni koji za sada još uvek nisu identifikovani. Takođe, mnogi prirodni alergeni se javljaju u većem broju izoformi od čega sve izoforme nemaju isti kapacitet vezivanja za IgE.

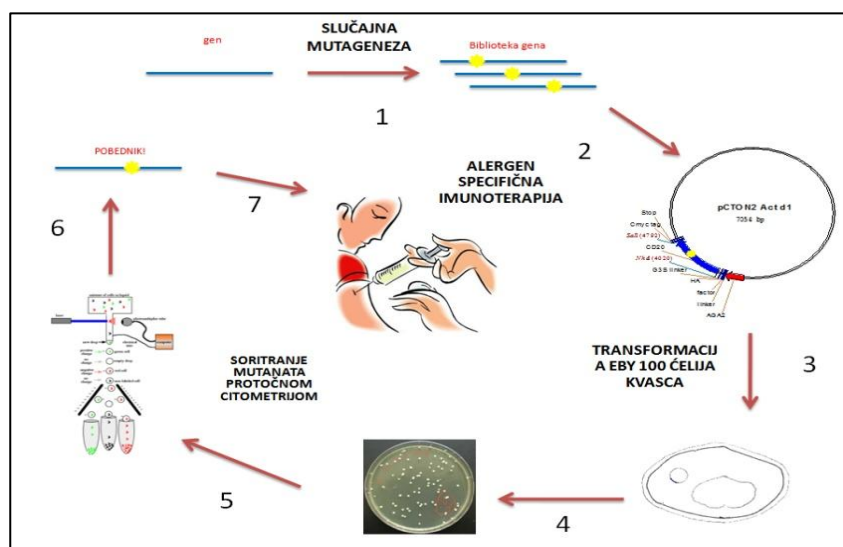
Pokazano je da neki rekombinantni alergeni imaju isti IgE vezujući kapacitet kao i prirodni alergeni ali naravno postoje i rekombinantni molekuli koji imaju tek deo IgE vezujućeg kapaciteta prirodnih molekula usled različite posttranslacione obrade i načina uvijanja molekula u „neprirodnim“ ekspresionim sistemima [15].

2.4.4 Primena dirigovane evolucije za proizvodnju hipoalergenih proteinskih terapeutika

Dirigovana evolucija je metoda koja se koristi za dizajn proteina i bazira se na fenomenu prirodne selekcije da bi se odbrali molekuli koji imaju željena svojstva.

Tipičan eksperiment podrazumeva tri koraka (Slika 2.9):

- Diverzifikaciju: Gen od interesa se nasumično mutira ili rekombinuje da bi se dobila biblioteka gena. Najčešće se za ovo koriste lančana reakcija polimeraze sklona greškama ep PCR (*engl.* error-prone PCR) i/ili kombinovanje DNK segmenata (*engl.* DNA shuffling).
- Selekcija: Biblioteka se testira na prisustvo mutanata koji poseduje željene osobine. Proces omogućava identifikaciju i izolovanje mutanata koji su poboljšani, dok su nefunkcionalni mutanti eliminisani.
- Amplifikacija: Varijante koje su identifikovane tokom procesa selekcije se umnožavaju, čime je omogućeno da im se skvencira DNK da bi se potvrdile mutacije do kojih je došlo.



Slika 2. 9. Dirigovana evolucija proteina

Ova tri koraka nazivaju se runda dirigovane evolucije. Većina eksperimenata podrazumeva više od jedne runde i molekuli selektovani u jednoj rundi najčešće se koriste kao osnova u sledećoj. Na kraju procesa selektovani mutanti se karakterišu klasičnim biohemijskim metodama.

Verovatnoća uspeha procesa dirigovane evolucije zavisi od veličine i diverziteta napravljenih biblioteka. Veći broj rundi sortiranja povećava verovatnoću da će se dobiti mutanti željenih osobina.

Dirigovana evolucija može da se izvodi kako *in vitro* tako i *in vivo* (na ćelijama). *In vitro* evolucija omogućava generisanje većih biblioteka i preskače limitirajući faktor transformacije ćelija, dok *in vivo* evolucija omogućava selekciju proteina u prirodnim uslovima.

Jedna od prednosti ove metode leži u tome da nije neophodno detaljno poznavanje željenog mehanizma ili strukture nekog molekula da bi se ona na ovaj način izmenila [116-118].

3 Ciljevi

Optimizacija, odnosno zamena alergeni ekstrakata precizno okarakterisanim prečišćenim alergenima kao i njihovim rekombinantnim kopijama predstavlja jedan od glavnih zadataka savremene alergološke dijagnostike. Proizvodnjom i detaljnom karakterizacijom rekombinantnih alergena može se izbeći upotreba alergeni ekstrakata u *in vitro* dijagnostici čime se izbegavaju nedostaci i ograničenja prirodnih alergenskih ekstrakata.

Ovo istraživanje ima za cilj biohemijsku i imunohemijsku karakterizaciju fitocistatina – inhibitora cistein proteaza poreklom iz kivija (*Actinidia deliciosa*), kao i karakterizaciju njegovih rekombinantno dobijenih homologa proizvedenih u *E. coli*:

- Ispitaće se sposobnost cistatina za vezivanje IgE-a iz seruma alergičnih osoba, kao i sposobnost da oslobađaju biološki aktivne medijatore iz mastocita i bazofila.
- Pored alergeni potencijala, ispitaće se i biohemijske karakteristike prirodnog fitocistatina i njegovih rekombinantnih homologa kao što su sposobnost inhibicije cistein proteaza, ali i sposobnost inhibicije rasta fitopatogenih bakterija i gljiva.

Alergen specifična imunoterapija trenutno predstavlja jedini tretman alergijskih oboljenja koji ne podrazumeva samo tretman simptoma. Standardni imunoterapijski pristup alergije na hranu, koji uključuje vakcinaciju alergenima, nije prihvatljiv zbog visokog rizika. Upotreba rekombinantno proizvedenih hipoalergena (molekula sa smanjenim IgE vezivanjem) se javlja kao novi i veoma obećavajući koncept koji ima potencijal da izmeni trenutne protokole u imunoterapiji alergije na hranu.

Drugi deo ove teze ima za cilj:

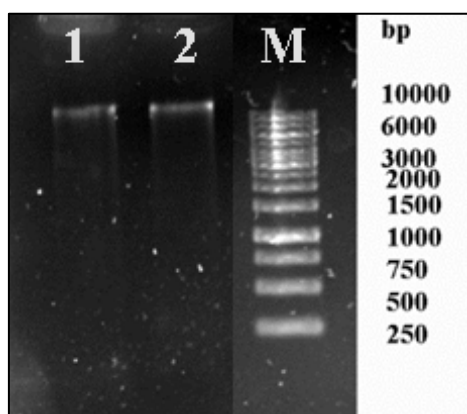
- Kreiranje biblioteka rekombinantnog aktinidina, koji imaju izmenjenu površinsku topografiju čime je smanjeno IgE vezivanje, ali zadržan strukturalni šablon uvijanja polipeptidne kičme
- Sortiranje dobijenih biblioteka upotrebom protočne citometrije i imunološku karakterizaciju dobijenih mutanata.

4 Naši radovi

4.1 Kloniranje i ekspresija rCPI

4.1.1 Izolovanje DNK iz ploda kivija

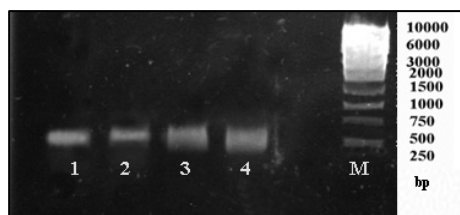
U cilju izolovanja gena za rCPI bilo je potrebno izolovati DNK iz ploda kivija. Genomska DNK izolovana je korišćenjem Dneasy kompleta (Qiagen) prema preporuci proizvođača, a po protokolu opisanom u Eksperimentalnom delu (7.1.2.). Kvalitet izolovane genomske DNK proveravan je agaroznom gel elektroforezom (Slika 4.1). Sa gela (Slika 4.1) može da se vidi da je izolovana DNK intaktna i da je dužina veća od 10 000 bp.



Slika 4.1. Analiza genomske DNK preparacije izolovane iz ploda zelenog kivija agaroznom gel elektroforezom: 1) DNK izolat 2) DNK izolat M) DNK markeri (250 -10 000 bp O'Gene Ruler™, Fermentas)

4.1.2 Amplifikacija gena za rCPI lančanom reakcijom polimeraze

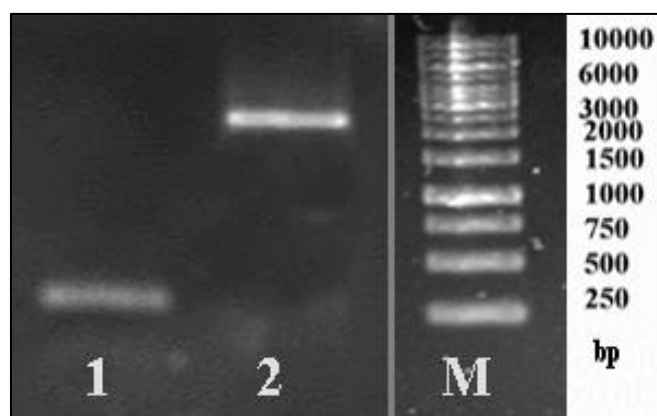
Amplifikacija gena za rCPI rađena je lančanom reakcijom polimeraze korišćenjem prajmera koji pored sekvence komplementarne genu za zrelu formu rCPI sadrže i sekvence za restrikcione endonukleaze Nco I and Bam HI. Dobijeni PCR proizvod analiziran je agaroznom gel elektroforezom (Slika 4.2). Analizom PCR proizvoda (Slika 4.2) utvrđeno je da je PCR reakcija dala specifični proizvod i da je dobijeni fragment odgovarajuće veličine (303 bp)



Slika 4.2. Analiza PCR reakcije agaroznom gel elektroforezom: 1) - 4) PCR proizvod dobijen amplifikacijom gena za CPI M) DNK markeri (250 -10 000 bp O'Gene Ruler™, Fermentas)

4.1.3 Kloniranje rCPI u pQE60 ekspresioni vektor

Nakon PCR reakcije PCR proizvod je prečišćen upotrebom GeneJET™ kompleta za prečišćavanje (Fermentas). Nakon prečišćavanja PCR proizvod je podvrgnut digestiji sa enzimima Bam HI i Nco I. Isti postupak je urađen i za vektor za ekspresiju pQE60. Nakon sečenja vektor i PCR proizvod (insert) analizirani su agaroznom gel elektroforezom (slika 4.3.).

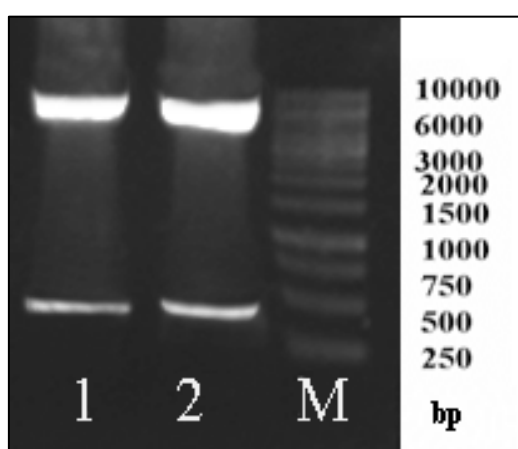


Slika 4.3. Analiza digestije PCR proizvoda dobijenog amplifikacijom gena za rCPI i vektora za ekspresiju pQE60 agaroznom gel elektroforezom: 1) PCR proizvod 2) vektor pQE60 M) DNK markeri (250 -10 000 bp O'Gene Ruler™, Fermentas)

Po digestiji insert i vektor su prečišćeni iz gela i postavljena je reakcija ligacije. Ligaciona smeša je korišćena za transformaciju ćelija DH5α koje su potom gajene na LA podlozi sa ampicilinom. Pojedinačni klonovi dobijeni transformacijom DH5α ćelija konstruktom pQE60-fitocistatin su zasejani u tečnu LB podlogu i gajeni preko noći na

37°C nakon čega je iz njih izolovan plazmid korišćenjem GenJET™ kompleta za izolovanje plazmida (*Fermentas*) prema uputstvima proizvođača.

Izolovani konstrukti pQE60-fitocistatin su podvrgnuti digestiji restrikcijom endonukleazama Bam HI i Nco I, a potom analizirani agaroznom gel elektroforezom (slika 4.4.). Klonovi koji su dali pozitivnu reakciju (postojanje 2 trake na agaroznom gelu - manja od inserta; veća od vektora) su poslani na sekvenciranje. Sekvenciranjem je potvrđeno da je kloniranje gena za CPI bilo uspešno (Slika 4.5)



Slika 4.4. Analiza digestije konstrukata pQE60-fitocistatin izolovanih iz DH5a ćelija agaroznom gel elektroforezom: 1) klon 1 2) klon 2 M) DNK markeri (250 -10 000 bp O'Gene Ruler™, *Fermentas*)

```

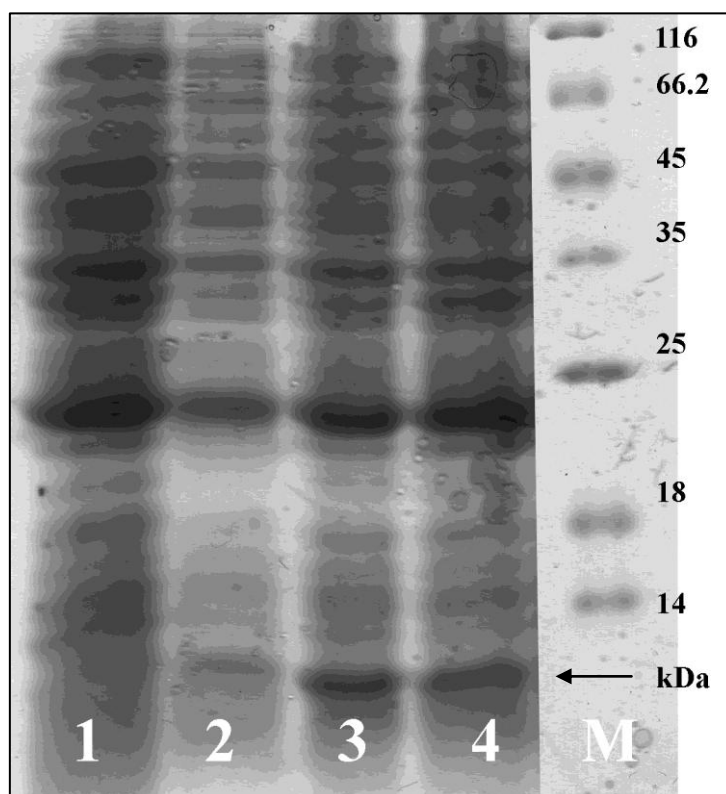
1 atggtggcggcaggcgggtggcggccgatcgagagcctgaattcg
M V A A G G W R P I E S L N S
46 gggagggtccaagacgtggccaattcgcggtgctggagcacaac
A E V Q D V A Q F A V S E H N
91 aagcaggccaacgatgaattgcagtaccagagcgtggttcggggc
K Q A N D E L Q Y Q S V V R G
136 tacactcaggtggtcgccggcagcaattaccgggtggtgatcgcg
Y T Q V V A G T N Y R L V I A
181 gccaaagcagcgcgcgttgggggaactacgaggcgggtcgtttgg
A K D G A V V G N Y E A V V W
226 gataagccctggatgcatttttaggaacctcacttctttccggaag
D K P W M H F R N L T S F R K
271 gtgggatccagatctcatcaccatcaccatcac 303
V G S R S H H H H H H

```

Slika 4.5. ORF analiza sekvenciranih konstrukata pQE60-fitocistatin

4.1.4 Optimizacija ekspresije rCPI

Za postizanje što većeg nivoa ekspresije nekog proteinskog konstrukta preporučuje se analiza nivoa ekspresije u vremenu. Alikvoti su uzimani na 2h, 4h i 12 h nakon indukcije (Slika 4.6). Najveći prinos rCPI dobijen je 12 h nakon indukcije (Slika 4.6). Proteinska traka od oko 12 kDa koja odgovara rCPI vidljiva je u svim uzorcima osim u neindukovanoj kontroli.

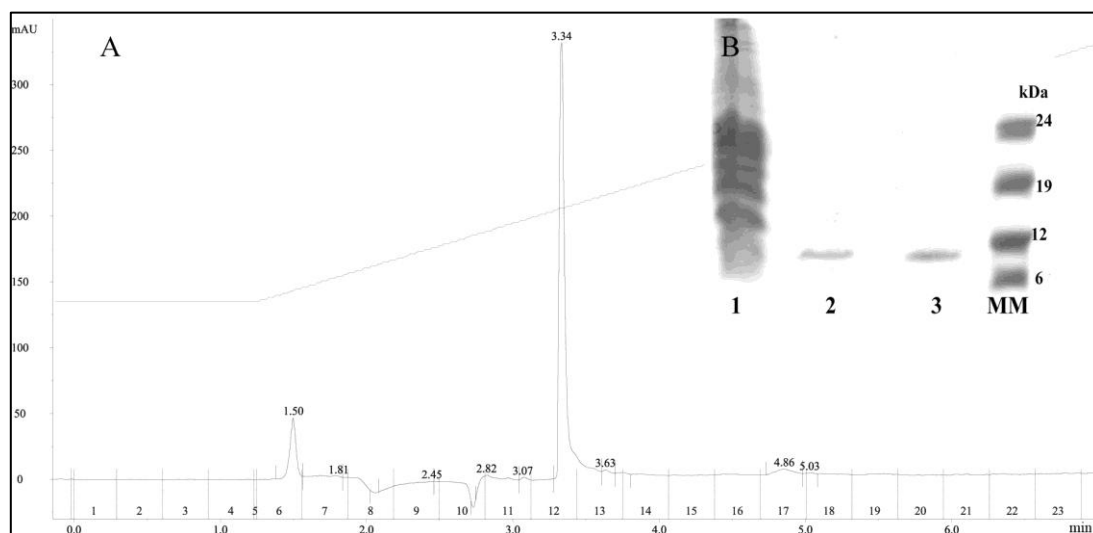


Slika 4. 6. Optimizacija ekspresije rCPI u vremenu: 1) BL21 RIPL neindukovana kontrola 2) BL21 RIPL 2h nakon indukcije 3) BL21 RIPL 4h nakon indukcije 4) BL21 RIPL 12h nakon indukcije M) proteinski markeri masa (*Fermentas*)

4.2 Prečišćavanje prirodnog i rekombinantnog cistein proteaznog inhibitora (CPI)

4.2.1 Izolovanje prirodnog CPI (nCPI)

Za izolovanje cistein proteaznog inhibitora iz ekstrakta ploda zelenog kivija primenjena je afinitetna hromatografija. Afinitetni matriks pripremljen je imobilizacijom papaina na glutaralhidom aktivirani BioGel P-60. Sakupljene frakcije analizirane su elektroforetski (Slika 4.7.B) kao i reverzno faznom hromatografijom (Slika 4.7.A) po protokolu opisanom u delu 7.5.7.1. Prinos nCPI iznosio je oko 6 mg/kg svežeg ploda kivija.

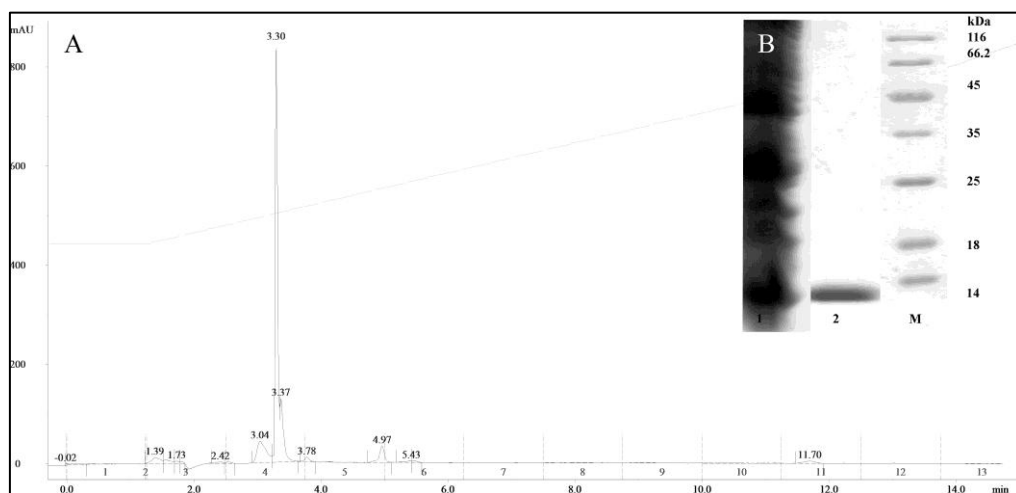


Slika 4.7. A) Reverzno fazna hromatografska analiza prečišćavanja nCPI B) SDS-PAG elektroforeza prečišćenog nCPI 1) Ekstrakt kivija pre nanošenja na kolonu za afinitetnu hromatografiju 2) nCPI eluiran sa afinitetnog matriksa u redukujućim uslovima 3) nCPI eluiran sa afinitetnog matriksa u neredukujućim uslovima MM) proteinski markeri masa (*Serva*)

4.2.2. Prečišćavanje rCPI

Za izolovanje rekombinantnog cistein proteaznog inhibitora iz bakterijskih ćelija korišćena je metal afinitetna hromatografija. Gajenje bakterijskih ćelija i ekspresija rekombinantnog rCPI urađena je po postupku opisanom u delu 7.1.13. rCPI je izolovan iz 400 mL bakterijske kulture po protokolu opisanom u delu 7.3.2. Na kolonu za metal afinitetnu hromatografiju naneto je oko 30 mL supernatanta u urei. Sakupljene frakcije

su analizirane elektroforetski (Slika 4.8.B) kao i reverzno faznom hromatografijom (Slika 4.8.A) po protokolu opisanom u delu 7.5.7.1. Prinos rCPI iznosio je 15 mg/L podloge.



Slika 4. 8. A) Reverzno fazna hromatografska analiza prečišćavanja rCPI B) SDS-PAG elektroforeza prečišćenog rCPI proizvedenog u *E.coli* 1) solubilizovana inkluziona tela 2) rCPI eluiran sa afinitetnog matriksa M) proteinski markeri masa (*Fermentas*)

4.3 Karakterizacija nCPI

4.3.1 Određivanje pI vrednosti nCPI

Izoelektrična tačka nCPI određena je izoelektričnim fokusiranjem i 2D Western blotom. Uzorci su analizirani po protokolu opisanom u delu 7.2.3. i 7.2.4, dok je imunoprint, odnosno elektro-transfer na membranu rađen po protokolu opisanom u delu 7.4.1.3 i 7.4.1., respektivno. Imunoprint, odnosno imunoblot je razvijen zečijim poliklonskim anti-fitocistatin antiserumom (1: 50 000). Prečišćeni nCPI dao je jednu traku na IEF imunoprintu, odnosno jednu tačku na 2D PAGE blotu (Slika 4.9.). Određena pI vrednost od 6,9 se uklapa sa teorijskom pI vrednosti za ovaj molekul (izračunato u ProtParam programu <http://web.expasy.org/protparam/>) [119].

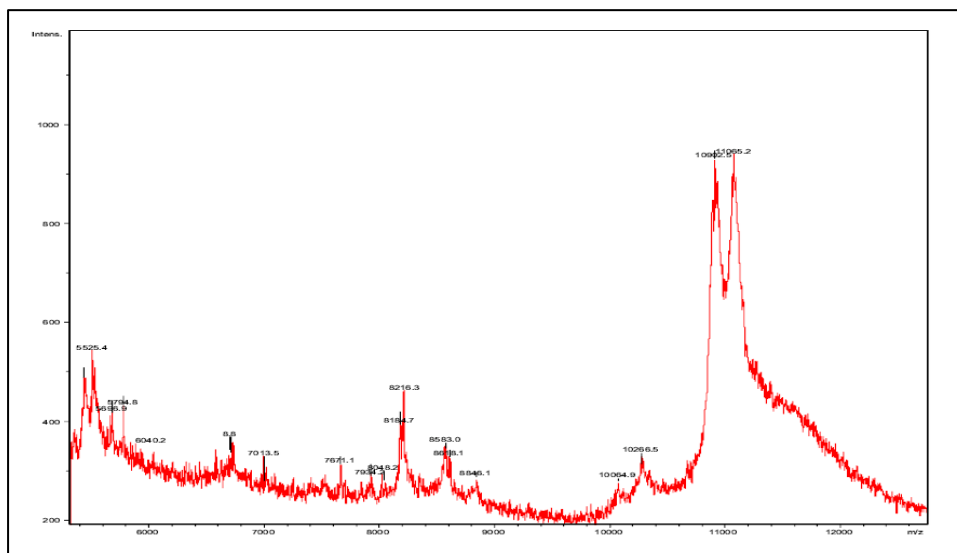


Slika 4.9. 2D PAGE imunoblot prečišćenog nCPI. Detekcija je rađena zečijim poliklonskim anti-cistatin antiserumom (MM) proteinski markeri masa (*Serva*).

4.3.2 N-terminalno sekvenciranje i masena analiza nCPI

Da bi se potvrdio identitet prečišćenog proteina nCPI je transferovan na PVDF membranu i potom analiziran Edmanovom degradacijom. Četrnaest identifikovanih aminokiselina ($^1\text{VAAGGXRPIESLNSA}^{14}$) potvrdilo je da se radi o sekvenci zrelog nCPI (NCBI AAR92223). Signalna sekvenca se sastoji od 26 aminokiselina i predviđa da se nascentni peptid transportuje u endoplazmatični retikulum. Zreloj formi proteina nedostaje ova peptidna sekvenca.

Teorijska molekulska masa zrelog nCPI iznosi 10 052,46 Da (izračunato u ProtParam programu <http://web.expasy.org/protparam/>) [119]. Eksperimentalno određena molekulska masa nCPI iznosi 10 902,5 i 11 055,2 Da (Slika 4.10.).



Slika 4. 10. Maseni spektar prečišćenog nCPI dobijen MALDI TOF analizom.

Analizom masenog otiska prsta nCPI (Slika 4.11. i 4.12.) potvrđeno je prisustvo više od 90 % aminokiselinske sekvence proteina. Jedino peptid 83 NLTSFRKV 90 nije pronađen. Na ovom peptidu postoji potencijalno mesto za N-glikozilaciju, tako da činjenica da nedostaje u korelaciji sa razlikom u masi molekulskog jona u odnosu na teorijski ostavlja mogućnost N-glikozilacije nCPI.

1	10	20	30
<u>VAAGGWRPIE SLNSAEVQDV AQFAVSEHNK</u>			
31	40	50	60
QANDELQYQS VVRGYTQVVA GTNYRLVIAA			
61	70	80	90
KDGAVVGNYE AVVWDKPWMH FR ⁸³ NLTSFRKV ⁹⁰			

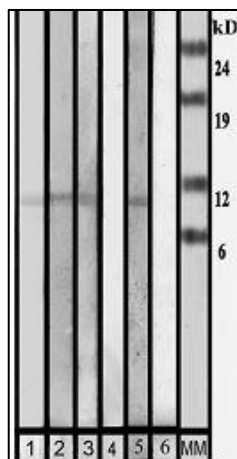
Slika 4. 11. Aminokiselinska sekvenca kivi cistatina. Podvučeno- aminokiselinski ostaci potvrđeni Edmanovom degradacijom, masnim slovima označene su peptidi čija sekvenca je potvrđena ESI FT-ICR analizom, motiv potencijalnog N-glikozilovanja označen je plavom bojom.

Uneta masa Da	Teorijska masa Da	Δ mase Da	Peptid	pozicija
1328.671	1328.6593	-0.011	GYTQVVAGTNYR	44-55
1549.776	1549.7605	-0.014	QANDELQYQSVVR	31-43
2475.905	2476.1866	0.282	DGAVVGNYEAVVWDPWMHFR	62-82
2475.905	2476.1866	0.282	DGAVVGNYEAVVWDPWMHFR	62-82
2475.905	2476.1866	0.282	DGAVVGNYEAVVWDPWMHFR	62-82
2491.863	2492.1815	0.319	DGAVVGNYEAVVWDPWMHFR	62-82
2491.863	2492.1815	0.319	DGAVVGNYEAVVWDPWMHFR	62-82
2491.863	2492.1815	0.319	DGAVVGNYEAVVWDPWMHFR	62-82
3209.295	3209.5973	0.302	VAAGGWRPIESLNSAEVQDVAQFAVSEHNK	1-30
3225.244	3225.5923	0.348	VAAGGWRPIESLNSAEVQDVAQFAVSEHNK	1-30

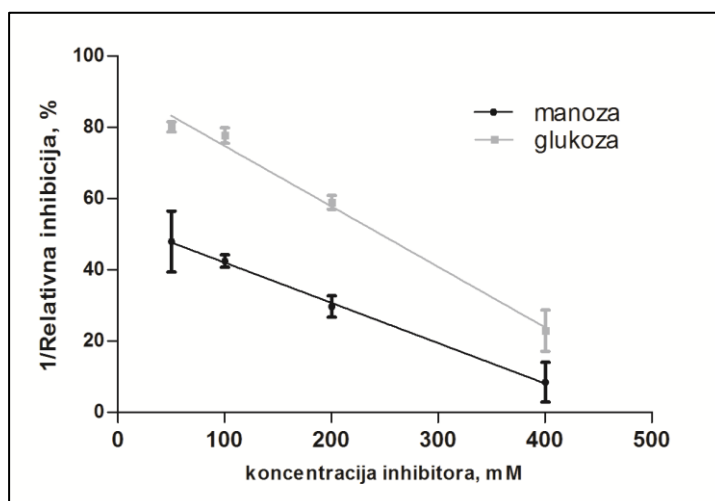
Slika 4. 12. Lista peptidnih fragmenata dobijenih tripsinskom digestijom analiziranih ESI FT-ICR analizom.

4.3.3 Detekcija ugljeno-hidratnih ostataka na nCPI lektinima

Da bi se potvrdilo prisustvo ugljeno-hidratnih ostataka na nCPI rađen je test vezivanja obeleženih lektina u blotu i ELISA. Detekcija je rađena manozno-specifičnim Con A i rBanLec lektinima kao i fukozno specifičnim lektinom iz gljive *Aleruira aurntia* AAL. Sva tri lektina se vezuju za nCPI u Western blotu (Slika 4.13.). U ELISA testu, koji je rađen sa rBanLec utvrđeno je da je IC_{50} za glukozu 250 mM, a za manozu IC_{50} iznosi 30 mM (Slika 4.13).



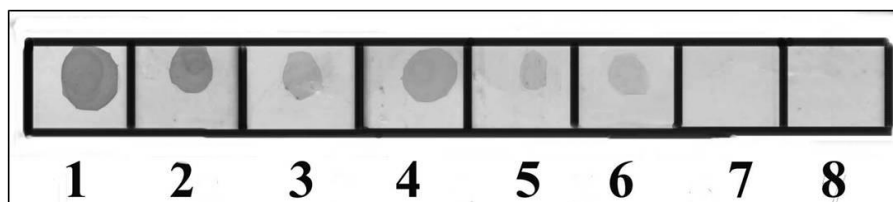
Slika 4. 13. Vezivanje lektina za nCPI u Western blotu 1) membrana bojena Ponceau S 2) Con A lektin 3) BanLec lektin 4) streptavidin-alkalna fosfataza 5) AA lektin 6) pufer MM) proteinski markeri masa (*Fermentas*)



Slika 4. 14. Inhibicija vezivanja rBanLec lektina za šećerne ostatke nCPI manozom (crno) i glukozom (sivo). Greške predstavljaju standardnu devijaciju triplikata merenja.

4.3.4 IgE reaktivnost nCPI

Prečišćeni nCPI pokazao je IgE reaktivnost u dot blot analizi reagujući sa 6 (od 7 ukupno) seruma kivi alergičnih subjekta (Slika 4.15). U Western blotu nije bilo moguće potvrditi IgE reaktivnost ni sa jednim od seruma, što upućuje na potencijalno prisutvo konformacionih IgE epitopa na nCPI koji se gube tokom pripreme uzorka za SDS-PAGE.

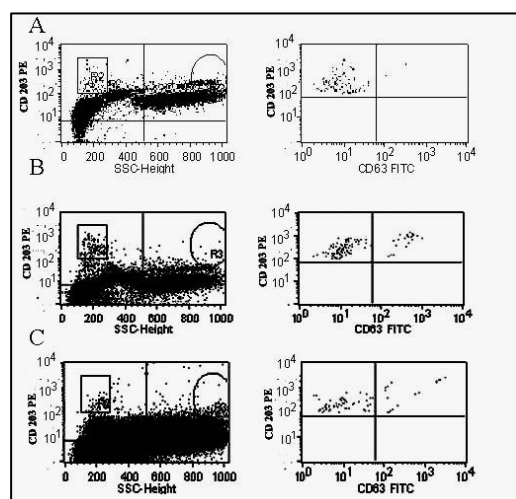


Slika 4. 15. IgE reaktivnost prečišćenog nCPI detektovana u dot blotu: 1-7) serumi kivi alergičnih pacijenata 8) kontrola-serum neatopične osobe.

Biološka aktivnost nCPI procenjena je u kožnim probama. Pozitivna reakcija je izazvana kod tri pacijenta (tabela 4.1.) koji su monosenzitizirani na kivi što upućuje na to da nCPI doprinosi kliničkim simptomima alergije na kivi. Takođe, nCPI je uspeo da aktivira bazofile kod jednog kivi alergičnog pacijenta što je praćeno pojačanom ekspresijom markera CD63 i CD203c. Više od 20 % bazofila je aktivirano nCPI u koncentraciji od 50 $\mu\text{g/mL}$ (Slika 4.16), dok su pozitivna i negativna kontrola bile 28 % i 2 % respektivno.

Tabela 4. 1 . Demografski i klinički podaci o pacijentima (A, astma; AE angioedem; OAS, oralna alergija; DP, dispneja, SA, sistemska anafilaksa, SD, stezanje dušnika; U, urtikarija; NT, nije testirano).

Pacijent br.	Godine/pol	Simptomi	Druge alergije na hranu	Specifični IgE (kU/L)	Kožne probe	
					Ekstrakt kivija	nCPI
1. AŠ	58/Ž	AE	/	0,87	+	+
2. K6	33/M	OAS, SD	Jabuka, trešnja, kruška, lubenica	NT	+	NT
3. MD	73/Ž	OAS, SD	/	<0,35	+	+
4. K17	33/Ž	OAS, SD, DP	Kikiriki, lešnik, orah, kruška, banana, paradjz, paprika, krastvac, badem	<0,35	+	NT
5. MJ	52/Ž	AE, SD	/	<0,35	+	NT
6. DD	42/Ž	SA	/	<0,35	+	+
7. K18	22/Ž	OAS, U, A,SD	Kikiriki, lešnik, jabuka, breskva, trešnja kruška, ananas, banana, dinja	2,3	-	NT

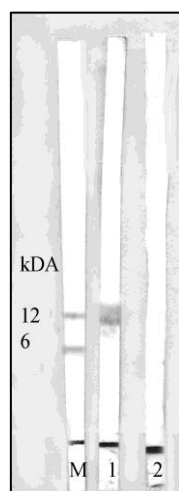


Slika 4. 16. Aktivacija bazofila kod kivi alergičnog pacijenta: A) negativna kontrola B) pozitivna kontrola C) nCPI

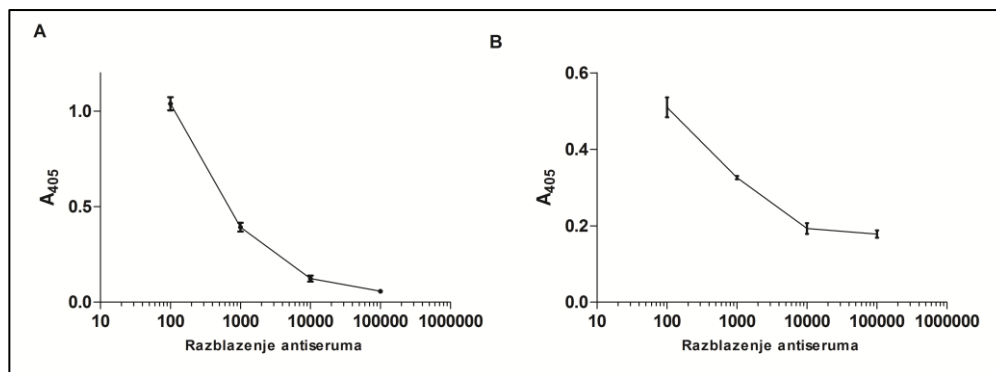
4.3.5 IgG reaktivnost nCPI

IgG reaktivnost nCPI ispitivana je u Western blotu i ELISA testu korišćenjem zečijeg poliklonskog antiseruma proizvedenog na prečišćeni nCPI. Tirar antiseruma za Western

blot optimizovan je na pun ekstrakt kivija i određeno je razblaženje od 1:50 000. IgG reaktivnost nCPI detektovana je u Western blotu na prečišćeni protein koristeći anti-fitocistatin antiserum (1:50 000; Slika 4.17.), dok je saturaciona kriva u ELISA testu postavljena na prečišćeni nCPI (5 i 0,5 µg/bunaru; Slika 4.18).



Slika 4.17. IgG reaktivnost prečišćenog nCPI detektovana u Western blotu: 1) prečišćeni nCPI 2) kontrola sekundarnog antitela M) proteinski markeri masa (*Serva*)

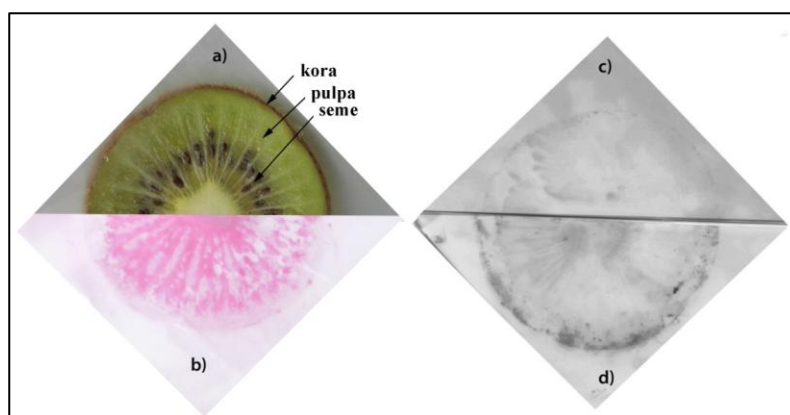


Slika 4. 18. Određivanje titra zečijeg poliklonskog anti-nCPI antiseruma. Za pločicu je kuplovano: A) 0,5 µg/bunaru B) 5 µg/bunaru. Greške predstavljaju standardnu devijaciju triplikata merenja.

4.3.6 Određivanje tkivne lokalizacije nCPI u plodu kivija

Lokalizacija nCPI u tkivu ploda kivija određena je na printovima isečaka ploda kivija u tkivnim imuno-print (ITP) eksperimentima. Detekcijom nCPI na printovima tkivnih isečaka ploda kivija pokazano je da je nCPI prisutan u pulpi. Najveća zastupljenost

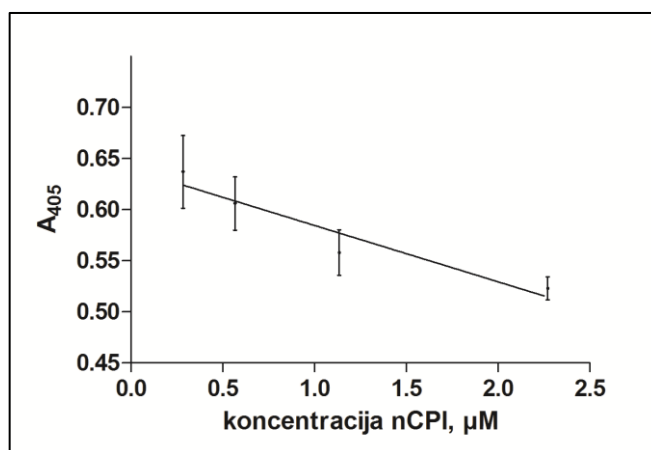
detektovana je u spoljašnjem sloju perikarpa, blizu kore i u najdubljim delovima pulpe (Slika 4.18)



Slika 4. 18. Distribucija nCPI u plodu kivija određena tkivnim imuno - printom (ITP). Printovi tkivnih isečaka ploda kivija: a) isečak ploda kivija b) print isečka ploda kivija bojen Ponceau S c) kožiji anti-zečiji antiserum oboježen alkalnom fosfatazom d) detekcija nCPI zečijim poliklonskim anti-CPI antiserumom u printovima ploda kivija.

4.3.7 Određivanje inhibitorne sposobnosti nCPI

Prirodni cistatin je inhibitor papaina i papainu-sličnih cistein proteaza. Za reakciju su korišćeni papain iz lateksa papaje (14 U/mg proteina) i N_{α} -benzoil-L-arginin-etil-estar hidrohlorid. Postupak za određivanje konstante inhibicije opisan je u delu 7.6.1. Merena je ΔA na 405 nm. Dobijeni rezultati su predstavljeni na slici 4.19. Na osnovu dobijenih rezultata koncentracija pri kojoj se postiže 50 % inhibicije papaina EC_{50} iznosila je 2,47 nM.

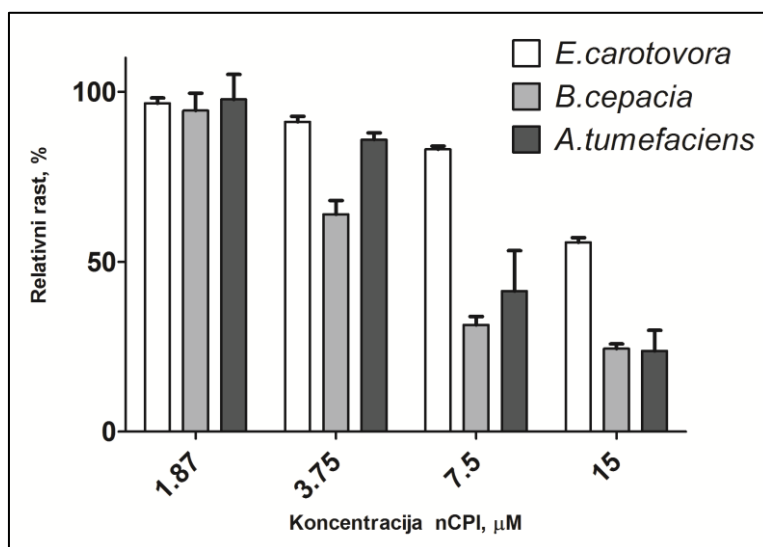


Slika 4. 19. Grafik inhibicije enzimske aktivnosti papaina različitim koncentracijama nCPI. Greške predstavljaju standardnu devijaciju triplikata merenja.

4.3.8 *In vitro* antibakterijska aktivnost nCPI

Da bi se ispitala biološka aktivnost nCPI rađen je *in vitro* antibakterijski esej sa sojevima fitopatogenih bakterija *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404, *Burkholderia cepacia* ATCC 2159, i *Erwinia carotovora*. Relativni rast *A. tumefaciens* u prisustvu 15 μM nCPI je 23,8 %, za *B. cepacia* 22,4 % i *E. carotovora* 55,5 % (Slika 4.20).

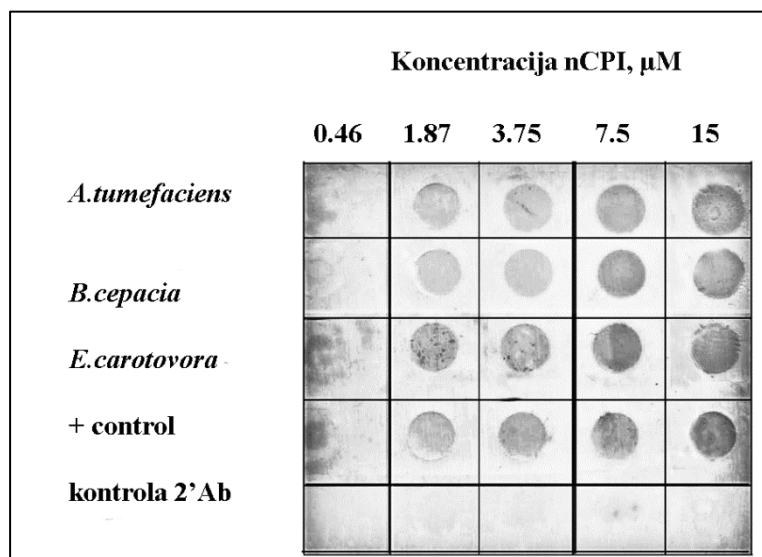
Efektivna koncentracija nCPI kojom se postiglo 50 % inhibicije (EC_{50}) za *A. tumefaciens* i *B. cepacia* iznosila je 7,01 μM and 3,79 μM , respektivno. Detektovana je i inhibicija naspram *E. carotovora*, ali sa 15 μM koncentracijom nCPI je postignuto samo 45 % inhibicije, tako da EC_{50} nije mogla da bude izračunata.



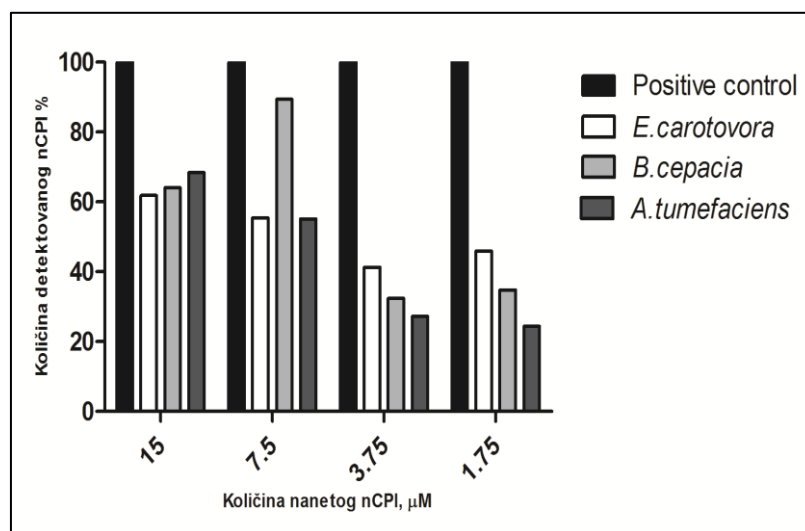
Slika 4. 20 Efekat nCPI na rast *Erwinia carotovora* (belo), *Burkholderia cepacia* (svetlo sivo) i *Agrobacterium tumefaciens* (tamno sivo). Za esej, 10^4 ćelija je inkubirano u 100 μL LB na 30°C 20 h, u prisustvu rastuće koncentracije nCPI. Rast je praćen merenjem apsorbancije na 620 nm, a rezultati su predstavljeni kao procenat rasta i odnosu na kontrolni uzorak koji je gajen bez nCPI. Greške predstavljaju standardnu devijaciju triplikata merenja.

Da bi se detaljnije ispitao mehanizam na osnovu koga nCPI deluje na fitopatogene bakterije *A. tumefaciens* LBA 4404, *B. cepacia* ATCC 2159, i *E. carotovora* prisustvo nCPI je detektovano u fermentacionoj tečnosti u kojoj su rasle bakterije. Osim u sterilnom medijumu i negativnoj kontroli (nije prikazano), prisustvo nCPI potvrđeno je u uzorcima u kojima je dodata koncentracija iznosila 1.87, 3.75, 7.5 i 15 μM u slučaju sva tri bakterijska soja (Slika 4.21). Denzitometrijskom analizom utvrđeno je da je prosečno 44 % nCPI detektovano u medijumu u kome je rastao *A. tumefaciens*, dok je za *B. cepacia* i *E. carotovora* ovo iznosilo 55 % odnosno 51 % respektivno (Slika 4.22).

Dobijeni podaci jasno ukazuju na to da je moguće detektovati nCPI u podlogama nakon rasta bakterija.



Slika 4. 21. Detekcija nCPI dot blotom u fermentacionom medijumu u kome su rastle bakterije (*A. tumefaciens*, *B. cepacia* and *E. carotovora*). Pozitivna kontrola predstavlja odgovarajuću količinu nCPI u sterilnom TSB medijumu. Kontrola 2'AB – anti zečiji IgG obeležen alkalnom fosfatazom



Slika 4. 22. Kvantifikacija nCPI u medijumu u kome su rastle bakterije *E. carotovora* (belo), *B. cepacia* (svetlo sivo) i *A. tumefaciens* (tamno sivo). Pozitivna kontrola (crno) predstavlja maksimum detekcije, tj. seriju koncentracija nCPI u sterilnom LB medijumu koja je dodavana bakterijama.

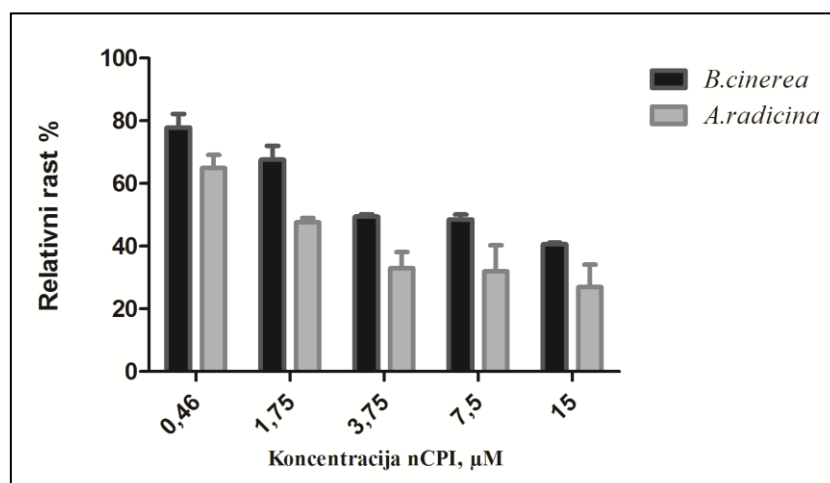
nCPI je inhibirao kazeinolitičku aktivnost u fermentacionoj tečnosti bakterija *A. tumefaciens* i *B. cepacia* do 53 % odnosno 30 %, respektivno, dok inhibicija nije pokazana za proteaze prisutne unutar ćelija (tabela 4.2)

Tabela 4. 2. Inhibicija kazeinolitičke aktivnosti u fermentacionoj tečnosti i lizatima ćelija *A. tumefaciens* i *B. cepacia*

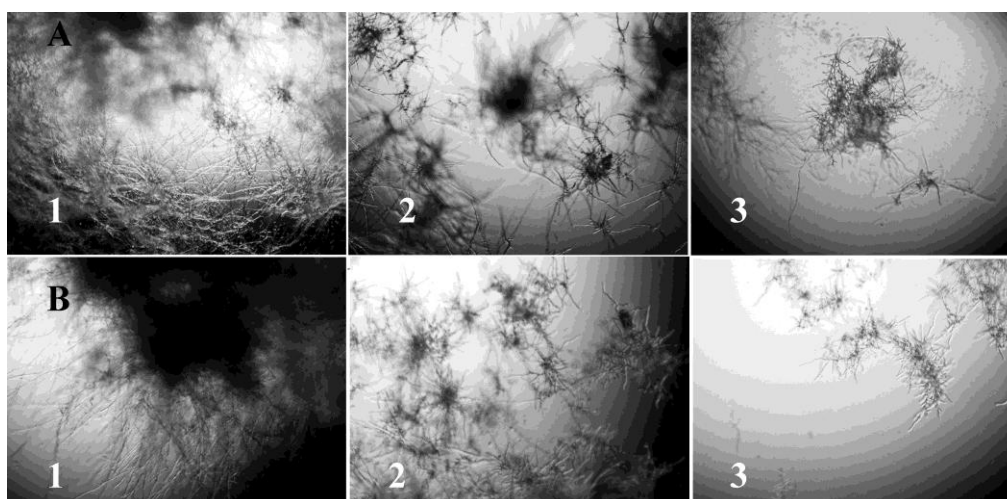
nCPI koncentracija (μM)	% inhibicije ekstracelularnih proteaza		% inhibicije unutarćelijskih proteaza	
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>B. cepacia</i>
1,25	32,4061	2,472495	/	/
2,5	34,21418	7,142867	/	/
5	37,96943	10,98898	/	/
10	52,99029	29,39559	/	/

4.3.9 *In vitro* i *in vivo* antifungalna aktivnost nCPI

Da bi se ispitala biološka aktivnost nCPI rađen je *in vitro* antifungalni esej sa izolatima fitopatogenih gljiva *Alternaria radicina* i *Botrytis cinerea*. Maksimalnan rast micelijuma postignut je u kontrolnim kulturama koje su rasle u medijumu bez dodatka nCPI. U prisustvu 15 μM CPI rast gljive *A. radicina* smanjen je na 40,6 %, dok je rast gljive *B. cinerea* smanjen na svega 26,9 % (Slika 4.22.) što pokazuje sposobnost nCPI da utiče na rast obe gljive. Uticaj nCPI na rast ispitivan je i mikroskopskom analizom preparata gljiva (Slika 4.23._A i 4.23._B). U kontrolnim uzorcima koji su gajeni bez prisustva inhibitora hife su bile u potpunosti razvijene (Slika 4.23._{A.1.} i 4.23._{B.1.}). U prisustvu nCPI micelijarni rast je inhibiran (Slika 4.23._{A.2.}, 4.23._{A.3.}, 4.23._{B.2.}, 4.23._{B.3.}). Ovi rezultati pokazuju da nCPI poseduje antifungalnu aktivnost u mikromolarnom nivou. Efektivna koncentracija nCPI pri kojoj se postiže 50 % inhibicije rasta EC_{50} iznosi 2,06 μM za *A. radicina*, odnosno 1,70 μM za *B. cinerea*.



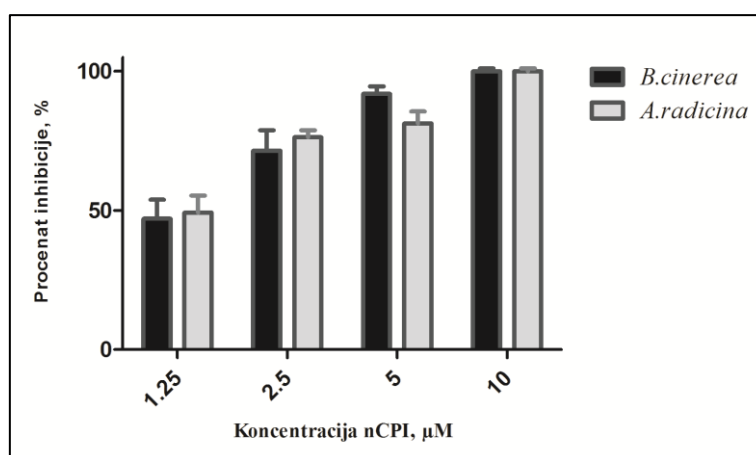
Slika 4. 23. Efekat nCPI na rast fitopatogenih gljiva *A. radicina* (sivo) i *B. cinerea* (crno). 10^4 spora je inkubirano u 100 μL TSB (tripton soja bujon) na 30°C 48 h u prisutvu različitih koncentracija inhibitora. Rast je praćen merenjem apsorbance na 620 nm i izražen je kao relativni rast u % u odnosu na kontrolni uzorak koji je gajen bez nCPI. Greške predstavljaju standardnu devijaciju triplikata merenja.



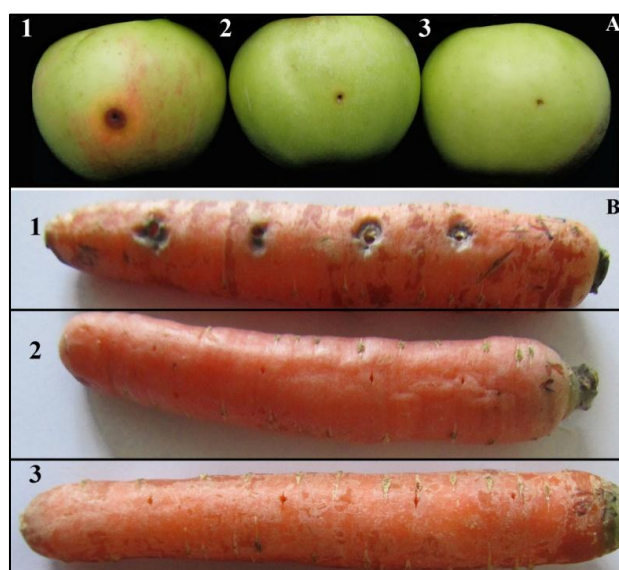
Slika 4. 23. Inhibicija rasta gljive (A) *Alternaria radicina* i (B) *Botrytis cinerea* posmatrano u prisustvu nCPI 1) 0 μM 2) 3,75 μM i 3) 15 μM . Uzorci su slikani 48 h nakon inokulacije pod uvećanjem 40x.

Uticaj različitih koncentracija nCPI na germinaciju konidija prikazan je na slici 4.24. Pri najmanjoj koncentraciji nCPI (1,25 μM) klijanje konidija oba izolata smanjeno je preko 40 % (49.3 za *A. radicina* i 47.0 za *B. cinerea*) dok je potpuna inhibicija postignuta pri koncentraciji nCPI od 10 μM .

Ispitivanjem *in vivo* antifungalne aktivnosti nCPI prkazano je na slici 4.24 i tabeli 4.3. Sedam dana nakon inokulacije ploda jabuke suspenzijom konidija gljive *B.cinerea*, rane su bile inficirane i pokazivale su znakove nekroze. Sve rane koje su tretirane 10 μM nCPI nisu pokazivale simptome truljenja (tabela 4.3 Slika 4.24_A). Sličan efekat primećen je i na korenju šaragarepe (tabela 4.3 Slika 4.24_B). Rane koje su inokulisane samo suspenzijom konidija *A. radicina* bile su inficirane i pokazivale su simptome truljenja dok one tretirane 10 μM CPI nisu. Kontrolni uzorci tretirani 2 % rastvorom glukoze i 10 μM nCPI u 2 % rastvoru glukoze takođe nisu pokazivali simptome nekroze.



Slika 4. 23. Uticaj različitih koncentracija nCPI na klijanje spora *A.radicina* (crno) i *B.cinerea* (sivo). Greške predstavljaju standardnu devijaciju pentaplikata merenja.



Slika 4.24. Efekat nCPI na truljenje voća/povrća izazvano gljivom A) *B.cinerea* B) *A.radicina*. Inokulum je sadržavao 1) 10^4 konidija/mL 2) 10 μM nCPI 3) 10 μM nCPI i 10^4 konidija/mL

Tabela 4. 3. Efekat nCPI na truljenje voća/povrća izazvano gljivama *B. cinerea* i *A. radicina*. negativna kontrola: rane tretirane 2 % rastvorom glukoze u dejonizovanoj vodi; nCPI kontrola: rane tretirane 10 μ M rastvorom nCPI u 2 % rastvoru glukoze u dejonizovanoj vodi; Pozitivna kontrola: rane tretirane suspenzijom konidija (10^4 konidija/mL) u 2 % rastvoru glukoze u dejonizovanoj vodi; nCPI (10 μ M) + suspenzija konidija: rane tretirane suspenzijom konidija (10^4 konidija/mL) u rastvoru nCPI u 2 % rastvoru glukoze u dejonizovanoj vodi

Tretman	% inficiranih rana	
	<i>B. cinerea</i>	<i>A. radicina</i>
Negativna kontrol (dH ₂ O)	0	0
nCPI (10 μ M) kontrola	0	0
Pozitivna kontrola (suspenzija konidija)	100	100
nCPI (10 μ M) + suspenzija konidija	0	0

nCPI je pokazao i sposobnost da inhibira cistein proteaznu aktivnost u ćelijskim lizatima i fermentacionim tečnostima oba izolata gljiva (tabela 4.4.). Veći inhibicioni uticaj ispoljio je na *B. cinerea* kako na porteaze u ćelijskom lizatu (60 %), tako i na one ekstracelularne (22 %). Na *A. radicina* je takođe ispoljen uticaj ali je on bio veći na ekstracelularne proteaze (28 %) nego na unutarćelijske (18 %).

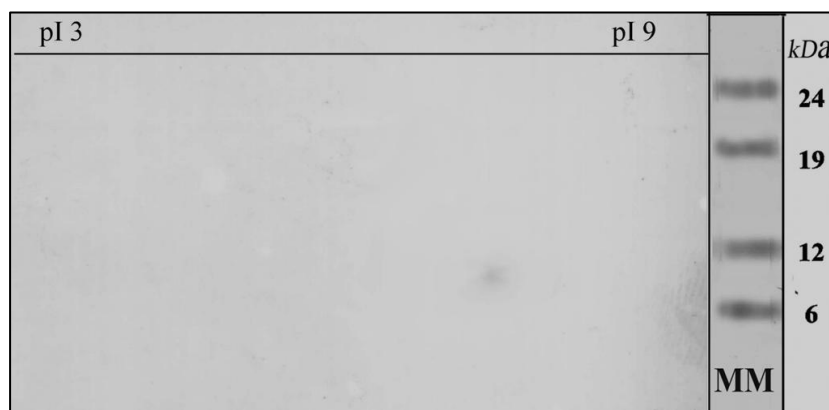
Tabela 4. 4. Uticaj nCPI na kazeinolitičku aktivnost proteaza prisutnih u ćelijskim lizatima i fermentacionim tečnostima gljiva *A. radicina* i *B. cinerea*.

Koncentracija nCPI (μ M)	% inhibicije extracelularnih proteaza		% inhibicije unutarćelijskih proteaza	
	<i>B. cinerea</i>	<i>A. radicina</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>A. radicina</i>
1,25	8,82	8,05	16,07	4,65
2,5	12,75	23,69	20,24	6,97
5	16,86	25,86	29,17	7,44
10	21,93	27,39	59,52	17,67

4.4 Karakterizacija rCPI

4.4.1 Određivanje pI vrednosti rCPI

Izoelektrična tačka rCPI određena je 2D Western blotom. Uzorci su analizirani po protokolu opisanom u delu 7.5.1.6. 2D Western blot je razvijen zečijim poliklonskim anti-fitocistatin antiserumom (1: 50 000). Prečišćeni rCPI dao je jednu tačku na 2D imunoblotu (Slika 4.25.). Određena pI vrednost od 8,2 uklapa se sa teorijskom pI vrednosti za ovaj molekul (8,17) (izračunato u ProtParam programu <http://web.expasy.org/protparam/>)[119].



Slika 4.25. 2D PAGE imunoblot prečišćenog rCPI. Detekcija je radena zečijim poliklonskim anti-cistatin antiserumom MM) proteinski markeri masa (*Serva*)

4.4.2 N-terminalno sekvenciranje i masena analiza rCPI

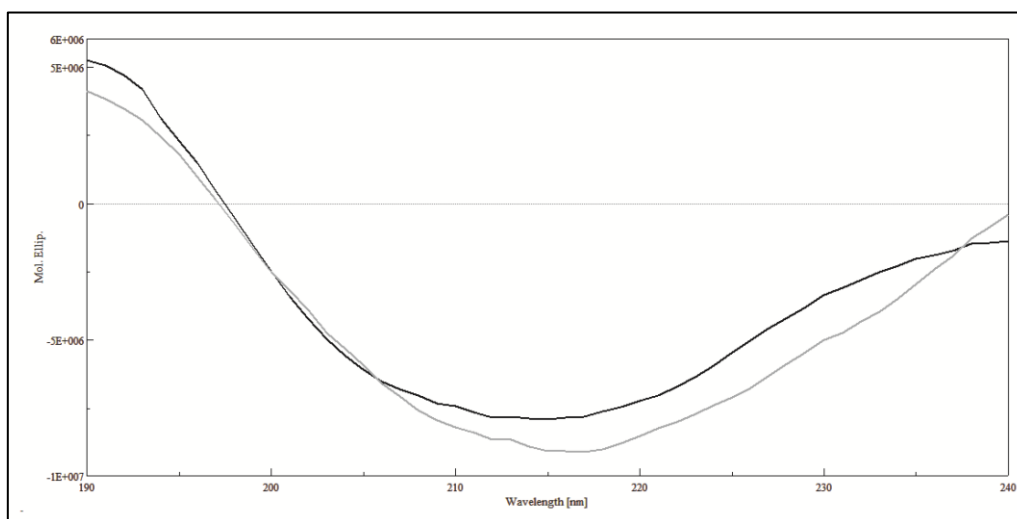
Da bi se potvrdio identitet prečišćenog proteina rCPI je transferovan na PVDF membranu i potom analiziran Edmanovom degradacijom. Petnaest identifikovanih aminokiselina (¹MVAAGGXRPIESLNSA¹⁵) potvrdilo je da eksprimirani protein odgovara po sekvenci zrelom nCPI (NCBI AAR92223). Analizom masenog otiska prsta rCPI (Slika 4.26.) potvrđeno je prisustvo više od 70 % sekvence proteina.

1	10	20	30
<u>MVAAGGWRPI</u>	<u>ESLNSAEVQD</u>	VAQFAVSEHN	
31	40	50	60
<u>KQANDELQYQ</u>	<u>SVVRGYTQVV</u>	AGTNYRLVIA	
61	70	80	90
<u>AKDGAUVGNV</u>	<u>EAVVWDKPWM</u>	HFRNLTSFRK	
91	100	101	
<u>VGSRSHHHHH</u>	H		

Slika 4.26. Aminokiselinska sekvenca rekombinantnog kivi cistatina. Podvučeno-aminokiselinski ostaci potvrđeni Edmanovom degradacijom, masnim slovima označene su peptidi čija sekvenca je potvrđena ESI TQD analizom.

4.4.3 CD spektroskopska analiza rCPI

CD spektroskopija, koja je osjetljiva na doprinos različitih sekundarnih struktura, korišćena je da bi se utvrdila konformacija rCPI. Rekombinantni CPI pokazao je identičan CD spektar spektru nCPI (Slika 4.27). Identičan je bio i sastav sekundarnih struktura. CD spektar nCPI i rCPI (Slika 4.27) sniman je od 190 nm do 240 nm. rCPI pokazao je minimum u na 215 nm isto kao i nCPI. Upotrebom K2D algoritma predviđeno je da oba molekula imaju 37 % α -heliksa, 28 % β -pločice i 38 % slučajno uvijenog niza.



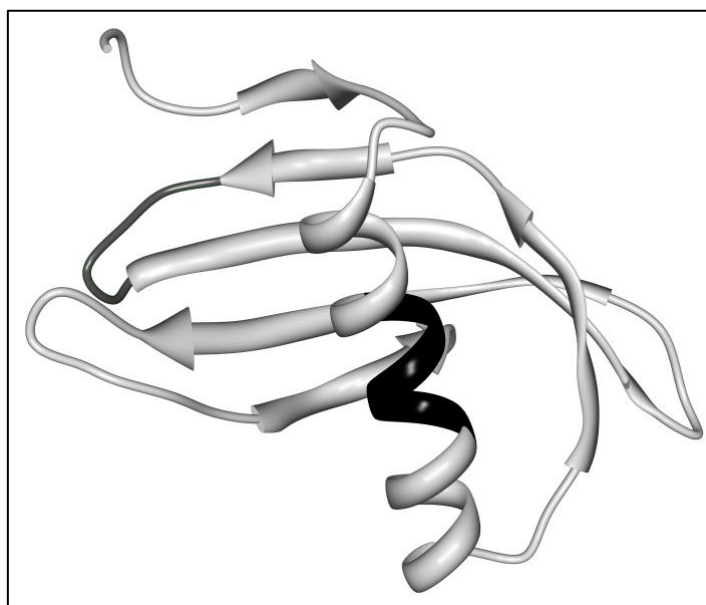
Slika 4.27. CD spektar rCPI (sivo) i nCPI (crno) sniman od 190 – 240 nm.

4.4.4 Predviđanje trodimenzionalne strukture rCPI

rCPI ima predviđenu trodimenzionalnu strukturu sličnu strukturi OC-I cistatina iz pirinča *Orizum sativum* (Slika 4.29.). rCPI sadrži α -heliks u kome je lociran konsenzus motiv karakterističan za fitocistatine, AQFAV kao i šest antiparalelnih β -pločica (β 1 β 2 β 3 β 4 β 5 β 6) (Slika 4.28.). Motiv QVVAG koji je bitan za aktivnost rCPI lociran je pri kraju treće β -pločice (β 3) u petlji koja je spaja sa sledećom β -pločicom (β 4).

RCPI	MVAAGGWRPIESLNSAEVQDVAQFAVSEHNKQANDELQYQSVVRGYTQVV
OC1	--VLGGVEPVGNENDLHLVDLARFAVTEHNKKANSLEFEKLVSVKQQVV
	. ** .*: . * . .: **:****:****:***. *:::.* ***
RCPI	AGTNYRLVIAAKDGAVVGNIEAVVWDKPMHFRNLTSFRKVGSRSHHHHH
OC1	AGTLYYFTIEVKEGDAKKLYEAKVWEKPMDFKELQEFKPVDA-----
	*** * :.* .*:* . *** **:****:****:***. *: *.:
RCPI	H
OC1	S

Slika 4.28. Uparivanje aminokiselinskih sekvenci rCPI i OC-I (PDB broj 1EQK) Zvezdica (*) ukazuje na potpuno konzerviranu aminokiselinu, dve tačke (:) na aminokiselinski ostatak približno iste veličine i hidropatije, tačka (.) na aminokiselinski ostatak čija je veličina ili hidropatija očuvana tokom evolucije.

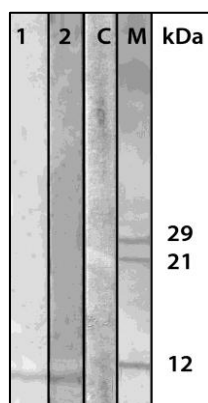


Slika 4. 29. Trodimenzionalni model rCPI dobijen preko Phyre servera. Model je baziran na homologiji sa OC-I cistatinom iz pirinča. AQFAV motiv lociran na α -heliksu je označen crnom bojom, dok je reaktivni centar QVVAG lociran na trećoj β pločici označen sivom bojom.

Molekulsko modelovanje bazirano je na homologiji sa OC-I cistatinom iz pirinča. Ispitivanjem modela pokazano je da se više od 93 % aminokiselinskih ostataka nalazi u dozvoljenim regionima θ - ψ uglova Ramačandranovog dijagrama čime je nivo pouzdanosti 3-D modela veći od 90 %.

4.4.5 IgE reaktivnost rCPI

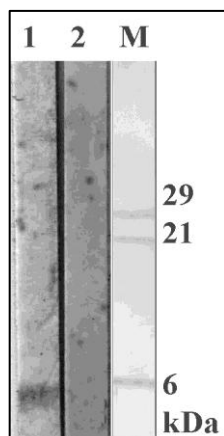
IgE reaktivnost prečišćenog rCPI ispitivana je u Western blotu. rCPI je pozitivno reagovao sa pulom seruma 5 kivi alergičnih pacijenata (Slika 4.30). Iako reaktivnost nCPI nije dokazana u Western blotu, već samo u dot blotu, može se reći da rCPI odgovara po reaktivnosti prirodnom molekulu. Moguća pojava Western blot reaktivnosti može se objasniti promenom seruma pacijenata alergičnih na kivi koji su korišćeni čime se verovatno promenila i specifičnost, kao i upotrebom osetljivijeg sistema detekcije IgE vezivanja.



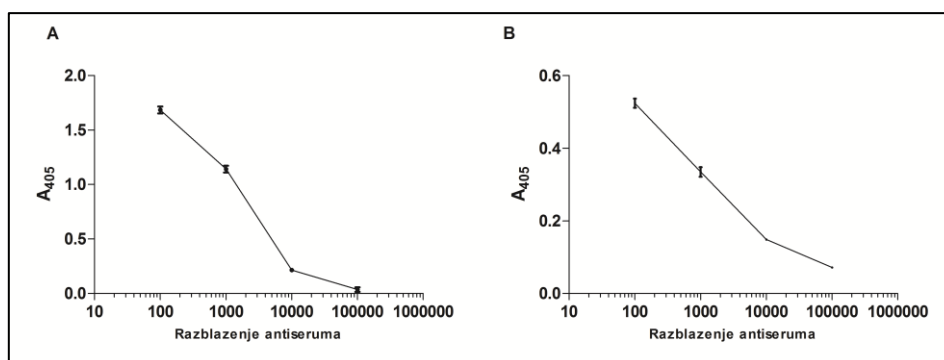
Slika 4.30 IgE reaktivnost prečišćenog rCPI detektovana u Western blotu: 1) membrana bojena Ponceau S 2) prečišćeni rCPI C) kontrola sekundarnog antitela M) proteinski markeri masa (*Serva*)

4.4.6 IgG reaktivnost rCPI

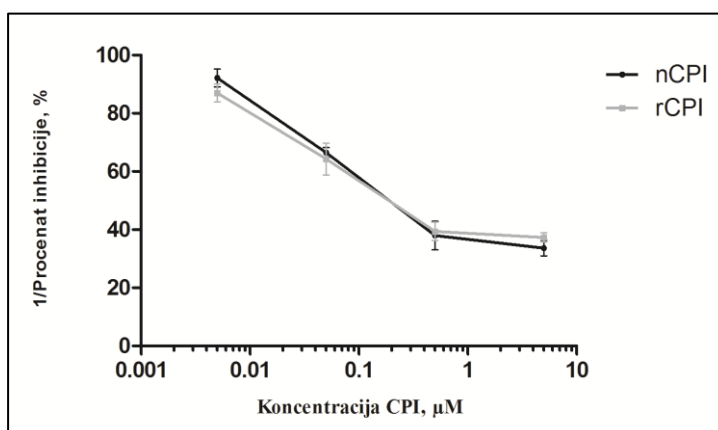
IgG reaktivnost rCPI ispitivana je u Western blotu i ELISA testu korišćenjem zečijeg poliklonskog antiseruma na prečišćenji nCPI. Titar antiseruma za Western blot je optimizovan na pun ekstrakt kivija i određeno je razblaženje od 1:50 000 (Slika 4.31), dok je saturaciona kriva u ELISA testu postavljena na prečišćeni rCPI (5 i 0,5 μ g/bunaru; slika 4.32).



Slika 4. 31. IgG reaktivnost prečišćenog rCPI detektovana u Western blotu: 1) prečišćeni rCPI 2) kontrola sekundarnog antitela M) proteinski markeri masa (Serva)



Slika 4. 32. Određivanje titra zečijeg poliklonskog anti-rCPI antiseruma. Kuplovano je : A) 0,5 µg/bunaru B) 5 µg/bunaru. Greške predstavljaju standardnu devijaciju triplikata merenja.

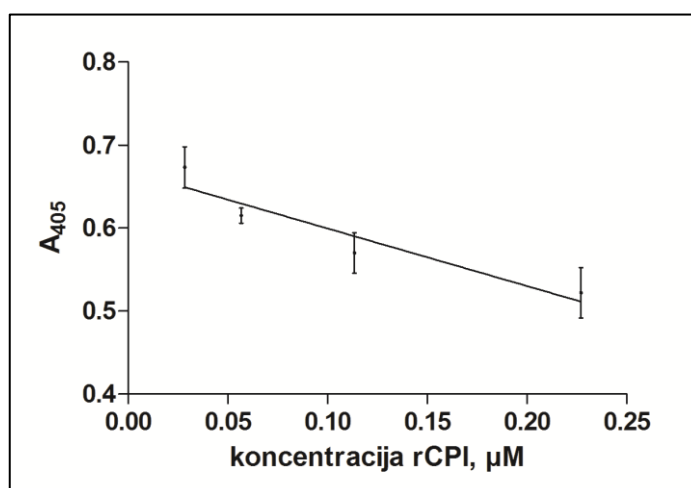


Slika 4. 33. ELISA inhibicija vezivanja zečijeg poliklonskog anti-nCPI antiseruma za prečišćeni nCPI. Inhibicija je radena rastućim koncentracijama nCPI (crna) i rCPI (siva). Greške predstavljaju standardnu devijaciju triplikata merenja.

ELISA inhibicijom dodatno je potvrđeno da rCPI poseduje sličnu imunoreaktivnost kao njegov prirodni pandan (Slika 4.33). Za ELISA inhibiciju kuplovano je 0,5 μg /bunaru prirodnog nCPI, a inhibicija je rađena rastućim koncentracijama nCPI i rCPI. Razblaženje zečijeg poliklonskog anti-fitocistatin antiseruma iznosilo je 1: 50 000. Koncentracije pri kojima se postiže 50 % inhibicije, EC_{50} su iznosile 0,12 μM za nCPI, odnosno 0,11 μM za rCPI.

4.4.7 Određivanje inhibitorne sposobnosti rCPI

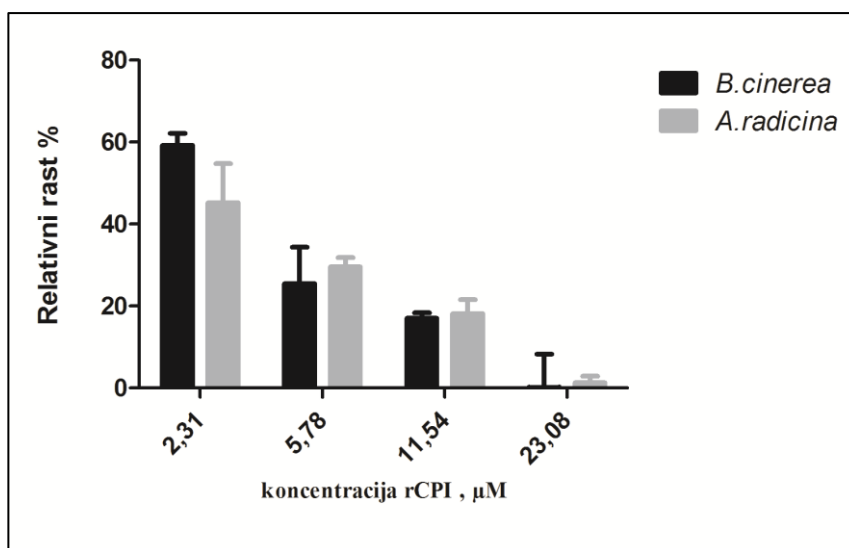
Rekombinantni cistatin je inhibitor papaina i papainu-sličnih cistein proteaza. Za reakciju su korišćeni papain iz lateksa papaje (14 u/mg proteina) i N_{α} -benzoi-L-arginin-etil-estar hidrohlorid. Postupak za određivanje konstante inhibicije opisan je u delu 7.6.1. Merena je ΔA na 405 nm. Dobijeni rezultati su predstavljeni na slici 4.34. Na osnovu dobijenih rezultata koncentracija pri kojoj se postiže 50 % inhibicije papaina EC_{50} iznosila je 2,78 nM. Dobijena EC_{50} je isti red veličine kao ona dobijena za nCPI što još jednom potvrđuje sličnu biološku reaktivnost ova dva molekula.



Slika 4. 34. Grafik inhibicije enzimske aktivnosti papaina različitim koncentracijama rCPI. Greške predstavljaju standardnu devijaciju triplikata merenja.

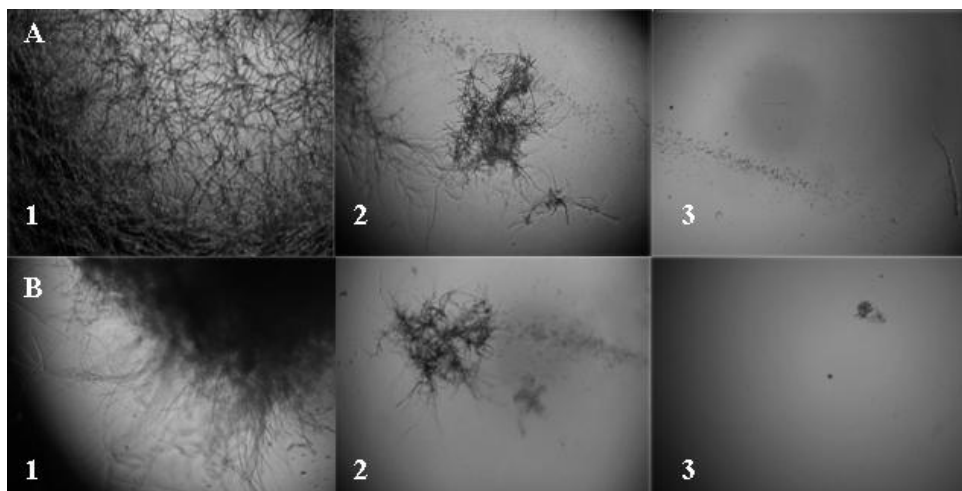
4.4.8 *In vitro* antifungalna aktivnost rCPI

Da bi se ispitala biološka aktivnost rCPI rađen je *in vitro* antifungalni esej sa sojevima fitopatogenih gljiva *A. radicina* i *B. cinerea*. Maksimalnan rast micelijuma postignut je u kontrolnim kulturama koje su rasle u medijumu bez dodatka rCPI. U prisustvu 23,08 μM CPI rast gljive *A. radicina* smanjen je na 1,28 %, dok je rast gljive *B. cinerea* smanjen na svega 0,16 % (Slika 4.35.) što pokazuje sposobnost rCPI da utiče na rast obe gljive. Uticaj rCPI na rast ispitivan je i mikroskopskom analizom preparata gljiva (Slika 4.36._A i 4.36._B). U kontrolnim uzorcima koji su gajeni bez prisustva inhibitora hife su bile u potpunosti razvijene (Slika 4.36._{A.1.} i 4.36._{B.1.}). U prisustvu 28 μM nCPI micelijarni rast je inhibiran (Slika 4.36._{A.2.}, Slika 4.33._{A.3.}, 4.36._{B.2.}, Slika 4.36._{B.3.}).



Slika 4. 35. Efekat rCPI na rast fitopatogenih gljiva *A. radicina* (sivo) i *B. cinerea* (crno). 10^4 spora je inkubirano u 100 μL TSB (tripton soja bujon) na 30°C 48 h u prisutvu različitih koncentracija inhibitora. Rast je praćen merenjem apsorbance na 620 nm i izražen je kao relativni rast u % u odnosu na kontrolni uzorak koji je gajen bez nCPI. Greške predstavljaju standardnu devijaciju triplikata.

Ovi rezultati pokazuju da rCPI poseduje antifungalnu aktivnost na mikromolarnom nivou. Efektivna koncentracija rCPI pri kojoj se postiže 50 % inhibicije rasta EC_{50} iznosi 2,19 μM za *A. radicina*, odnosno 2,67 μM za *B. cinerea*. Dobijene vrednosti za rCPI su isti red veličine kao one dobijene za nCPI, pri čemu se dodatno potvrđuje slična biološka reaktivnost ova dva molekula.

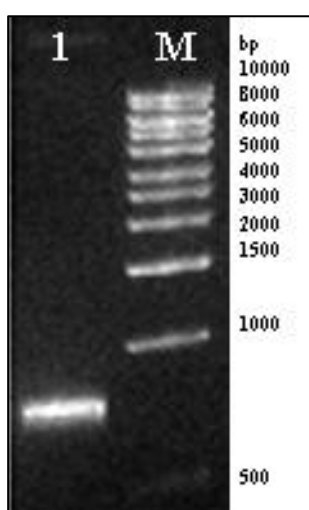


Slika 4. 36. Inhibicija rasta gljive (A) *Alternaria radicina* i (B) *Botrytis cinerea* posmatrano u prisustvu rCPI 1) 0 μM 2) 5,78 μM i 3) 23,08 μM . Uzorci su slikani 48 h nakon inokulacije pod uvećanjem 40x.

4.5 Kreiranje, selekcija i proizvodnja mutanata aktinidina

4.5.1 Amplifikacija gena za aktinidin lančanom reakcijom polimeraze

Amplifikacija gena za aktinidin rađena je lančanom reakcijom polimeraze koristeći prajmere koji pored sekvence komplementarne genu za zrelu formu aktinidina sadrže i sekvence za restrikcione endonukleaze *Nhe* I and *Sal* I. Dobijeni PCR proizvod analiziran je agaroznom gel elektroforezom (Slika 4.37). Analizom PCR proizvoda (Slika 4.37) utvrđeno je PCR reakcija dala specifični proizvod odnosno da je umnoženi fragment DNK odgovarajuće veličine (750 bp).



Slika 4. 37. Analiza PCR reakcije agaroznom gel elektroforezom: 1) PCR proizvod dobijen amplifikacijom gena aktinidin M) DNK markeri (1 kB DNA ladder, *New England Bio Labs*)

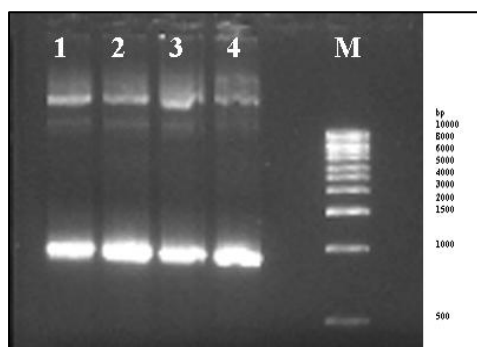
4.5.2 Kloniranje aktinidina u pCTCON2 ekspresioni vektor

Nakon PCR reakcije PCR proizvod je prečišćen upotrebom GeneJET™ kompleta za prečišćavanje (*Fermentas*). Nakon prečišćavanja PCR proizvod je podvrgnut digestiji sa enzimima *Nhe* I i *Sal* I. Isti postupak je urađen i za vektor za ekspresiju pCTCON2.

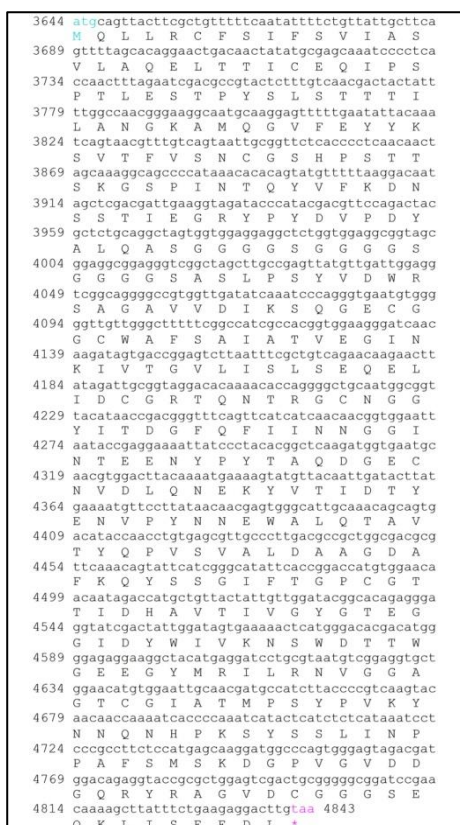
Po digestiji insert i vektor su prečišćeni i postavljena je reakcija ligacije. Ligaciona smeša je korišćena za transformaciju ćelija DH5α koje su potom gajene na LA podlozi sa ampicilinom. Pojedinačni klonovi dobijeni transformacijom DH5α ćelija konstruktom pCTCON2-aktinidin^{wt} zasejani su u tečnu LB podlogu i gajeni preko noći

na 37°C nakon čega je iz njih izolovan plazmid korišćenjem GenJET™ kompleta za izolovanje plazmida (*Fermentas*) prema uputstvima proizvođača.

Prisustvo inserta u izolovanim konstruktima pCTCON2-aktinidin^{wt} analizirano je PCR-om, a dobijeni PCR proizvodi dalje agaroznom gel elektroforezom (Slika 4.38.). Klonovi koji su dali pozitivnu reakciju poslani su na sekvenciranje. Sekvenciranjem je potvrđeno da je kloniranje gena za aktinidin bilo uspešno (Slika 4.39)



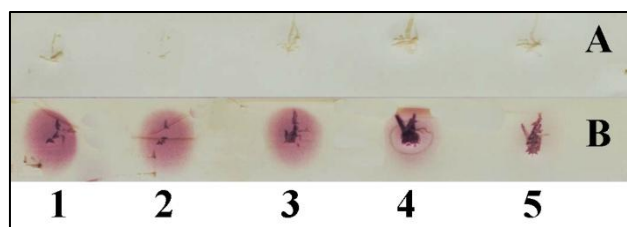
Slika 4. 38. Analiza PCR reakcije agaroznom gel elektroforezom: 1)-4) PCR proizvod dobijen amplifikacijom gena za aktinidin iz izolovanih pCTCON2-aktinidin^{wt} konstrukata M) DNK markeri (1 kB DNA ladder, *New England Bio Labs*)



Slika 4.39. ORF analiza sekvenciranih pCTCON2-aktinidin^{wt} konstrukta sa Aga 2p lider sekvencom i c-mic epitopom

Klonovi aktinidina kojima je potvrđena odgovarajuća sekvencen korišćeni su za transformaciju EBY-100 ćelija. Ćelije su transformisane po protokolu opisanom u delu 7.8.9. korišćenjem litijum acetata i denaturisane DNK iz sperme losa kao nosača. Ćelije su gajene u selektivnoj podlozi (YNB-CAA sa glukozom) i nakon indukcije (YNB-CAA sa galaktozom) protein je ispran sa površine ćelija dodatkom PBS odnosno pufera za kuplovanje (CB) koji sadrži 1 mM DTT. Nakon inkubacije od 1h na st supernatant

koji je odvojen od ćelija centrifugiranjem korišćen je za dalju analizu. Ekspresija je analizirana dot-blotom. Za detekciju je korišćen zečiji poliklonski anti-aktinidin anti-serum (Slika 4.40). Ćelije transformisane praznim pCTCON2 vektorom su korišćene kao kontrola (Slika 4.40; A5,B5)

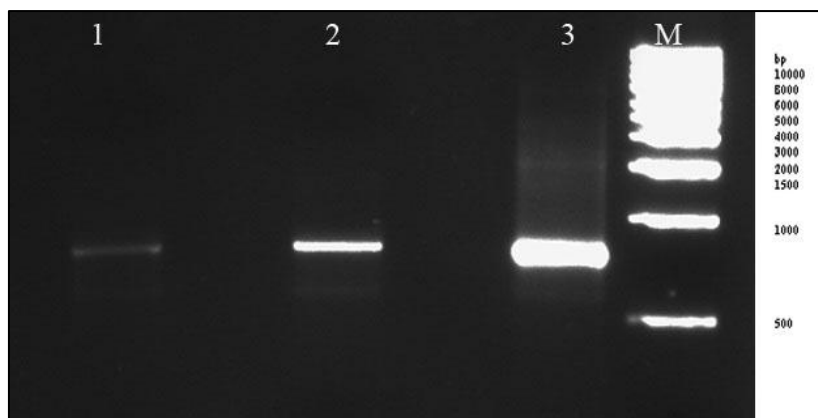


Slika 4. 40. Dot blot analiza ekspresije aktinidina na površini EBY 100 ćelija: A1)-5) antizečije antitelo obeleženo AP; B1)-4) aktinidin 5) prazne ćelije

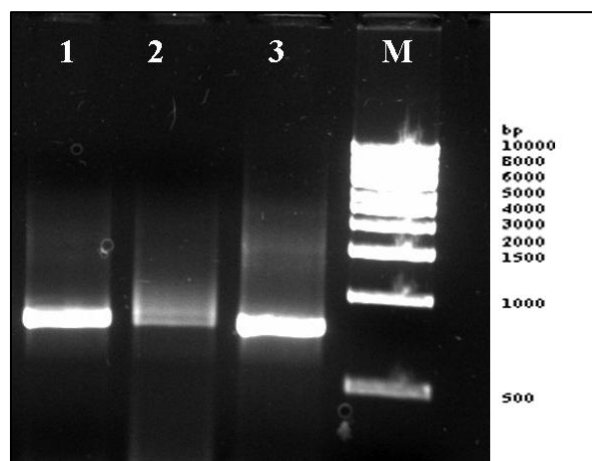
4.5.3 Diverzifikacija gena za aktinidin lančanom reakcijom polimeraze sklone greškama

Diverzifikacija gena za aktinidin postignuta je lančanom reakcijom polimeraze sklone greškama epPCR (*engl.* error-prone PCR) korišćenjem analoga baza 2'-Deoksi-P-nukleozid-5'-trifosfat (dPTP, *Jena Bioscience*) i 8-Okso-2'-deoksiguanozine-5'-trifosfat (8-Oxo-dGTP, *Jena Bioscience*) [120].

Diverzifikacija gena za aktinidin rađena je lančanom reakcijom polimeraze koristeći prajmere koji pored sekvence komplementarne genu za zrelu formu aktinidina sadrže i sekvence za restrikcione endonukleaze Nhe I and Sal I. Dobijeni PCR proizvod analiziran je agaroznom gel elektroforezom (Slika 4.41), a potom je izolovan iz gela. Da bi se povećala količina DNK dobjena diverzifikacijom gena za aktinidin ponovljena je PCR reakcija prema protokolu opisanom u delu 7.8.7. Kao templat za ovu PCR reakciju korišćene su biblioteke dobijene diverzifikacijom gena za aktinidin epPCR-om. Analizom PCR proizvoda (Slika 4.42) utvrđeno je da je reakcija dala specifični proizvod i da je dobijeni fragment odgovarajuće veličine (750 bp).



Slika 4. 41. Analiza epPCR reakcije agaroznom gel elektroforezom: 1)-3) PCR proizvod dobijen diverzifikacijom gena za aktinidin M) DNK markeri (1 kb DNA ladder, *New England Bio Labs*)



Slika 4.42. Analiza PCR reakcije agaroznom gel elektroforezom: 1)-3) reamplifikovani PCR proizvod dobijen diverzifikacijom gena za aktinidin M) DNK markeri (1 kb DNA ladder, *New England Bio Labs*)

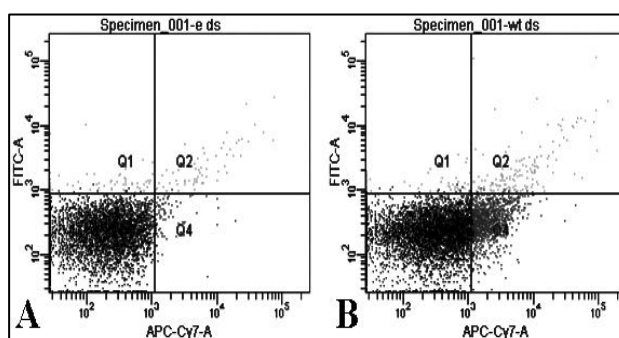
4.5.4 Kloniranje diverzifikovanog gena za aktinidin u pCTCON2 vektor

Biblioteka dobijena diverzifikacijom aktinidina uklonirana je u pCTCON2 vektor na isti način kao i sam aktinidin. Biblioteka je korišćena za transformaciju EBY 100 ćelija. Postignuta efikasnost transformacije iznosila je 2×10^7 cells/ μ g DNK.

4.5.5 Sortiranje biblioteka aktinidina protočnom citometrijom.

Radi dobijanja mutanta aktinidina sa smanjenim IgE vezivanjem biblioteka je razdvajana korišćenjem protočne citometrije. Ćelije su bojene fluorescentno obeleženim anitetelima prema protokolu opisanom u delu 7.8.11. Selektovane su ćelije koje su bile IgG pozitivne (detektovano sa zečijim poliklonskim anti-aktinidin antiserumom) i IgE negativne (detektovano sa pulom seruma pacijenata alergičnih na kivi). Ćelije koje su transformisane pCTCON2-aktinidin^{wt} korišćene su kao pozitivna kontrola, dok su ćelije dobijene transformacijom praznim pCTCON2 vektorom korišćene kao negativna kontrola (Slika 4.43.)

Biblioteka je sortirana u 3 ciklusa tako što je u prva dva ciklusa odvojena čitava IgG pozitivna/IgE negativna populacija, a u trećem ciklusu su odvajane pojedinačne ćelije. Sortiranjem je postignuto obogaćivanje željene populacije ćelija (IgE negativne/IgG pozitivne) dok se populacija duplo pozitivnih smanjuje (Tabela 4.5).



Slika 4. 43. Tačkasti prikaz fluorescentno obojenih ćelija
 A) EBY 100/pCTCON 2 prazan vektor B) EBY 100/pCTCON 2-aktinidin^{wt}. Q1 IgE pozitivne/IgG negativne; Q2 IgE pozitivne/IgG pozitivne, Q4 IgE negativne/IgG pozitivne ćelije

Tabela 4.5. Efikasnost sortiranja biblioteka protočnom citometrijom

Runda sortiranja	Br. IgE pozitivnih ćelija	Br. IgG pozitivnih ćelija	% of IgE/IgG pozitivnih ćelija
1	124	291	42.6
2	130	658	19.8
3	99	588	16.9

4.5.6 Analiza sortiranih biblioteka imunoheмиjskim metodama

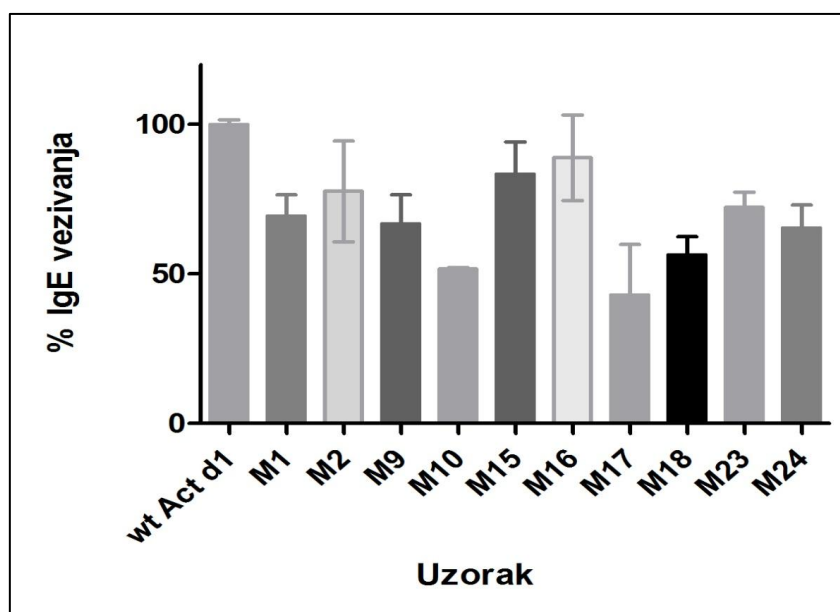
Nakon treće runde sortiranja biblioteka, sposobnost dobijenih pojedinačnih mutanata da vežu IgE analizirana je dot blotom i direktnim ELISA testom. Ćelije su gajene u selektivnoj podlozi (YNB-CAA sa glukozom) i nakon indukcije (YNB-CAA sa galaktozom) protein je ispran sa površine ćelija dodatkom PBS odnosno pufera za kuplovanje (CB) koji sadrži 1 mM DTT. Nakon inkubacije od 1h na st supernatant koji je odvojen od ćelija centrifugiranjem korišćen je za dalju analizu.

U slučaju dot blot analize na nitroceluloznu membranu naneto je 5 µg supernatanta dobijenog ispiranjem ćelija kvasca po tački (određeno Bradfordovom metodom za određivanje koncentracije proteina) kao što je opisano u delu 7.5.2. Supernatant dobijen ispiranjem ćelija transformisanih sa pCTCON2-aktinidin^{wt} je korišćen kao pozitivna kontrola, dok je supernatant dobijen ispiranjem ćelija koje su transformisane praznim pCTCON2 vektorom korišćen kao negativna kontrola. Vezivanje IgE antitela iz seruma pacijenata alergičnih na kivi detektovano je denzitometrijski korišćenjem Gel-Pro 4.1. programa. Rezultati su prikazani u tabeli 4.6.

Tabela 4.6. Denzitometrijska analiza dot blot detekcije mutanata akinidina.

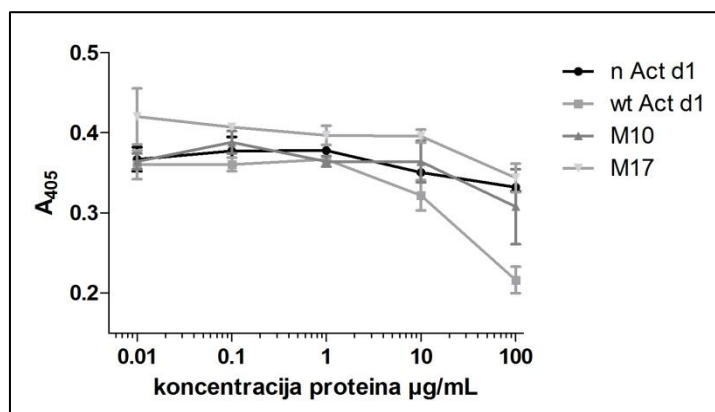
Mutant br.	Količina detektovanog vezivanja	Mutant br.	Količina detektovanog vezivanja
1	0	17	0
2	0	18	0
3	574,996	19	198,518
4	1351,71	20	1556,46
5	1551,88	21	1181,52
6	1579,61	22	467,202
7	790,197	23	2193,86
8	1330,02	24	2040,99
9	0	25	30,7355
10	6,25818	26	169,569
11	278,391	27	1019,59
12	1515,2	28	988,968
13	632,211	29	778,353
14	1513,78	30	976,341
15	2468,06	31	1039,53
16	2477,9	32	1807,38

Za pločicu je kuplovano 0,5 µg proteina po bunaru (određeno Bradfordovom metodom za određivanje koncentracije proteina). Supernatant dobijen ispiranjem ćelija transformisanih sa pCTCON2-aktinidin^{wt} je korišćen kao pozitivna kontrola, dok je supernatant dobijen ispiranjem ćelija koje su transformisane praznim pCTCON2 vektorom korišćen kao negativna kontrola. Selektovani su sledeći mutanti: M10 i M 17 za dalju analizu (Slika 4.44.)



Slika 4. 44. ELISA esej: Vezivanje IgE iz seruma pacijenata alergičnih na kivi za mutante selektovane protočnom citometrijom i dot blotom. Greške predstavljaju standardnu devijaciju triplikata merenja.

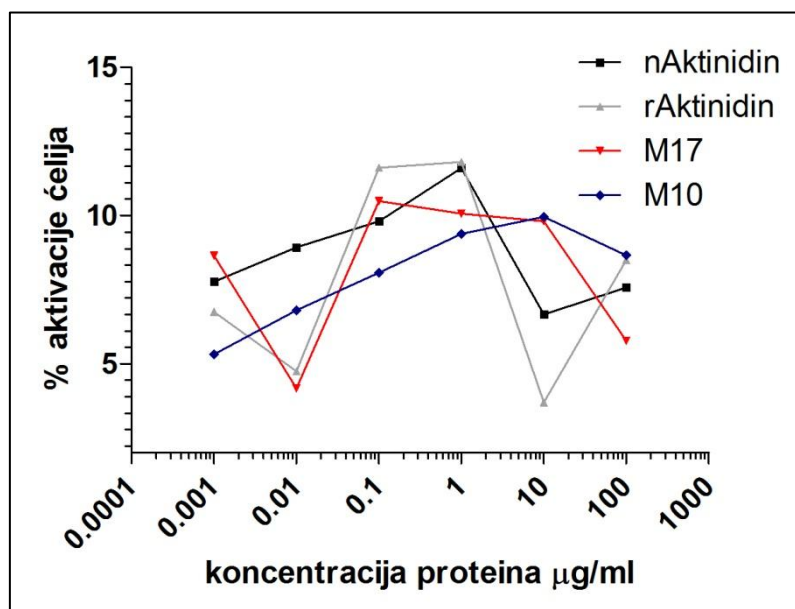
Nakon direktnog ELISA testa urađena je ELISA inhibicije. Supernatant dobijen ispiranjem ćelija transformisanih sa pCTCON2-aktinidin^{wt} kuplovan je za pločicu (0,1 μg proteina po bunaru određeno Bradfordovom metodom za određivanje koncentracije proteina). Inhibicija je rađena kako je opisano u delu 7.4.2.3. Za inhibiciju su korišćene različite koncentracije mutanata (100-0,001 $\mu\text{g}/\text{mL}$) koje su preinkubirane sa serumima pacijenata.



Slika 4. 45. IgE ELISA inhibicija: Inhibicija vezivanja IgE iz seruma pacijenata alergičnih na kivi različitim koncentracijama mutanta (10 i 17). Greške predstavljaju standardnu devijaciju triplikata merenja.

Određivanje praga osetljivosti bazofila kod pacijenta alergičnog na kivi prema prirodnom aktinidinu, rekombinantnom aktinidinu i mutantima 10 i 17 praćeno je detekcijom ekspresije površinskih markera CD63 i CD203c. Sposobnost prirodnog i rekombinantnog aktinidina kao i mutanata 10 i 17 da stimulišu ekspresiju molekula CD63 na CD203c indentifikovanim bazofilima praćeno je kao mera aktivacije ćelija i izražavano kao % aktiviranih bazofila u ukupnoj populaciji. Anti-IgE antitelo je korišćeno kao pozitivna kontrola dok je PBS korišćen kao negativna kontrola.

Test određivanja praga aktivacije bazofila pokazao je da mutanti 10 i 17 imaju smanjenu sposobnost aktivacije (manji procenat aktivacije ćelija) u odnosu na prirodni i rekombinantni aktinidin (Slika 4.46).



Slika 4. 46. Određivanje praga osetljivosti aktivacije bazofila kivi alergičnog pacijenta prema: prirodnom aktinidinu (crna), rekombinantnom aktinidinu (svetlo siva), mutantu 17 (crvena) i mutantu 10 (plava).

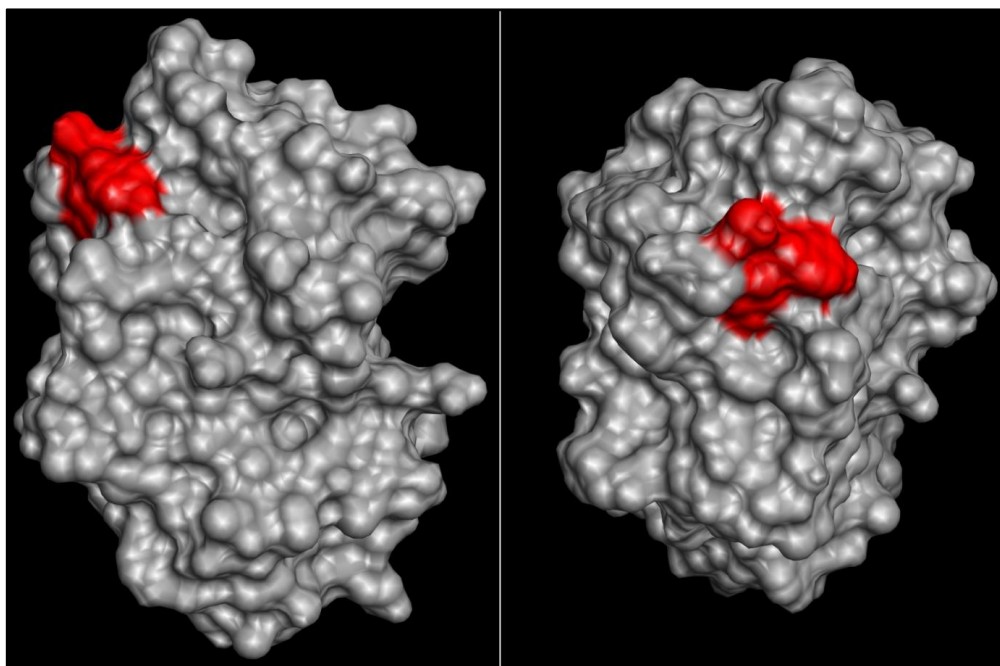
4.5.7 Određivanje sekvence mutanta i molekulsko modelovanje

Nakon izolovanja iz ćelija kvasca plazmidi su poslani na DNK sekvenciranje i iz sekvence DNK molekula je određena i sekvenca proteina. Kod mutanta 10 nisu potvrđene izmene u aminokiselinskoj sekvenci te sa njim nije dalje rađeno. Kod mutanta 17 mutacije se nalaze blizu N-terminalnog dela molekula (Slika 4.47.) i iz

modela aktinidina se može videti da se mutacija nalazi na površini molekula (Slika 4.48).

rAktinidin	S L P S Y V D W R S A G A V V D I K S Q G E C G G C W A F S A I A T V E G I N K I V T G V L I S L S E Q E L I D C G R T 60
mutant	S L P R V C D W R S A G A V V D I K S Q G E C G G C W A F S A I A T V E G I N K I V T G V L I S L S E Q E L I D C G R T 60
.....	
rAktinidin	Q N T R G C N G G Y I T D G F Q F I I N N G G I N T E E N Y F Y T A Q D G E C N V D L Q N E K Y V T I D T Y E N V P Y N 120
mutant	Q N T R G C N G G Y I T D G F Q F I I N N G G I N T E E N Y F Y T A Q D G E C N V D L Q N E K Y V T I D T Y E N V P Y N 120
.....	
rAktinidin	N E W A L Q T A V T Y Q P V S V A L D A N G D A F K Q Y S S G I F T G P C G T T I D H A V T I V G Y G T E G G I D Y W I 180
mutant	N E W A L Q T A V T Y Q P V S V A L D A N G D A F K Q Y S S G I F T G P C G T T I D H A V T I V G Y G T E G G I D Y W I 180
.....	
rAktinidin	V E N S W D T T W G E E G Y M R I L R N V G G A G T C G I A T M P S Y F V K Y N N Q N H F K S Y S S L I N P P A F S M S 240
mutant	V E N S W D T T W G E E G Y M R I L R N V G G A G T C G I A T M P S Y F V K Y N N Q N H F K S Y S S L I N P P A F S M S 240
.....	
rAktinidin	K D G P V G V D D G Q R Y R A G V D C G G G S E Q K L I S E E D L 273
mutant	K D G P V G V D D G Q R Y R A G V D C G G G S E Q K L I S E E D L 273
.....	

Slika 4.47. Uparivanje aminokiselinskih sekvenci rekombinantnog aktinidina i mutanta 17



Slika 4. 48. Trodimenzionalni model aktinidina dobijen difrakcijom x zraka [53]. Crvenom bojom su označeni aminokiselinski ostaci koji su izmenjeni kod mutanta 17.

5 Diskusija

Cistatini su proteinski inhibitori cistein proteaza i široko su rasprostranjeni u biljnom i životinjskom carstvu. Biljni cistatini, ili fitocistatini, odvojeni su u posebnu, evolutivno odvojenu granu cistatinske superfamilije proteina [88]. Postoje III tipa fitocistatina:

- (i) mali molekuli od 10-16 kDa, koji ne sadrže disulfidne mostove i dele homologiju u sekvenci sa familijom 2 životinjskih cistatina [88]
- (ii) molekuli od približno 23 kDa koji sadrže C-terminalni produžetak koji im omogućava da inhibiraju legumain i legumainu slične proteaze [121]
- (iii) multi-cistatini od 60-80 kDa koji sadrže nekoliko cistatinskih domena [122].

Fitocistatini sadrže glicinski ostatak blizu N-terminalnog dela proteina, reaktivno mesto QXVXG i PW ostatak lociran u drugoj polovini molekula. Svi fitocistatini takođe sadrže LARFAVDEHN konsenzus sekvencu u N-terminalnom delu proteina [88].

Fokus ovog rada bila je strukturna, funkcionalna i imunološka karakterizacija fitocistatina (nCPI) iz ploda kivija, kao i produkcija i karakterizacija rekombinantnog fitocistatina (rCPI). Prirodni fitocistatin je izolovan iz ploda kivija primenom papain afinitetne hromatografije. Nakon prečišćavanja dobijen je protein molekulske mase od oko 11 kDa čija pI vrednost je iznosila 6,9. nCPI se u plodu kivija sintetisuje kao pre-protein od 116 aminokiselina, teorijske molekulske mase od 12 775,7 Da i teorijske pI od 9,40. Iz ploda kivija je izolovana zrela forma nCPI kojoj nedostaje prvih 26 i N-terminalnih aminokiselina. Ove aminokiseline predstavljaju signalni peptid čija funkcija je da uputi nCPI u ekstracelularni prostor i tokom procesovanja proteina u ćeliji ova sekvenca se odseca [8].

Masenom analizom nCPI dobijen je molekularni jon koji se razlikuje od teorijski predviđene mase ovog proteina za oko 1 kDa što je u saglasnosti sa prethodno publikovanim podacima [8]. Protivrečnost između teorijski izračunate mase molekula i one praktično određene može se objasniti prisustvom post-translacionih modifikacija, prisustvo dva pika u masenom spektru (slika 4.10) postojanjem različito glikozilovanih izoformi. Prisustvo oligosaharidnih ostataka na molekulu nCPI potvrđeno je testom sa lektinima. Pored Con A, potvrda o prisustvu manoznih ostataka dobijena je i na osnovu vezivanja rekombinantnog BanLec koji je specifičan za unutrašnje α -1,3 veze kao i β -

1,3 veze na razgranatim tri- i penta-manano oligosaharidima [123]. Ovi šećerni motivi predstavljaju jezgro N-glikozilacije kod glikoproteina. Vezivanje AA lektina za nCPI ukazuje na kompleksnu glikansku strukturu, sa fukozom koja je povezana sa N-acetilglukozaminom. Prisustvo N-glikozilacije nije uobičajeno za tip I fitocistatina, te se može reći da nCPI odstupa od ovog pravila.

Nakon procesa prečišćavanja nCPI je pokazao inhibitornu aktivnost prema papainu (EC_{50} 2,47 nM) čime je pokazano da protein zadržava svoju biološku aktivnost.

nCPI je opisan kao IgE vezujuća komponenta ekstrakta kivija [4]. Alergene osobine nCPI ispitane su *in vitro* i *in vivo* testovima. nCPI je pokazao IgE reaktivnost u nativnim uslovima, dok su tretman toplotom i SDS denaturacija smanjili IgE reaktivnost pri korišćenom sistemu za detekciju. Ovaj rezultat sugeriše postojanje konformacionih epitopa na molekulu nCPI. IgE reaktivnost nCPI koja je prethodno pokazana u Western blotu [4] može da bude pripisana korišćenju osetljivijeg sistema za detekciju. U ovoj tezi pokazano je da nCPI izaziva simptome alergije na kivi *in vitro* (degranulacija bazofila) i *in vivo* (kožne probe), i kao takav predstavlja klinički relevantan molekul iz ekstrakta ploda kivija.

Klinička procena IgE reaktivnosti pojedinačnih proteina iz ekstrakta kivija zahtevala bi imunoblotove sa velikom populacijom pacijenta i takva studija obično se bazira na enzimskim esejima [124, 125]. Rezultati do kojih se došlo u ovoj tezi sugerišu da značaj nekih alergena, kao što je nCPI (Act d 4), pri ovakvoj eksperimentalnoj postavci može da bude potcenjen. Prisustvo, kao i količina različitih alergena u biljnom tkivu u mnogome zavisi od zrelosti voća [126, 127] i može da utiče na pouzdanost dijagnostičke procedure [128]. Primena prečišćenih i okarakterisanih alergena umesto alergenih ekstrakta mogla bi da se iskoristi za ocenu alergenog potencijala i kliničkog značaja ovih molekula [129].

IgE reaktivni cistatini, pored kivija, prisutni su i u polenu pelina *Ambrosia artemisifolia* (Amb A CPI) [130] ali i kod životinja npr. Fel d 3 iz peruti mačke [131] i Ani s 4 iz parazitskog crva *Anisaxis sipmlex* [132]. Iako nCPI deli određenu homologiju u sekvenci sa ostalim alergenim cistatinima (40 % Amb a CPI, 27 % Ani s 4, 13 % Fel d 3) dodatni dokazi su potrebni da bi se pokazalo da li između ovih molekula postoji ukrštena reaktivnost koja potiče od sličnosti u sekvenci.

Uloga fitocistatina u biljkama nije razjašnjena. Smatra se da učestvuju u regulaciji endogene proteolitičke aktivnosti tokom sazrevanja biljke i germinacije [133, 134], ali i u zaštiti biljnog tkiva od štetočina (insekata, nematoda, fitopatogenih gljiva i bakterija) [92, 93]. Iako je cistein proteaza aktinidin veoma zastupljena u plodu kivija, činjenica da je aktinidin intracelularni protein [54] i da je K_i vrednost nCPI prema aktinidinu visoka (14 nM), kada se uporedi sa papainom (0,16 nM). Ovi podaci mogu navesti na zaključak da uloga nCPI nije da inhibira aktinidin [8]. Kada se uzme u obzir to da je količina aktinidina u plodu kivija (400 mg/kg svežeg ploda) [135] 60 puta veća nego količina nCPI (6 mg/kg svežeg ploda), te da im je tkivna lokalizacija drugačija može se pretpostaviti da fiziološka uloga nCPI nije da reguliše aktivnost aktinidina tokom razvoja kivija.

Tkivni imuno-print omogućio je jasnu lokalizaciju nCPI u tkivu ploda kivija. nCPI je najzastupljeniji blizu kore i u unutrašnjem korteksu oko semena gde može da ima zaštitnu ulogu. Kolonizacija patogena na voću počinje od kore i napreduje prema korteksu [136] tako da obilje nCPI blizu kore potencijalno može da uspori napredovanje simptoma. Ako se pretpostavi protektivna uloga nCPI onda njegova veća zastupljenost oko semena može da ima zaštitnu funkciju od patogena (gljiva, bakterija itd.)

Efektivna koncentracija kojom se postiže 50 % inhibicije bakterijskog rasta (EC_{50}) *in vitro* za *A. tumefaciens* i *B. cepacia* iznosilo je 7.01 μ M i 3.79 μ M, respektivno. Inhibicija rasta bakterije *E. carotovora* je takođe primećena ali maksimalna koncentracija (15 μ M) koja je korišćena u testovima dovela je do inhibicije rasta od 45 %, tako da EC_{50} nije mogla da se izračuna.

Denzitometrijskom analizom dot blotova bakterijskih fermentacionih tečnosti jasno je pokazano da nCPI ostaje u medijumima tokom procesa rasta. Prisustvo nCPI u medijumima u kojima su rasle bakterije 18 sati nakon inokulacije, ukazuje na to da nCPI nije podložan digestiji bakterijskim ekstracelularnim proteazama. Ovaj podatak može i da pojasni mehanizam inhibicije rasta bakterija usled prisustva nCPI. Kao što je ranije opisano za cistatin iz jajeta, mehanizam inhibicije rasta se zasniva na inhibiciji sekretornih cistein proteaza različitih gram negativnih bakterija [137]. Detekcija nCPI u medijumu u kojem su rasle bakterije ukazuje da nCPI inhibira rast bakterija tako što utiče na aktivnost ekstracelularnih cistein proteaza. Podaci dobijeni u eseju inhibicije

aktivnosti ekstracelularnih proteaza potvrđuju ovu pretpostavku. nCPI je delovao na ekstracelularne proteaze, dok na one prisutne u ćelijskim lizatima nije imao uticaja.

Micelijarni rast gljive *A. radicina* gajene u prisustvu nCPI bio je izmenjen u odnosu na kontrolni uzorak koji je rastao bez inhibitora. Efektivna koncentracija kojom se postiže 50 % inhibicije ćelijskog rasta (EC_{50}) iznosio je 2,06 μM za *A. radicina*. Rast gljive *B. cinerea* podložniji je uticaju nCPI što se vidi i iz niže EC_{50} od 1,70 μM .

Fungalna kontaminacija hrane i potonja kolonizacija i infekcija biljnog i animalnog materijala obično je inicirana kontaktom domaćina sa konidijama, što je praćeno germinacijom. Proces germinacije podrazumeva započinjanje biohemijskih procesa, porast metabolizma i morfološke promene unutar konidije [138, 139]. Inhibicija germinacije fungalnih spora koju pokazuje nCPI jasni je indikator da ovaj molekul ima najveći uticaj na rane faze fungalnog rasta, tj. klijanje spora.

Test patogenosti na voću i povrću pokazao je da 10 μM koncentracija nCPI u potpunosti inhibira fungalnu infekciju *in vivo* (100 % inhibicije) na svim tretiranim ranama, kako na jabuci tako i na šargarepi.

Postoje studije u kojima je korelirano odsustvo proteazne aktivnosti kod gljiva sa njihovim preživljavanjem [140]. Za cistatin iz kestena je jasno pokazano da je uticaj na rast fitopatogenih gljiva povezan sa sposobnošću inhibicije micelijarnih cistein proteaza [93]. Pošto nCPI nije detektovan u medijumu u kome su rasle gljive, nakon eksperimenata *in vitro* inhibicije rasta, jasno je da se mehanizam inhibicije rasta ne zasniva samo na inhibiciji aktivnosti ekstracelularnih cistein proteaza. Iz eksperimenata u kojima je meren uticaj nCPI na kazeinolitičku aktivnost unutarćelijskih i ekstracelularnih proteaza fitopatogenih gljiva pokazano je da nCPI ima efekta i na jedne i na druge. Podaci dobijeni u ovim eksperimentima u saglasnosti su sa inhibicijom rasta gljiva *in vitro* jer su proteaze iz gljive *B. cinerea* osetljivije na uticaj nCPI nego one prisutne u gljivi *A. radicina*.

Mehanizam na osnovu kog fitocistatini inhibiraju rast gljiva još uvek nije poznat. Jedna od mogućnosti je da se inhibicijom proteazne aktivnosti tokom razvoja gljive utiče na sintezu hitina [141]. Ne može se sa sigurnošću tvrditi da li je inhibicija proteolitičke aktivnosti koju CPI pokazuju bitna za njihovo antifungalno dejstvo jer postoje oprečne studije na ovu temu [142, 143]. Mogući mehanizam inhibicije pre može da bude pripisan inhibiciji cistein proteazne aktivnosti neophodne u ranim fazama razvoja gljive

tj. klijanju spora i elongaciji klice, a ne samo inhibiciji cistein proteaza u potpuno razvijenim fungalnim ćelijama.

Rekombinantni CPI je eksprimiran i prečišćen iz inkluzionih tela tako da je prinos iznosio 15 mg/L tečne kulture. Za ekstrakciju rCPI iz inkluzionih tela korišćeni su denaturišući uslovi pa je uvijanje proteina rađeno na koloni. Strukturni (CD spektrometrija), biološki (inhibicija aktivnosti papaina, inhibicija rasta gljiva) i imunohemijski (Western blot, ELISA inhibicija) podupiru zaključak da je uvijanje rCPI na koloni bilo zadovoljavajuće i da je dobijen protein koji odgovara svom prirodnom duplikatu.

Inhibicija proteolitičke aktivnosti papaina koju rCPI ispoljava pokazala je da se nakon ekspresije i prečišćavanja u denaturišućim uslovima dobija biološki aktivan molekul. Dobijena vrednost EC_{50} za rCPI od 2,78 nM istog je reda veličine kao ona dobijena za nCPI (2,47 nM) [144] što ukazuje na sličnu biološku reaktivnost.

Analizom CD spektara može se zaključiti da je rCPI pravilno uvijen i strukturno sličan nCPI. Oba molekula imaju isti sastav sekundarnih struktura.

Slična imunoreaktivnost rCPI i nCPI pokazana je u Western blotu i ELISA eksperimentima. rCPI je pokazao IgE reaktivnost sa pulom seruma pacijenata alergičnih na kivi u Western blotu za razliku od nCPI. Ovaj rezultat verovatno je posledica osetljivijeg sistema za detekciju IgE vezivanja. EC_{50} vrednost koja je dobijena u ELISA inhibiciji sa zečijim anti-nCPI antiserumom istog je reda veličine za nCPI i rCPI. Iz ovih eksperimenata se može zaključiti da rCPI deli epitope sa nCPI te da je antigenost ova dva molekula dovoljno slična da rCPI može da zameni nCPI u imunološkim testovima.

Modelovanjem rCPI dobijena je trodimenzionalna struktura bazirana na homologiji sa OC-IO proteinom iz pirinča. Ispitivanjem modela pokazano je da se više od 93 % aminokiselinskih ostataka nalazi u dozvoljenim regionima θ - ψ uglova Ramačandranovog dijagrama čime je nivo sigurnosti 3-D modela veći od 90 %.

Micelijarni rast gljive *B. cinerea* gajene u prisustvu rCPI bio je izmenjen u odnosu na kontrolni uzorak koji je rastao bez inhibitora. Efektivna koncentracija kojom se postiže 50 % inhibicije ćelijskog rasta (EC_{50}) iznosio je 2,67 μ M. Rast gljive *A. radicina* podložniji je uticaju rCPI što se vidi i iz niže EC_{50} od 2,19 μ M. Ovi rezultati saglasni su sa rezultatima dobijenim za nCPI [145].

Cilj dirigovane evolucije aktinidina bio je da se kreiraju mutanti kod kojih je smanjeno ili potpuno ukinuto vezivanje za IgE iz seruma pacijenata, kako bi mogli da se koriste u imunoterapiji alergije na kivi. Diverzifikacija gena za aktinidin omogućila je kreiranje biblioteka od $\sim 10^7$ mutanata/ μg DNK. Sortiranjem protočnom citometrijom biblioteke su obogaćene tako da se udeo IgE pozitivnih naspram IgG pozitivnih smanjio sa 42 % na 16 % tokom tri runde sortiranja. Daljom analizom sortiranih biblioteka dot blot-om i ELISA testovima izdvojena su 2 mutanta aktinidina koja pokazuju smanjeno vezivanje IgE iz seruma pacijenata u poređenju sa rAktinidinom. U odnosu na prirodni i rekombinantni aktinidin oba mutanta pokazala su smanjenu sposobnost degranulacije bazofila iz krvi pacijenata alergičnih na kivi. Sekvenciranjem plazmidne DNK izolovane iz ćelija kvasca potvrđeno je da se na jednom od mutanata izmena aminokiselinske sekvence nalazi u N-terminalnom delu molekula i da obuhvata površinske aminokiseline.

Ovakva vrsta mutacione analize mogla bi da bude korisna alatka u razvoju vakcina za primenu u imunoterapiji jer zamena određenih aminokiselina unutar IgE vezujućih epitopa može da smanji ili eliminiše anafilaktični potencijal molekula što je pokazano za rekombinantni alergen breze Bet v1 [14].

6 Zaključak

U ovoj doktorskoj disertaciji urađena je biohemijska i imunološka karakterizacija fitocistatina, alergena iz kivija, kao i karakterizacija njegovog homologa dobijenog tehnologijom rekombinantne DNK u cilju primene u dijagnostici alergije na kivi.

- Prirodni cistein proteazni inhibitor je izolovan iz ploda kivija kao zrela forma molekulske mase od oko 11 kDa čija pI vrednost iznosi 6,9. nCPI je N-glikozilovan. Uočeno je da postoje dve izoforme koje se ne razlikuju po aminokiselinskoj sekvenci već po obrazcu glikozilacije.
- Nakon procesa prečišćavanja dobija se funkcionalan molekul koji zadržava svoju inhibitornu biološku aktivnost prema papainu.
- nCPI poseduje alergeni potencijal. Do sada je bilo poznato da nCPI vezuje IgE iz seruma pacijenata alergičnih na kivi. U okviru ove teze pokazano je da nCPI doprinosi kliničkim simptomima alergije na kivi jer ima sposobnost degranulacije mastocita i bazofila.
- nCPI poseduje sposobnost inhibicije *in vitro* rasta fitopatogenih bakterija *A. tumefaciens* i *B. cepacia* tako što inhibira ekstracelularne cistein proteaze ovih bakterija.
- nCPI utiče i na rast fitopatogenih gljiva *A. radicina* i *B. cinerea* kako *in vitro* tako i *in vivo*. Mehanizam inhibicije proističe od inhibicije aktivnosti unutarćelijskih i ekstracelularnih cistein proteaza ovih gljiva ali i inhibicije klijanja spora, ključne faze u životnom ciklusu ovih gljiva.
- Rekombinantni cistetin proteazni inhibitor je ukloniran i prečišćen u prinosu od 15 mg/L tečne kulture. Za ekstrakciju rCPI iz inkluzionih tela korišćeni su denaturišući uslovi pa je uvijanje proteina rađeno na koloni.
- Strukturni (CD spektrometrija), biološki (inhibicija aktivnosti papaina, inhibicija rasta gljiva) i imunoheimijski (Western blot, ELISA inhibicija) podupiru zaključak da je uvijanje rCPI na koloni bilo zadovoljavajuće i da je dobijen protein koji odgovara svom prirodnom duplikatu.

Na osnovu dobijenih rezultata jasno je da je CPI klinički relevantan alergen i kao takav trebalo bi da bude uključen u dijagnostiku alergije na kivi razdvojenu na komponente.

Takođe, upotrebom tehnologije rekombinantne DNK dobijen je mutant glavnog alergena kivija, aktinidina, koji ima potencijalnu primenu u terapiji alergije na kivi.

- Diverzifikacija gena za aktinidin omogućila je kreiranje biblioteka od $\sim 10^7$ mutanata/ μg DNK.
- Sortiranje biblioteka protočnom citometrijom omogućilo je obogaćivanje biblioteka tako da se udeo mutanata aktinidina koji vezuju IgE naspram IgG pozitivnih mutanata smanjio sa 42 % na 16 % tokom tri runde sortiranja.
- Dalja analiza sortiranih biblioteka dot blot-om i ELISA testovima omogućila je da se iz biblioteka izdvoje 2 mutanta aktinidina koja pokazuju smanjeno vezivanje IgE iz seruma pacijenata u poređenju sa rAktinidinom.
- U odnosu na prirodni i rekombinantni aktinidin oba mutanata su pokazala smanjenu sposobnost degranulacije bazofila iz krvi pacijenata alergičnih na kivi.
- Sekvenciranjem plazmidne DNK izolovane iz ćelija kvasca potvrđeno je da se mutacija nalazi u N-terminalnom delu molekula jednog od mutanata. Mutacija obuhvata površinske aminokiseline.

Ovakav tip mutacione analize mogao bi da bude korisna tehnika u razvoju vakcina za terapiju alergije, s obzirom da supstitucija ili delecija aminokiselina u IgE vezujućim epitopima može da smanji ili eliminiše anafilaktički potencijal molekula.

7 Eksperimentalni deo

7.1 Kloniranje i ekspresija rekombinantnog fitocistatina

7.1.1 Priprema tečnih podloga i antibiotika

7.1.1.1 Luria-Bretani (LB) - tečna podloga

Sastav LB tečnog medijuma:

Pepton	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	10 g
Dejonizovana voda do	1 L

7.1.1.2 Postupak rada:

Za pripremu podloga korišćene su supstance koje su proizvedene u *Institutu za virusologiju, vakcine i serume Torlak*. Po rastvaranju sastojaka podloge, pH je podešena na 7,4, a podloga je razlivena u odgovarajuće sudove i nakon toga autoklavirana 20 minuta na temperaturi od 121°C i pritisku od 103,5 kPa. Nakon autoklaviranja podloga je ohlađena i u nju su dodati odgovarajući antibiotici.

7.1.1.3 Luria-Bretani agar (LA) - čvrsta podloga

Sastav LA medijuma:

Pepton	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g
Dejonizovana voda do	1 L

Za pripremu podloga korišćene su supstance koje su proizvedene u *Institutu za virusologiju, vakcine i serume Torlak*. Po rastvaranju sastojaka podloge, pH je podešena na 7,4 i nakon toga podloga je autoklavirana 20 minuta na temperaturi od 121°C i

pritisku od 103,5 kPa. Nakon autoklaviranja podloga je ohlađena do 50°C i u nju su dodati odgovarajući antibiotici, a potom je sterilno razlivena u Petri kutije.

7.1.1.4 Štok rastvor ampilina:

Sastav štok rastvora ampilina:

Ampicilin-natrijumova so	100 mg
Dejonizovana voda	1 mL

Natrijumova so ampilina je rastvorena u dejonizovanoj vodi i sterilno procedena kroz filter od 0,2 µM. Procedeni rastvor je alikvotiran i čuvan na -20°C do upotrebe.

7.1.1.5 Radni rastvor ampilina:

Radni rastvor ampilina je pravljen tako što je sterilni štok ampilina dodat u podlogu tako da finalna koncentracija bude 100 mg/L.

7.1.1.6 Štok rastvor kanamicina:

Sastav štok rastvora kanamicina:

Kanamicin	25 mg
Dejonizovana voda	1 mL

Kanamicin je rastvoren u dejonizovanoj vodi i sterilno proceden kroz filter od 0,2 µM. Procedeni rastvor je alikvotiran i čuvan na -20°C do upotrebe.

7.1.1.7 Radni rastvor kanamicina:

Radni rastvor kanamicina je pravljen tako što se sterilni štok kanamicina dodat u podlogu tako da finalna koncentracija bude 25 mg/L.

7.1.1.8 Štok rastvor hloramfenikola:

Sastav štok rastvora hloramfenikola:

Hloramfenikol	50 mg
96 % etanol	1 mL

Hloramfenikol je rastvoren u 96 % etanolu i sterilno proceden kroz filter od 0,2 µM. Procedeni rastvor je alikvotiran i čuvan na -20°C do upotrebe.

7.1.1.9 Radni rastvor hloramfenikola:

Radni rastvor hloramfenikola je pravljen tako što je sterilni štok hloramfenikola dodat u podlogu tako da finalna koncentracija bude 50 mg/L.

Količina antibiotika po zapremini podloge

Zapremina podloge:	Ampicilin-štok, μL	Kainamicin-štok, μL	Hloramfenikol-štok, μL
5 mL	50	3.125	12.5
50 mL	100	6.25	25
100 mL	200	12.5	50
200 mL	400	25	100
400 mL	800	50	200
10000 mL	2000	125	400

7.1.2 Izolovanje dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) iz ploda zelenog kivija

Genomska DNK izolovana je uz pomoć DNeasy kompleta (*QIAGEN*) za izolovanje DNK po uputstvu proizvođača:

1. Oko 100 mg zamrznutog ploda zelenog kivija je samleveno u avanu uz dodatak tečnog azota. Uzorci su uronjeni u tečni azot, a tkivo je razarano oko 30 s, nakon čega je prebačeno u tube za centrifugiranje od 1,5 mL.
2. Pufer AP1 (400 μL) dodat je u tube zajedno sa RNazom A (4 μL štok rastvora koncentracije 100 mg/mL) i uzorci su mešani na vorteksu da bi se resuspendovali.
3. Smeša je inkubirana na 65°C 10 minuta uz povremeno mešanje čime je omogućena liza ćelija.
4. Da bi se precipitali detergenti i polisaharidi dodat je pufer AP2 (130 μL). Smeša je inkubirana na ledu 5 minuta.
5. Ćelijski lizat je centrifugiran 5 minuta na 14 000 x g i prebačen na QIA shredder Mini spin kolone koje su potom centrifugirane 2 minuta na 14 000 x g. Rastvor

koji prošao kroz kolonu je prebačen u novu tubu bez pomeranja taloga poreklom od ćelijskih ostataka.

6. Rastvoru iz prethodnog koraka dodato je 1,5 mL pufera AP3 uz momentalno mešanje.
7. Smeša nastala u koraku 6 naneta je na DNeasy Mini spin kolonu uz centrifugiranje.
8. DNeasy Mini kolona je prebačena u novu tubu od 2 mL i isprana sa 2 puta po 500 μ L pufera AW uz centrifugiranje 2 minuta na 14 000 x g.
9. DNeasy mini spin kolona je prebačena u novu čistu tubu od 1,5 mL. Direktno na membranu kolone naneto je 100 μ L pufera AE. Kolona je inkubirana 5 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega je DNA eluirana centrifugiranjem 2 minuta na 14 000 x g.
10. Izolovana DNA je analizirana agaroznom elektroforezom.

7.1.3 Amplifikacija gena za fitocistatin lančanom reakcijom polimeraze (PCR - *engl. polymerase chain reaction*)

Gen za fitocistatin je umnožen PCR reakcijom korišćenjem specifičnih prajmera za fitocistatin koji sadrže mesta za restrikcione endonukleaze Nco I i Bam HI. Za PCR reakciju, korišćeni su Dream Taq polimeraza i 10 x pufer za Taq polimerazu (*Fermentas*), miks dezoksiribonukleotida-dNTPs (*Fermentas*), 10 μ M oba prajmera (*Operon*) prema uputstvu proizvođača. Za PCR reakciju kao matrica je korišćena genomska DNK izolovana iz kivija po protokolu opisanom u delu 7.1.2.

Sastav smeše za PCR:

10 x pufer za Taq polimerazu	10 μ L
10 mM dNTPs	1 μ L
10 μ M uzvodni prajmer	1 μ L
10 μ M nizvodni prajmer	1 μ L
Dream Taq polimeraza	0,5 μ L
DNK	1 μ L
Dejonizovana voda	do 100 μ L

U dejonizovanu vodu dodat je 10 x pufer za Taq polimerazu, dezoksiribonukeotidi (dNTPs), prajmeri, templatna DNK i Taq polimeraza. Sekvence korišćenih prajmera su:

Uzvodni prajmer: 5' - CCA TGG TGG CGG CAG GCG GG-3'

Nizvodni prajmer: 5' - GGA TCC CAC CTT CCG GAA AG-3'

Mesta za sečenje restrikcijom endonukleazama su označena u kurzivu.

PCR reakcija izvođena je po sledećem temperaturnom profilu:

Korak	Temperatura (°C)	Vreme (sec)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	95	180	
Denaturacija	95	60	30
Hibridizacija prajmera	64	60	
Elongacija prajmera	72	60	
Finalna elongacija	72	600	

PCR reakcija je analizirana agaroznom gel elektroforezom.

7.1.4 Prečišćavanje PCR proizvoda

PCR proizvod prečišćen je korišćenjem GeneJET™ kompleta za prečišćavanje (*Fermentas*) prema uputstvima proizvođača.

Reagensi koji ulaze u sastav kompleta:

Reagens:	Potrebna količina/prečišćavanju
Pufer PBI	450 µL
Pufer PE	2 x 750 µL
PCR reakciona smeša	90 µL
Dejonizovana voda	100 µL

Postupak:

Uzorak (90 μL) je pomešan sa 450 μL pufera PBI i stavljen na QIA kolonicu za prečišćavanje i centrifugiran (1 minut na 10 000 x g). Tečnost koja je prošla kroz kolonicu je odbačena, a kolonica je, uz centrifugiranje (1 min na 10 000 x g), isprana sa 2 x po 750 μL pufera PE. Nakon poslednjeg ispiranja sva tečnost koja je prošla kroz kolonu je odbačena, a kolona je, prazna centrifugirana (1 minut na 10 000 x g) da bi se u potpunosti uklonio pufer za ispiranje. Vezana DNK je eluirana dodvanjem dejonizovane vode (40 μL) na membranu kolone i njenim naknadnim centrifugiranjem (1 minut na 13 000 x g). Eluirana prečišćena DNK je korišćena za dalji rad.

7.1.5 Digestija PCR proizvoda i pQE60 vektora

PCR proizvod i vektor pQE60 (*Qiagen*) sečeni su upotrebom restrikcionih endonukleaza Nco I (*Fermentas*) i Bam HI (*Fermentas*) i 10 x Tango pufera (*Fermentas*) prema uputstvima proizvođača.

Sastav restrikcione smeše:

komponenta	Zapremina	
	PCR proizvod	Vektor pQE60
Nco I enzim	1 μL	1 μL
Bam HI enzim	1 μL	1 μL
10 x Tango pufer	2 μL	2 μL
DNK	12 μL	4
Dejonizovana voda do	20 μL	20 μL

U dejonizovanu vodu dodat je 10 x Tango pufer, DNK i na kraju restrikcioni enzimi. Restrikcija je rađena 1 sat na 37°C, a restrikciona smeša je nakon toga zagrevana 20 minuta na 65°C da bi se deaktivirali restrikcioni enzimi. Nakon restrikcije PCR proizvod i vektor su prečišćeni po postupku opisanom u delu 7.1.4.

7.1.6 Ligacija prečišćenog PCR proizvoda u pQE60 vektor

Za ligaciju PCR proizvoda u pQE60 vektor korišćen je enzim T4 DNK ligaza i 10 x Ligacioni pufer (*Fermentas*) prema preporuci proizvođača. Ligacija je rađena tako da odnos koncentracija PCR proizvoda prema vektoru bio 5:1.

Sastav ligacione smeše

Komponenta	Zapremina
10 × Ligacioni pufer	1 μL
PCR prizvod	5 μL
Plazmid	2.5 μL
T4 DNK ligaza	0.5 μL
Dejonizovana voda	1 μL

U dejonizovanu vodu dodat je 10 x Ligacioni pufer, DNK i na kraju T4 DNK ligaza. Ligacija je rađena preko noći na 16°C, a ligaciona smeša je nakon toga korišćena za dalji rad.

7.1.7 Transformacija DH5α ćelija ligacionim proizvodom

Za pripremu kompetentnih DH5α ćelija (*Escherichia coli*) bilo je potrebno inokulisati 5 mL LB tečna podloge DH5α ćelijama i gajiti ih preko noći na 37°C uz mešanje. Nakon toga, preko noći kulturom je inokulisano 100 mL LB medijuma i ćelije su gajene na 37°C uz mešanje dok nisu postigle OD₆₀₀ od 0,4-0,6. Nakon toga, kultura je sterilno prebačena u tube od 50 mL i ćelije su centrifugiranjem (10 min, 3 500 x g) odvojene od medijuma u kome su rasle. Supernatant je odbačen, a ćelije resuspendovane u 10 mL sterilnog 0,1 M rastvora CaCl₂ koji sadrži 10 % glicerol i ostavljene na ledu 15 minuta. Nakon toga ćelije su centrifugiranjem odvojene (10 min, 3 500 x g, 4°C), a supernatant je odbačen. Ćelije su resuspendovane u 1 mL sterilnog 0,1 M rastvora CaCl₂ koji sadrži 10 % glicerol alikvotirane po 50 μL ćelija u tube od 1,5 mL i momentalno zaleđene potapanjem u tečni azot. Ćelije su čuvane na -80°C do upotrebe.

Kompetentne DH5α ćelije transformisane su proizvodom nastalim u reakciji ligacije. Kompetentne ćelije su izvađene na led i pažljivo odleđene. U ćelije je dodat 1 μL ligacione smeše, a potom je celokupna smeša blago izmešana. Ćelije su inkubirane na ledu 30 minuta uz povremeno mešanje. Nakon ovoga ćelije su inkubirane 45 sekundi na 42°C, a odmah nakon toga su vraćene na led da se inkubiraju 2 minuta. Potom su ćelije prelivene sa 900 μL LB tečne podloge, zagrejane na 42°C, i ostavljene na 37°C uz mešanje 1 h. Po isteku ovog vremena 100 μL suspenzije ćelija je sterilno zasejano na

LA čvrstu podlogu sa ampicilinom (100 µg/mL) i ćelije su ostavljene da rastu preko noći na 37°C.

7.1.8 Izolovanje pQE60-fitocistatin konstrukta iz DH5α ćelija

Plazmidni konstrukti su izolovani iz kolonija DH5α ćelija uz pomoć GenJET™ kompleta za izolovanje plazmida (*Fermentas*) prema uputstvima proizvođača. Za izolovanje plazmida korišćene su prekonoćne kulture dobijene sterilnim zasejavanjem pojedinačnih kolonija u LB tečnu podlogu sa ampicilinom (100 µg/mL) i njihovim gajenjem preko noći na 37°C, uz konstanto mućkanje (250 rpm).

Reagenski koji ulaze u sastav kompleta:

Reagens:	Potrebna količina/prečišćavanju
Pufer za resuspendovanje sa RNazom A	250 µL
Rastvor za lizu ćelija	250 µL
Rastvor za neutralizaciju	350 µL
Rastvor za ispiranje sa 96 % etanolom	2 x 500 µL
Pufer za eluciju	50 µL

Postupak :

3 mL prekonoćne kulture je odvađeno i centrifugirano (1 min, 13 000 x g), u porcijama od po 1,5 mL (u tubi od 1,5 mL) da bi se ćelije odvojile od podloge. Talog ćelija je resuspendovan u 250 µL pufera za resuspenziju uz mešanje na vorteksu. Resuspendovanim ćelijama je dodato 250 µL rastvora za lizu i celokupna smeša lagano izmešana i ostavljena da odstoji na st do liziranja ćelija (0,5-1 minuta). Da bi se uklonile ometajuće komponente ćelije (proteini, lipidi, hromozomalna DNK i sl.) ćelijskom lizatu je dodato 350 µL rastvora za neutralizaciju i lizat je momentalno izmešan. Neutralisani lizat je centrifugiran (10 minuta, 13 000 x g) da bi se ometajuće komponente istaložile. Nakon centrifugiranja bistar supernatant je odvađen i nanet na kolonu za prečišćavanje koja je potom centrifugirana (1 min, 13 000 rpm). Tečnost koja je prošla kroz kolonicu je odbačena, a kolonica je isprana sa 2 x po 500 µL pufera za ispiranje sa 96 % etanolom uz centrifugiranje (10 minuta, 13 000 x g). Nakon

poslednjeg ispiranja sva tečnost koja je prošla kroz kolonu je odbačena, a prazna kolona je centrifugirana (1 minut, 13 000 x g) da bi se u potpunosti uklonio pufer za ispiranje. Vezana DNK je eluirana dodavanjem pufera za eluciju (50 µL) na membranu kolone i njenim naknadnim centrifugiranjem (1 minut, 13 000 x g). Eluirana prečišćena DNK je korišćena za dalji rad.

7.1.9 Digestija izolovanih pQE60-fitocistatin konstrukata

Da bi se proverilo da li izolovani plazmidni konstrukti sadrže insertovan gen, sečeni su restrikcionim endonukleazama Nco I (*Fermentas*) i Bam HI (*Fermentas*) uz korišćenje 10 x Tango pufera (*Fermentas*) prema uputstvima proizvođača. Sastav restrikcione smeše:

komponenta	Zapremina
	pQE60-fitocistatin
Nco I enzim	1 µL
Bam HI enzim	1 µL
10 x Tango pufer	2 µL
DNK	3 µL
Dejonizovana voda do	20 µL

U dejonizovanu vodu dodat je 10 x Tango pufer, DNK i na kraju restrikcioni enzimi. Restrikcija je rađena 1 h na 37°C, a restrikciona smeša je nakon toga zagrevana 20 minuta na 65°C da bi se prekinula reakcija digestije. Isečeni pQE60-fitocistatin je analizirana agaroznom gel elektroforezom.

7.1.10 Sekvenciranje konstrukata pQE60-fitocistatin

DNK sekvenciranje rađeno je korišćenjem kompleta Thermo Sequence dye terminator cycle (*Thermo Fisher Scientific*) i dobijeni proizvodi analizirani su kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenatoru ABI PRISM® 3730 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems, CA, USA*). Analiza dobijenih sekvenci rađena je uz pomoć Vector NTI® softvera za analizu podataka (*Invitrogen*).

7.1.11 Transformacija BL21 RIPL ćelija pQE60-fitocistatin konstruktom

Za pripremu kompetentnih BL21 RIPL ćelija (*Escherichia coli*) inokulisano je 5 mL LB tečne podloge DH5 α ćelijama i gajiti ih preko noći na 37°C uz mešanje. Nakon toga, prekonoćnom kulturom inokulisano je 100 mL LB medijuma i ćelije su gajene na 37°C uz mešanje dok nisu postigle OD₆₀₀ od 0,4-0,6. Nakon toga, kultura je sterilno prebačena u tube od 50 mL i ćelije su centrifugiranjem (10 min, 3 500 x g) odvojene od medijuma u kome su rasle. Supernatant je odbačen, a ćelije resuspendovane u 10 mL sterilnog 0,1 M rastvora CaCl₂ koji sadrži 10 % glicerol i ostavljene na ledu 15 minuta. Nakon toga ćelije su centrifugiranjem odvojene (10 min, 3 500 x g, 4°C), a supernatant je odbačen. Ćelije su resuspendovane u 1 mL sterilnog 0,1 M rastvora CaCl₂ koji sadrži 10 % glicerol alikvotirane po 50 μ L ćelija u tube od 1,5 mL i momentalno zaleđene potapanjem u tečni azot. Ćelije su čuvane na -80°C do upotrebe.

Kompetentne BL21 RIPL ćelije transformisane su konstruktom pQE60-fitocistatin. Kompetentne ćelije su izvađene na led i pažljivo odleđene. U ćelije je dodat 1 μ L plazmida, a potom je celokupna smeša blago izmešana. Ćelije su inkubirane na ledu 30 minuta uz povremeno mešanje. Nakon ovoga, ćelije su inkubirane 45 sekundi na 42°C, a odmah nakon toga su vraćene na led da se inkubiraju 2 minuta. Potom su ćelije prelivene sa 900 μ L LB tečne podloge, zagrejane na 42°C, i ostavljene na 37°C uz mešanje 1 h. Po isteku ovog vremena 100 μ L suspenzije ćelija je sterilno zasejano na LA čvrstu podlogu sa ampicilinom (100 μ g/mL), kanamicinom (25 μ g/mL) i hloramfenikolom (50 μ g/mL) i ćelije su ostavljene da rastu preko noći na 37°C.

7.1.12 Optimizacija ekspresija rekombinantnog fitocistatina u BL 21 RIPL ćelijama

Za ekspresiju fitocistatina korišćena je soj kompetentnih *E. coli* bakterija BL21 RIPL (*Invitrogen*). Prvi korak je bilo zasejavanje pojedinačnih bakterijskih kolonija u prekonoćnu kulturu. Korišćen je LB medijum u koji su dodati antibiotici: ampicilin, kanamicin i hloramfenikol. Zasejane kulture su ostavljane da rastu preko noći na 37°C uz mešanje. U sledećem koraku 100 μ L prekonoćne kulture, presejano je u 1 mL sveže LB podloge sa antibioticima i onda su ostavljene da rastu 2 h na 37°C, a potom su

indukovane dodatkom 1mM IPTG-a (izo-propil- β -D-tiogalaktozid) i dalje gajene na 30°C. Nakon indukcije, sterilno su uzimani alikvoti u različitim vremenima i analizirani SDS-PAG elektroforezom.

7.1.13 Ekspresija rekombinantno fitocistatina u BL 21 RIPL ćelijama

Za ekspresiju cistatina korišćen je soj kompetentnih *E. coli* bakterija BL21 RILP (*Invitrogen*). Prvi korak je bilo zasejavanje pojedinačnih bakterijskih kolonija u prekonoćnu kulturu. Korišćen je LB medijum kome su prethodno dodati antibiotici: ampicilin, kainamicin i hloramfenikol. Zasejane kulture su ostavljane da rastu preko noći na 37°C uz mešanje. U sledećem koraku izraslom prekonoćnom kulturom inokulisano je 400 mL LB medijuma u koji se predhodno dodaju antibiotici: ampicilin (100 μ g/mL), kainamicin (25 μ g/mL) i hloramfenikol (50 μ g/mL). Ćelije su ostavljene da rastu na 37°C uz mešanje dok u medijumu se ne dostigne optička gustina – OD₆₀₀ od 0,6 do 0,8 (3-5 h). Kada se dostigne odgovarajuća OD ćelije su indukovane dodatkom 1mM IPTG-a (izo-propil- β -D -tiogalaktozid) i ostavljene 12 h na 30°C uz mešanje.

7.2 Elektroforetske tehnike

7.2.1 Agarozna gel elektroforeza

Sva elektroforetska razdvajanja rađena su na *Amersham Pharmacija* horizontalnom sistemu za elektroforezu prema uputstvima proizvođača. Za elektroforezu su korišćeni 6xOrange Loading Dye i 1 kb DNK marketi (*Fermentas*) prema uputstvima proizvođača.

Rastvori:

1. TBE (Tris-Borna kiselina-EDTA) pufer

Tris	89 mM
Borna kiselina	89 mM
EDTA	2 mM

2. 1 % agarozna

Agarozna	1 g
TBE pufer	do 100 mL

Agarozna je resuspendovana u TBE puferu i potom zagrevana dok se nije rastopila.

3. Štok rastvor etidijum bromida za bojenje gelova

Etidijum bromid	10 mg
Dejonizovana voda	do 1 mL

4. Rastvor etidijum bromida za bojenje gelova

Etidijum bromid štok rastvor	20 μ L
Dejonizovana voda	100 mL

Postupak:

Rastopljena agarozna razlivena je na ploču za elektroforezu nakon čega su ubacivani češljevi za bunare. Češljevi za bunare vađeni su nakon stezanja gela. Ploča sa gelom je stavljena u kadu za elektroforezu i prelivena sa TBE puferom

Uzorci DNK koji su analizirani pomešani su sa 6xOrange Loading Dye u odnosu 5:1 i naneti na gel.

Elektroforeza je rađena na 80 V dok front boje nije stigao na oko 1 cm od donje ivice gela, u trajanju od 30 do 60 min.

Nakon završetka elektroforeze, gel je prebačen u rastvor za bojenje (1-5 min) i analiziran na UV Sistemu za dokumentaciju gelova (VWR).

7.2.2 Natrijum dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS PAGE)

SDS PAGE rađen je po originalnoj Laemmli-jevoj proceduri. Sva elektroforetska razdvajanja proteina su rađena na Hoeffer SCI (*Hoeffer*) aparaturi prema instrukcijama proizvođača. U radu su korišćeni molekularni markeri niskih molekularnih masa od 6 do 29 kDa (*Pharmacia Biotech*) i markeri masa od 14 do 116 kDa (*Fermentas*).

Rastvori:**1: monomerni rastvor akrilamida (30 %T, 2.7 %C)**

akrilamid	58.4 g
bisakrilamid	1.6 g
Dejonizovana voda do	200 mL

2: Pufer za razdvajajući gel (1.5 M Tris HCl, pH 8.8)

Tris	36.3 g
Dejonizovana voda do	200 mL

*pH je podešena dodavanjem 4M HCl

3: Pufer za koncentrujući gel (0.5 M Tris HCl, pH 6.8)

Tris	6.0 g
Dejonizovana voda do	100 mL

*pH je podešena dodavanjem 4M HCl

4: 10 % rastvor SDS-a

SDS	10 g
Dejonizovana voda do	10 mL

5: 10 % rastvor APS-a

APS	0.1 g
Dejonizovana voda do	1 mL

*poželjno je rastvor inicijatora polimerizacije (APS) napravi pre upotrebe, a ne bi trebalo da stoji duže od nedelju dana

6: Pufer za nadslojavanje gela pri polimerizaciji

n-butanol zasićen vodom, rastvor se pre upotrebe promućka i ostavi da se razdvoje vodeni i alkoholni sloj

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

Tris	3.0 g
Glicin	14.4 g
SDS	1.0 g
Dejonizovana voda do	1000 mL

8: Pufer za pripremu uzorka (5x koncentrat)

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 %
Dejonizovana voda do	10	

*Rastvor H za nereduktivnu elektroforezu ne sadrži 2-merkaptetanol, tako da je u ovom koraku dodavana dejonizovana voda.

9: Rastvor boje (0.1 % CBB, 50 % metanol, 10 % sirćetna kiselina)

CBB G ili R 250	0.5 g
metanol	250 mL
sirćetna kiselina	50 mL
dejonizovana voda do	500 mL

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

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

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

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

12: Rastvor za sušenje gela (25 % metanol, 5 % glicerol)

metanol	250 mL
glicerol	50 mL
Dejonizovana voda do	1000 mL

Pripremanje PAA gelova različite koncentracije:**Priprema poliakrilamidnog gela za razdvajanje**

finalna koncentracija akrilamida u gelu (%)												
rastvor	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Monomerni rastvor (mL)	1.67	2.0	2.33	2.67	3.0	3.33	3.67	4.0	4.33	4.67	5.0	5.33
Tris 8,8 (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
voda (mL)	5.67	5.33	5.0	4.67	4.33	4.0	3.67	3.33	3.0	2.67	2.33	2.0
SDS (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
TEMED (µl)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
APS (µl)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

Priprema poliakrilamidnog gela za koncentrovanje

finalna zapremina gela za koncentrovanje (mL)								
rastvor	10	9	8	7	6	5	4	3
Monomerni rastvor (mL)	1.33	1.2	1.06	0.93	0.8	0.67	0.53	0.4
Tris 6,8 (mL)	2.5	2.25	2.0	1.75	1.5	1.25	1	0.75
voda (mL)	6.0	5.4	4.8	4.2	3.6	3.0	2.4	1.8
SDS (µl)	100	90	80	70	60	50	40	30
TEMED (µl)	2	2	2	2	2	2	2	2
APS (µl)	50	45	40	35	30	25	20	15

Postupak rada

Gel za razdvajanje je dezaerisan na vakuum pumpi. Nakon dezaeracije dodati su rastvori SDS-a i APS-a. Dezaerisani rastvor je sipan između staklenih ploča (13x8 cm, sa spejserima debljine 1 cm) i nadslojen rastvorom n-butanola. Po polimerizaciji, vodom je ispirana površina gela i naliven je rastvor gela za koncentrovanje. U gel je uronjen češalj. Ploče su nakon polimerizacije gela za koncentrovanje uronjene u kadu sa puferom (rastvor G).

Uzorci su pripremani zagrevanjem 3 min u ključalom vodenom kupatilu u rastvoru H vodeći računa o razblaženju (5x), centrifugirani i nakon hlađenja do st naneti u bunare.

Elektroforeza je rađena na 80 V do ulaska BFP u gel za razdvajanje (oko 45 min) i zatim na 250 V (dok BFP ne stigne na oko 1 cm od donje ivice gela) još 60-90 min, u zavisnosti od gustine gela za razdvajanje.

Nakon završetka elektroforeze, ploče su pažljivo razdvojene i gel prebačen u odgovarajuću posudu. Nakon brzog ispiranja vodom, tretiran je na sledeći način:

Fiksiranje (rastvor 10)	15 min
Bojenje (rastvor 9)	15 min
Obezbojavanje 1 (rastvor 10)	30 min
Obezbojavanje 2 (rastvor 10)	do potpunog obezbojavanja
Priprema za sušenje gela (rastvor 11)	60 min

Nakon što je gel odstajao u rastvoru L, skeniran je u rezoluciji od 600 dpi na Lexmark-2300i skeneru.

Nereduktivna elektroforeza je rađena na isti način kao i reduktivna SDS PAGE, izuzev što u pufer za uzorke nije dodat 2-merkaptotanol.

7.2.3 Izoelektričnofokusiranje (IEF)

Izoelektrofokusiranje je izvedeno na sistemu Multiphor II (*Pharmacia Biotech*) uz amfolite širokog opsega (3.5 –10)

- **Katodni rastvor** - 150 mM NaOH (0.6 g NaOH i voda do 100 mL)

* rastvor ostaviti da proključa i kad se ohladi dezaerisati ga

-**Anodni rastvor** - 150 mM sumporna kiselina (0.42 mL konc. H₂SO₄ i voda do 100 mL)

Priprema gela (5 % akrilamidni gel, 15 mL):

30 % monomerni rastvor	3.75 mL
amfoliti	1.2 mL
voda	9.9 mL
TEMED	12 µL
APS	75 µL

Gel je pripremljen kao i ostali PAA gelovi i naliven između ploča dimenzija 8 x 13 cm, sa spejserima debljine 0,75 mm. Elektrode su natopljene u katodnom i anodnom rastvoru. Višak rastvora pokupljen presovanjem između slojeva papirne vate i pažljivo

nanet na krajeve gela, vodeći računa da se postave paralelno. Prvo je urađeno predfokusiranje na 800 V tokom 30 min.

Zatim je postavljen aplikator za uzorke i u bunare su naneti uzorci (maksimalno 25 μ L). Pušteno je fokusiranje uzoraka prvo na 400 V, a zatim na 600 V u trajanju od po 10 min, zatim na 800 V tokom 30 min i na kraju na 1000 V tokom 10 min. Opciono, nakon toga je skinut aplikator i fokusirano je još 5 min na 1200 V (maksimalna jačina struje 50 mA, maksimalni napon 2000 V i maksimalna snaga 10 W). Nakon završetka izoelektrofokuseranja, gel je pažljivo sklonjen sa staklene ploče, ispiran vodom (10 min) i fiksiran u 30 % trihlor-sirćetnoj kiselini (TCA) tokom 1 h. Nakon fiksiranja TCA je isprana ostavljanjem gela u 1 % TCA tokom nekoliko sati (najbolje preko noći). Na kraju gel je ispiran vodom tokom 10 min. Važno je dobro isprati TCA kako CBB ne bi isprecipitirao. Gel je dalje bojen kao kod SDS PAGE.

7.2.4 Dvodimenziona elektroforeza

Izoelektrofokuseranje je izvedeno na sistemu Multiphor II (*Pharmacia Biotech*) uz amfolite širokog opsega (3.5 –10), dok je SDS-PAGE izvedeno na SDS PAGE se radi po originalnoj Laemmli-jevoj proceduri. Sva elektroforetska razdvajanja proteina su rađena na Hoeffer SCI aparaturi prema instrukcijama proizvođača. U radu su korišćeni molekularni markeri niskih molekularnih masa od 6 do 29 kDa (*Pharmacia Biotech*) i markeri masa od 14 do 116 kDa (*Fermentas*).

2D ekvilibracioni pufer (50 mM Tris HCl, pH 8.8 sa 6M ureom, 2 % SDS, 30 % glicerol i 0,01 % Bromfenol plavo)

TRIS	1,21 g
Urea	72 g
SDS	4 g
80 % glicerol	75 mL
1 % Bromfenol plavo	2 mL
Voda do	200 mL

Gel za izoelektričnofokuseranje je pripremljen kao i ostali PAA gelovi i naliven između ploča dimenzija 8 x 13 cm, sa spejserima debljine 0,75 mm. Gel za SDS-PAGE je pripreman kao i ostali PAA gelovi i naliven između ploča 8 x 13 sa spejserima debljine 1 cm. Umesto češlja od dvadeset bunara, u gel za razdvajanje je uronjen jedan češalj dimenzija 11 x 1 x 0,1 mm. Elektrode su natopljene u katodnom i anodnom rastvoru.

Višak rastvora pokupljen presovanjem između slojeva papirne vate i pažljivo nanet na krajeve gela, vodeći računa da se postavе paralelno.

Prvo je urađeno predfokusiranje na 800 V tokom 30 min. Pušteno je fokusiranje uzoraka prvo na 400 V, a zatim na 600 V u trajanju od po 10 min, zatim na 800 V tokom 30 min i na kraju na 1000 V tokom 10 min. Opciono, nakon toga je skinut aplikator i fokusirano je još 5 min na 1200 V (maksimalna jačina struje 50 mA, maksimalni napon 2000 V i maksimalna snaga 10 W). Nakon završetka izoelektrofokusiranja, gel je pažljivo sklonjen sa staklene ploče, ispiran vodom (10 min) i isečen na tračice debljine oko 0,8 cm. Tračice su potom inkubirane 2 h u 2D ekvilibracionom puferu. Nakon toga tračice su prenete na SDS-PA gel. Razdvajanje gela u drugoj dimenziji je rađeno na način opisan u delu 7.2.2.

7.3 Prečišćavanje prirodnog i rekombinantnog cistein proteaznog inhibitora (CPI)

7.3.1 Izolovanje nCPI papain afinitetnom hromatografijom

Rastvori: 1: 500 mM fosfatni pufer pH 7,4

Dinatrijum hidrogenfosfat	70,98 g
Dejonizovana voda	Do 1000 mL

*pH je podešena dodatkom 4M NaOH

2: Pufer za ekstrakciju pH 3,0

Tri-natrijum citrat	25,80 g
EDTA	1,16 g
L-cistein	10 g
100 mM PMSF	600 μ L
PEG-600	1 g
PVPP	10 g
Dejonizovana voda	Do 1000 mL

*pH je podešena dodatkom 4M HCl

3: 100 mM PMSF

PMSF	0,174 g
Izopropanol	Do 10 mL

* Rastvor se do upotrebe čuva u staklenoj boci na -20°C

4: 20 mM glicinski pufer pH 2,5

Glicin	0,75 g
Dejonizovana voda	Do 500 mL

*pH je podešena dodatkom 4M HCl

Priprema papain afinitetnog matriksa za prečišćavanje prirodnog fitocistatina

Za prečišćavanje prirodnog fitocistatina iz zelenog kivija (*A. deliciosa*) papain afinitetni matriks je pripremljen na sledeći način [146]: 6 mL BioGel-a P-100 (*BioRad*) pomešano je sa 50 mL 25 % rastvora glutaraldehida (*Fischer Chemicals AG*) i inkubirano je na 37°C preko noći. Aktivirani matriks je intenzivno ispran 500 mM fosfatnim puferom pH 7,4. Papain je rastvoren (1,05 mg/mL) u 500 mM fosfatnom puferu pH 7,4 koji sadrži PMSF. Rastvor papaina je dodat na glutaralhidom-aktivirani BioGel koji je potom inkubiran preko noći uz mućkanje na sobnoj temperaturi. Nakon ovoga matriks je ponovo ispran 500 mM fosfatnim puferom pH 7,4 (10 zapremina kolone), a preostale aktivne grupe su ugašene inkubiranjem (4 h uz mućkanje na sobnoj temperaturi) u 100 mM rastvoru etanolamina u PBS-u pH 7,0. Matriks je do upotrebe čuvan u PBS-u pH 7,0 na 4°C. Efikasnost kuplovanja proteina za matriks određena je po formuli:

$$\text{efikasnost kuplovanja (\%)} = ((C_p - C_f) / C_p) \times 100$$

gde je C_p – koncentracija proteina u uzorku pre kuplovanja, a C_f – koncentracija proteina u uzorku nakon kuplovanja.

Efikasnost kuplovanja iznosila je 86 %.

Papain afinitetna hromatografija

Izolovanje nCPI je, uz izmene, rađeno prema objavljenom protokolu [8]. Korteks kivija je homogenizovan u blenderu i suspendovan u odnosu 1:3 u 100 mM natrijum citratnom puferu pH 3,0 koji sadrži 4 mM EDTA, 1 % L-cistein, 0,1 % PEG, 0,6 mM PMSF (*Sigma-Aldrich*) i 10 mg/mL PVPP (*Sigma-Aldrich*). Ekstrakt je proceden kroz gazu i centrifugiran na 4°C (30 minuta, 5 000 x g). Aktinidin je inaktiviran i precipitiran inkubiranjem supernatanta na 60°C 10 minuta. Nakon hlađenja i centrifugiranja (20 minuta, 5 000 x g), supernatant je neutralizovan dodatkom 1 M NaOH, potom centrifugiran (10 minuta, 5 000 x g). Ukupni proteini su precipitirani dodavanjem

amonijum sulfata do zasićenja od 100 %. Nakon centrifugiranja (10 minuta, 5 000 x g), proteinski precipitat je resuspendovan u minimalnoj količini dejonizovane vode i dodatno centrifugiran (10 minuta, 13 400 x g) pre nanošenja na papain afinitetni matriks.

Pre nanošenja uzorka papain afinitetni matriks je ekvilibrisan PBS-om (10 zapremina kolone). Uzorak je nanošen u baču, uz mešanje 1 sat na sobnoj temperaturi. Nevezani proteini su eluirani sa 10 zapremina kolone startnog pufera (PBS pH 7,4) dok su vezani proteini eluirani dodatkom 20 mM glicinskog pufera pH 2,5. Sakupljene frakcije su momentalno neutralisane dodatkom 1,5 M TRIS pufera pH 8,8. Frakcije koje sadrže nCPI su udružene i nakon liofilizacije dodatno prečišćene na mRPC C2/C18 koloni (GE Healthcare).

7.3.2 Izolovanje rCPI metal afinitetnom hromatografijom

Rastvori:

1: 50 mM TRIS pufer, 100 mM NaCl pH 7,4

TRIS	6,055 g
NaCl	5,84 g
Dejonizovana voda	Do 1000 mL

*pH je podešena dodatkom 4M HCl

2: 50 mM TRIS pufer, 100 mM NaCl pH 7,4

TRIS	6,055 g
NaCl	5,84 g
Urea	480 g
Imidazol	1,36 g
Dejonizovana voda	Do 1000 mL

*pH je podešena dodatkom 4M HCl

3: 50 mM TRIS pufer, 100 mM NaCl pH 7,4

TRIS	6,055 g
NaCl	5,84 g
Imidazol	10,21 g
Dejonizovana voda	Do 1000 mL

*pH je podešena dodatkom 4M HCl

Postupak:

Nakon fermentacije ćelije su odvojene od podloge centrifugiranjem i ćelijski pelet je resuspendovan u puferu 1 u koji je dodat 0,1 % Natrijum-deoksiholat. Ukupni ćelijski proteini su dobijeni lizom ćelija, odmrzavanjem i zamrzavanjem (3x), i njihovom daljom sonifikacijom (BRANSON Sonifier 150, *Branson Ultrasonic Corp*, 20 kHz frekvencija, 9.5 W učinak, 3 x 20 sekundi). Nerastvorna ćelijska frakcija koja je dobijena nakon centrifugiranja ćelijskog lizata (20 minuta, 5 000 x g), dva puta je isprana puferom 1. rCPI je prečišćen iz nerastvorne ćelijske frakcije na metal afinitetnoj hromatografiji u denaturišućim uslovima. Nerastvorna ćelijska frakcija je solubilizovana u puferu 2 sonifikacijom (20 kHz frekvencija, 9.5 W učinak, 3 x 20 sekundi). rCPI je prečišćen na HI TRAP IMAC coloni (*GE Healthcare*) koja je bila napunjena Co^{2+} i ekvilibrisana u puferu B. Refolding proteina postignut je na koloni, smanjivanjem koncentracije uree od 8 M do 0. rCPI je eluiran sa kolone dodatkom pufera 3, a nakon čega je dijalizovan naspram dejonizovane vode. Homogenost izolovanog rCPI je proverena SDS-PAG elektroforezom i reverzno-faznom hromatografijom.

7.4 Imunohemijske tehnike

7.4.1 Imunoblot

Transfer proteina nakon SDS PAGE elektroforeze ili 2D elektroforeze na nitroceluloznu (NC) membranu je rađen pod dejstvom električne struje jačine 0.8 mA/cm^2 gela u sendviču od 4 sloja filter papira odgovarajućih dimenzija (dimenzije filter papira moraju egzaktno da odgovaraju dimenzijama gela sa koga se vrši transfer) [147]. NC membrana je postavljena prema pozitivnoj elektrodi. Semi-dry uslovi podrazumevaju da sendvič mora dobro da bude oceden od pufera za transfer. Elektrotransfer je trajao 60 minuta. Proteini na membrani su vizualizovani nakon bojenja 0,5 % rastvotom Ponceau-S u 5 % sirćetnoj kiselini.

Pufer za blot:

TRIS	2,90 g
Glicin	1,45 g
SDS	0,185 g
Metanol	100 mL
Dejonizovana voda	do 500 mL

7.4.1.1 Detekcija proteina u imunoblotu (opšti protokol)

Rastvori:

1: Trisom puferisani fiziološki rastvor (TBS): 30 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.6

TRIS	3.63 g
NaCl	9 g
Dejonizovana voda	1 L

*pH je podešena dodatkom 4M HCl

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

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

4. Rastvor za razblaživanje antitela: 0.2 % BSA u tTBS

5. Pufer za AP: 100 mM TRIS, pH 9,6, 50 mM MgCl₂

TRIS	1,21 g
MgCl ₂ ·5H ₂ O	10 mg
Dejonizovana voda	100 mL

*pH je podešena dodatkom 4M NaOH

Priprema supstrata

Supstrat 1		Supstrat 2	
BCIP	50 mg	NBT	100 mg
70 % DMSO	1 mL	DMSO	1 mL

Smeša supstrata se priprema neposredno pred upotrebu. Pomeša se 33 µL supstrata 1 i 66 µL supstrata 2 sa 10 mL pufera za alkalnu fosfatazu. Proizvod koji se dobija ima tamno plavo-ljubičastu boju.

Postupak rada:

NC membrana je obezbojena u tTBS, 10 min, i prebačena u 5% rastvor obranog mleka (u tTBS-u) u kojem je držana 1 h na st uz mešanje u cilju blokiranja nespecifičnog vezivanja antitela za membranu. Nakon toga membrana je ispirana tTBS (3 x 10 min) i postavljena da se inkubira sa prethodno optimizovanom količinom primarnog antitela, 1-2 h na st uz mešanje. Nakon inkubacije u rastvoru sa primarnim antitelom ponovljeno je ispiranje membrane (tTBS, 3 x 10 min) pa je ona potom inkubirana u rastvoru sekundarnih antitela obeleženih alkalnom fosfatazom (AP), 1 h na st uz mešanje. Pre dodatka supstrata membrana je ispirana tTBS 3 x 10 min i TBS 1 x 10 min. Za detekciju su korišćeni supstrati: BCIP/NBT (precipitirajući supstrat alkalne fosfataze).

7.4.1.2 Detekcija proteina u dot blotu (opšti postupak)

Detekcija proteina u dot blotu je rađena po prethodno opisanom protokolu [148].

Rastvori:

Pufer za alkalnu fosfatazu: 100 mM TRIS, pH 10.3, 50 mM MgCl₂

TRIS	1.21 g
MgCl ₂ ·5H ₂ O	10 mg
Dejonizovana voda	Do 100 mL

* pH podesiti 4M NaOH.

Priprema supstrata

Supstrat 1		Supstrat 2	
BCIP	50 mg	NBT	100 mg
70 % DMSO	1 mL	DMSO	1 mL

Smeša supstrata se priprema neposredno pred upotrebu. Pomeša se 33 µL supstrata 1 i 66 µL supstrata 2 sa 10 mL pufera za alkalnu fosfatazu. Proizvod koji se dobija ima tamno plavo-ljubičastu boju.

Postupak rada:

Nitrocelulozna membrana je nakvašena destilovanom vodom 30 min, a potom naneta na uređaj za aplikaciju uzoraka (96-Well dot blot hybridization manifold, VWR). Nakon nanošenja, membrana je inkubirana u 5% rastvoru obranog mleka (u tTBS-u), 1 h na st uz mešanje. Nakon toga membrana je ispirana tTBS (3 x 10 min) i postavljena da se inkubira sa prethodno optimizovanom količinom primarnog antitela, 1-2 h na st uz mešanje. Nakon inkubacije u rastvoru sa primarnim antitelom ponovljeno je ispiranje (tTBS, 3 x 10 min) pa je membrana inkubirana u rastvoru sekundarnih antitela obeleženih alkalnom fosfatazom (AP), 1 h na st uz mešanje. Pre dodatka supstrata membrana je ispirana tTBS 3 x 10 min i TBS 1 x 10 min. Za detekciju su korišćeni supstrati: BCIP/NBT (precipitirajući supstrat alkalne fosfataze).

7.4.1.3 Imunoprint

Nakon IEF poliakrilamidni gel koji je na staklenoj ploči kratko ispran vodom i na njega je postavljena nitrocelulozna membrana (prethodno potopljena u vodu tokom 30 min) i 4 sloja filter papira odgovarajućih dimenzija. Preko toga stavljena je staklena ploča i posle par minuta teg od 500 g. Nakon kapilarnog transfera tokom 1 h proteinski otisak

na membrani vizualizovan je rastvorom potapanjem u 0,5 % rastvor Ponceau S u 5 % sirćetnoj kiselini. Detekcija antigena rađena je kao što je opisano kod imunoblota.

7.4.1.4 Optimizacija detekcije CPI u blotu upotrebom zečijeg anti-fitocistatin (anti-CPI) antiseruma

U cilju karakterizacije specifičnosti afinitetno prečišćenih anti-CPI antiseruma optimizacije detekcije CPI u uzorcima, proteini kivi ekstrakta, razdvojeni su elektroforezom i transferovani na NC membranu elektrotransferom.

Posle blokiranja, membrane su inkubirane sa po 1 mL različitih razblaženja anti-CPI antitela (1:10, 1:100, 1:1 000, 1:10 000, 1:100 000, 1 000 000 u 0,2 % BSA u tTBS), 1h na st uz mešanje. Kao sekundarno antitelo korišćeno je kozje anti-zečji IgG antitelo obeleženo alkalnom fosfatazom (*Sigma-Aldrich*) u razblaženju 1: 30 000 uz upotrebu BCIP/NBT kao supstrata.

7.4.1.5 Detekcija nCPI nakon dot-blot, Western blota, imunoprinta i 2D-Western blota

Svi uzorci nCPI posle razdvajanja elektroforezom i transfera na NC membranu, odnosno kapilarnog ili vakum transfera detektovani su anti-CPI antiserumom razblaženim 1:50 000 u 0,2 % BSA u tTBS, kozjim anti-zečjim IgG antitelom obeleženim alkalnom fosfatazom (*Sigma-Aldrich*) u razblaženju 1: 30 000 uz BCIP/NBT supstrate.

7.4.1.6 Detekcija rCPI nakon dot-blot, Western blota i 2D-Western blota

Svi uzorci rCPI posle razdvajanja elektroforezom i transfera na NC membranu, odnosno vakum transfera detektovani su anti-CPI antiserumom razblaženim 1:50 000 u 0,2 % BSA u tTBS, kozjim anti-zečjim IgG antitelom obeleženim alkalnom fosfatazom (*Sigma-Aldrich*) u razblaženju 1: 30 000 uz BCIP/NBT supstrate.

7.4.1.7 Detekcija ugljeno-hidratnih ostataka na nCPI lektinima obeleženim biotinom

Prisustvo ugljeno-hidratnih ostataka na molekulu nCPI detektovano je sa dva manozno-vezujuća lektina Konkanavalinom A (Con A) i rekombinantnim banana lektinom (rBanLec), kao i fukozo-vezujućim *Aleuria aurantia* lektinom (AAL) prema prethodno opisanom postupku [149]. 0,5 µg/mm nCPI je naneto na SDS-PA gel. Nakon završene

elektroforeze proteini su transferovani na membranu prema prethodno opisanom postupku (7.4.1.). Nakon transfera membrana je blokirana 5 % rastvorom govedeg želatina u tTBS puferu. Za detekciju šećernih ostataka tračice membrane su inkubirane sa Con A lektinom koji je obeležen biotinom (1: 10 000, *Sigma Aldrich*), rBanLec i alkalnom fosfatazom obeleženim AAL (1: 2 000, *Vector Laboratories*) u 1 % želatinu u tTBS. rBanLec i Con A su detektovani konjugatom streptavidina i alkalne fosfataze (1: 5 000, *Sigma Aldrich*), a AAL direktni uz BCIP/NBT kao supstrate.

7.4.1.8 Detekcija nCPI u printovima tkivnih isečaka ploda kivija

Lokalizacija nCPI u tkivu ploda kivija određena printovima isečaka ploda kivija u tkivnim imuno-print (ITP) eksperimentima. NC membrana je potopljena u 100 mM rastvor askorbinske kiseline (da bi se sprečila oksidacija) i osušena pre printovanja. Tanki isečci (1 mm) tkiva kivija su postavljeni na ovako tretiranu membranu. Tkivni isečci su pokriveni filter papirom i staklenom pločom, a nakon 5 minuta dodat je teg od 500 g. Nakon printa, membrana je isprana dejonizovanom vodom, a potom je tretirana po prethodno opisanom protokolu (7.4.1.5.)

7.4.1.9 Detekcija vezivanja IgE iz seruma pacijenata za nCPI i rCPI

Svi uzorci nCPI i rCPI posle razdvajanja elektroforezom i transfera na NC membranu, odnosno kapilarnog ili vakum transfera detektovani su pulom seruma pacijenata alergičnih na kivi razblaženih 3 x u 0,2 % BSA u tTBS uz mešanje na 4°C preko noći. Vezivanje IgE-a za nCPI detektovano je anti IgE antitelom obeleženim alkalnom fosfatazom (1: 1 000, *Sigma-Aldrich*) uz BCIP/NBT supstrate. U slučaju rCPI korišćen je koziji poliklonski anti IgE antiserum (1: 10 000) i zečiji anti koziji anti IgG antiserum obeležen alkalnom fosfatazom (1:30 000, *Sigma-Aldrich*) uz BCIP/NBT supstrate.

7.4.1.10 Denzitometrijska analiza dot blotova

Za denzitometrijsku analizu blotovi su razvijani po proceduri opisanoj u delu 7.4.1.6. Pretpostavljeno je da je vizuelizacija supstratima BCIP/NBT bila proporcionalna količini nanetog nCPI. Intenzitet tačaka je kvantifikovan koristeći GelPro Analyzer 3.1. (*Media Cybernetics*). Kod detekcije nCPI u bakterijskom medijumu nakon rasta pozitivna kontrola (nCPI u LB-u) je smatrana kao maksimalno moguća, tj. 100 % (za svaku koncentraciju nCPI). Intenzitet za svaku tačku uzorka je računat po formuli

$$\text{MGI (\%)} = ((dc - dt) / dc) \times 100$$

gde su dc i dt intenziteti očitani u kontroli odnosno, uzorku.

7.4.2 Elisa testovi

7.4.2.1 ELISA testovi

ELISA testovi su rađeni po prethodno opisanoj proceduri [146].

7.4.2.2 Indirektni ELISA test

ELISA testovi su rađeni na mikrotitar pločama sa ravnim dnom MaxiSorb (*Nunc*) za detekciju IgG. Svi postupci su rađeni na 37 °C bez mešanja.

Rastvori:

Pufer za kuplovanje: 50 mM karbonatno-bikarbonatni pufer pH 9,6

Na ₂ CO ₃	0.159 g
NaHCO ₃	0,293 g
Dejonizovana voda do	100 mL

* pH podesiti dodatkom 1M HCl

DEAE pufer za alkalnu fosfatazu: 100 mM DEAE, 5mM MgCl₂ pH 9,5

dietanolamin	2,10 g
NaCl	1,17 g
100 mM MgCl ₂	10 mL
Dejonizovana voda do	200 mL

* pH podesiti dodatkom 1M HCl

Postupak:

Antigen koncentracije 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL ili 50 µg/mL u 50 mM karbonatno-bikarbonatnom puferu pH 9,6 je naliven u bunare (po 100 µL) i ostavljen tokom noći na 4°C. Pločica se nakon toga ispere 3 puta po 10 min sa tTBS (300 µL). Bunari mikrotitar pločice su inkubirani tokom 1 h sa 5 % obranim mlekom u tTBS radi blokiranja antigenom neokupiranih mesta u bunarima. Nakon toga pločica je ispirana tTBS (3 x 10 min) i postavljena da se inkubira sa prethodno optimizovanom količinom primarnog antitela, 1-2 h na st. Dodavano je 100 µL po bunaru i rađeno je u triplikatu. Nakon

primarnog antitela ponovljeno je ispiranje (tTBS, 3 x 10 min) pa je pločica inkubirana u rastvoru sekundarnih antitela obeleženih alkalnom fosfatazom (AP; 100 µL/bunaru), 1 h na st. Pre dodatka supstrata bunari su ispirani tTBS 3 x 10 min i TBS 1 x 10 min. Za detekciju je korišćen supstrat p-nitrofenil fosfata (pNPP) 0,1 % rastvor u DEAE puferu (pravi se neposredno pred upotrebu; 100 µL/bunaru). Apsorbanca razvijene boje merena je na A₄₀₅ u ELISA čitaču. Opciono reakcija je zaustavljena dodatkom 50 µL 3 M NaOH.

7.4.2.3 ELISA inhibicija

Sve faze izvođenja ELISA inhibicije, kao i svi rastvori koji se koriste, su isti kao kod indirektnog ELISA testa osim koraka vezivanja primarnog antitela. Primarno antitelo je razblaženo u 0,1 % BSA u tTBS na 80-90 % platoa u prethodno određenoj saturacionoj krivoj, ovo je potom inkubirano tokom 30 min na sobnoj temperaturi sa standardnim razblaženjima inhibitora koji se testira. Nakon toga ovaj rastvor je naliven u mikrotitar pločicu i test dalje rađen po proceduri za indirektan ELISA test. Kao kontrola (bez inhibitora) korišćeno je primarno antitelo u radnom razblaženju u puferu u kom je rastvoren inhibitor. U negativnu kontrolu umesto primarnog antitela dodaje se 0,1 % BSA u tTBS.

EC₅₀ vrednost inhibitora predstavlja onu koncentraciju inhibitora koja je potrebna da bi se dobilo 50 % inhibicije u odnosu na kontrolu. Metodom linearne regresione analize na linearnom delu prave je određeno kojom koncentracijom inhibitora se postiže 50 % inhibicije (A₅₀ %) u odnosu na kontrolu (A_c).

$$\% \text{ inhibicije} = (A_c - A_i) / A_c \times 100$$

gde je: A_c – srednja vrednost dobijena za apsorbancu kontrolnog uzorka (primarno antitelo bez inhibitora); A_i – srednja vrednost apsorbance dobijene za određenu koncentraciju ispitivanog inhibitora.

7.4.2.4 ELISA inhibicija vezivanja lektina za nCPI

Sve faze izvođenja ELISA inhibicije, kao i svi rastvori koji se koriste, su isti kao kod indirektnog ELISA testa osim što se za blokiranje koristio 5 % rastvor želatina u tTBS-u, a umesto primarnog antitela biotinom obeleženi rBanLec. rBanLec je razblažen u 1 % želatinu u tTBS na 80-90 % platoa u prethodno određenoj saturacionoj krivoj, ovo je

potom inkubirano tokom 30 min na st sa standardnim razblaženjima inhibitora koji se testira. Nakon toga ovaj rastvor je naliven u mikrotitar pločicu i test dalje rađen po proceduri za indirektan ELISA test. Kao inhibitori su korišćeni rastvori glukoze (50-400 mM) i manoze (50-400 mM). Kao kontrola (bez inhibitora) koristi se rBanLec u radnom razblaženju u puferu u kom je rastvoren inhibitor. Za negativnu kontrolu se umesto primarnog antitela dodaje 1 % želatin u tTBS.

EC₅₀ vrednost inhibitora predstavlja onu koncentraciju inhibitora koja je potrebna da bi se ostvarilo 50 % inhibicije u odnosu na kontrolu. Metodom linearne regresione analize na linearnom delu prave je određeno kojom koncentracijom inhibitora se postiže 50 % inhibicije (EC₅₀ %) u odnosu na kontrolu (Ac).

$$\% \text{ inhibicije} = (Ac - Ai) / Ac \times 100$$

gde je: Ac – srednja vrednost dobijena za apsorbancu kontrolnog uzorka (primarno antitelo bez inhibitora); Ai – srednja vrednost apsorbance dobijene za određenu koncentraciju ispitivanog inhibitora.

7.5 Analitičke tehnike

7.5.1 Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Za određivanje koncentracije proteina korišćen je Bradford-ov metod [150]. Metod je prilagođen za rad sa malim količinama uzorka, a u slučajevima niskih koncentracija proteina u uzorku, modifikacije su rađene i za mikro metode. Koncentracija proteina je određivana u mikrotitar pločicama (F-tip), a apsorbancija je očitavana ELISA čitačem (*LKB* Micro plate reader 5060-006), na talasnoj dužini od 620 nm.

Za konstruisanje standardne prave je korišćen rastvor BSA koncentracije 1,0 mg/mL, razblažen destilovanom 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 polazne koncentracije 0,1 mg/mL je razblažen destilovanom vodom do finalnih koncentracija 0,075 mg/mL, 0,050 mg/mL, 0,025 mg/mL, 0,010 mg/mL.

Polazni rastvor BSA (1mg BSA/mL)

BSA	5 mg
Dejonizovana voda do	5 mL

Pripremanje standardnih rastvora BSA:

Polazni rastvor BSA (μ L) 1 mg/mL	Dejonizovana voda (μ L)	Finalna koncentracija BSA (mg/mL)
100	0	1.00
75	25	0.75
50	50	0.50
25	75	0.25
10	90	0.10

Polazni rastvor BSA (0,1mg BSA/mL)

BSA	1 mg
Dejonizovana voda do	10 mL

Pripremanje standardnih rastvora BSA:

Polazni rastvor BSA (μL) 0,1 mg/mL	Dejonizovana voda (μL)	Finalna koncentracija BSA (mg/mL)
100	0	0.100
75	25	0.075
50	50	0.050
25	75	0.025
10	90	0.010

Vrednosti za koncentraciju proteina su izračunate iz jednačine prave

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

7.5.2 Bradford-ov metod za određivanje koncentracije proteina

Rastvor boje:

CBB G-250	250 mg
95 % etanol	50 mL
Fosforna kiselina 96 %	100 mL
Dejonizovana voda do	200 mL

Boja se rastvori u etanolu uz mešanje na magnetnoj mešalici, doda se kiselina i voda do potrebne zapremine. Pre upotrebe, boja se razblaži pet puta vodom i filtrira.

U 200 μL rastvora boje se odmeri 5 μL uzorka za makrometod ili 20 μL uzorka za mikrometod i nakon 5 min se očitava apsorbancija uz korišćenje filtera na 595 nm (5 μL , odnosno, 20 μL vode u 200 μL boje je slepa proba).

Ovom metodom je moguće odrediti količine proteina u opsegu od 2-20 μg .

7.5.3 Određivanje koncentracije prečišćenih proteina

Koncentracije čistih proteina (Act d 1 i Act d 4) određivane su spektroskopskom metodom. Apsorbancija na 280 nm rastvora proteina merena je u standardnoj 1 cm kvarcnoj kiveti na spektrofotometru WPA Lightwave S2000 UV/Vis spectrophotometer.

Teorijski ekstinkcioni koeficijenti su izračunati na osnovu publikovanih sekvenci Act d 1 i Act d 4, koristeći formulu:

$$A_{280\text{ nm}} (1\text{ mg/mL}) = (5690n_w + 1280n_y + 120n_c)/M,$$

Gde su n_w , n_y i n_c broj Trp, Tyr i Cys aminokiselinskih ostataka, redom, a M je masa polipeptida.

7.5.4 N-terminalno sekvenciranje nCPI i rCPI

N-terminalno sekvenciranje je odrađeno ljubaznošću dr Arnda Petersena (Departman za kliničku i molekulsku alergologiju, Istraživački centar Borstel, Borstel, Nemačka). Za N-terminalno sekvenciranje proteini su polusuvim transferom (7.4.1.) prebačeni na PVDF membranu (*Serva*) prema prethodno opisanoj proceduri [146]. Nakon transfera, membrana je isprana deionizovanom vodom, obojena 0,1 % rastvorom Comassie Blue (*Serva*) u 50 % metanolu, a obezbojena 50 % vodenim rastvornim metanolom i osušena na vazduhu. Proteinska traka je isečena i mikrosekvencirana na Procise protein sequencer koji je povezan na PTH amino-kiselinski analizator (*PE Biosystems*).

7.5.5 Masena analiza nCPI

Masena analiza nCPI odrađena je ljubaznošću dr Buka Lindnera (Departman za imunohemiju, Istraživački centar Borstel, Borstel, Nemačka). Molekulska masa prečišćenog nCPI određena je MALDI TOF-MS analizom uz Reflex III (*Bruker-Daltonik*) u pozitivnom jonskom modalitetu. Protein je rastvoren u dejonizovanoj vodi u koncentraciji 5 mg/mL i razblažen sveže pripremljeni matriks rastvorom (3,5-dimetoksi-4-hidroksicimetna kiselina tj. sinapinska kiselina (*Sigma-Aldrich*, u 2:1 odnosu sa smešom 0,1 % TFA u acetonitrilu) u odnosu 1:60. Alikvoti od 0,5 mL su postavljeni na držače za uzorke i analizirani odmah nakon sušenja pod strujom vazduha.

Za analizu aminokiselinske sekvence izolovanog nCPI rađen je maseni otisak prsta. Uzorak prečišćenog proteina je razdvojen SDS-PAG elektroforezom (7.2.2.) i nakon bojenja proteinska traka je isečena iz gela, obezbojena i preko noći digestovana goveđim tripsinom za sekvenciranje (*Roche Diagnostics GmbH*) po već opisanom postupku [151]. Za MALDI-TOF analizu tripsinskih fragmenata, α -cijano-4-hidroksi cimetna kiselina (CHCA) je korišćena kao matriks. Maseni spektar izmerenih monoizotopskih pikova poreden je sa masama teorijskih tripsinskih fragmenata dobijenih analizom sekvence nCPI (GenBank AAR92223).

7.5.6 Masena analiza rCPI

Masena analiza rCPI odrađena je ljubaznošću dr Uroša Anđelkovića (Centar za hemiju, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Beograd, Srbija). Za analizu aminokiselinske sekvence izolovanog rCPI rađen je maseni otisak prsta. Uzorak prečišćenog proteina je razdvojen SDS-PAG elektroforezom (7.2.2.) i nakon bojenja proteinska traka je isečena iz gela, obezbojena i preko noći digestovana goveđim tripsinom za sekvenciranje (*Promega*) po uputstvima proizvođača. Dobijeni peptidi su injektovani na reverzno faznu C18 kolonu (ACQUITY UPLC BEH 130, 1,7 μ m, 2,1 x 50 mm, *Waters*) montiranu na Acquitz UPLC sistem (*Waters*) i razdvojeni su gradijentom acetnitrila (0-50 % za 40 minuta sa 0,1 % mravljom kiselinom). Maseni spektri su snimljeni na tripl kvadrupol masenom spektrometru (ACQUITY TQD,

Waters) u pozitivnom jonskom modalitetu. Dobijeni peptidni fragmenti su analizirani u NCBI bazi podataka koristeći program MASCOT.

7.5.7 Hromatografske tehnike

Tečne hromatografije visokih performansi (HPLC) rađene su na ÄKTA Purifier 10 HPLC sistemu (*Amersham Pharmacia Biotech*). Za vođenje hromatografija i obradu dobijenih podataka korišćen je UNICORN program. Neposredno pre analize svi uzorci su centrifugirani tokom 20 min na 13 400 rpm i odgovarajuća zapremina supernatanta je injektovana na prethodno ekvilibrisanu kolonu.

7.5.7.1 Reverzno-fazna HPLC

Karakteristike kolone μ RPC C2/C18 PC 3.2/3

Matriks	porozni sferni mikročestični silanol za koji su kovalentno vezani C2/C18 alkil lanci	
Nulta zapremina	oko 0,24 mL	
Maksimalni kapacitet za proteine	1-3 mg	
pH stabilnost	standardno korišćenje 2-8	
Temperatura	standardno korišćenje 4-40 ⁰ C	Čuvanje 4-30 ⁰ C
Pritisak	standardno korišćenje 1,5-15 MPa 15-150 mbar 225-2250 psi	ne preko! 35 MPa 350 bar 5000 psi
Brzina protoka	standardno korišćenje	
Voda na ST	0,01-1,2 mL/min	1,2 mL/min

Reverzno-fazna HPLC rađena je na komercijalnoj μ RPC C2/C18 PC4.6/10 koloni (*GE Healthcare*) C, zapremine 4,125 mL. Kolona je ekvilibrisana sa eluentom A (0,65 % TFA, 2 % acetonitril) i po 1 mL uzorka je naneton na kolonu. Komponente su eluirane linearnim gradijentom od 0 do 100 % eluenta B (0,5 % TFA u 80 % acetonitrilu) tokom 10 zapremina kolone, pri protoku od 1 mL/min. Hromatografija je praćena merenjem apsorbanace na 280 nm, 215 nm , pri čemu su sakupljane frakcije od po 0,5 mL.

7.6 Funkcionalni testovi

7.6.1 Određivanje inhibitorne aktivnosti CPI

Biološka aktivnost prečišćenih CPI (nCPI i rCPI) testirana je praćenjem sposobnosti inhibicije proteolitičke aktivnosti papaina.

Rastvori:

Rasvor 1: Štok Bapne-50 mM

Bapna	21,75 mg
DMSO do	1 mL

Rastvor 2: Štok papaina:

papain	305 µg
Dejonizovana voda do	1 mL

*za esej je korišćen komercijalni papain (1 IU/mL, *Sigma Aldrich*)

Rastvor 3: pufer za papain

Koncentracija Fosfata, mM	100
Koncentracija DTT-a, mM	2,5
Koncentracija EDTA, mMg	5
pH	6.8

Postupak:

Esej je izvođen u mikrotitar pločici sa 96-bunara i ravnim dnom (*Sarsted*). 70 µl rastvora 3 pomešano je sa 10 µl rastvora 2 i sa 10 µL rastvora inhibitora različite koncentracije (od 3,125 µg/mL to 250 µg/mL), a potom je inkubirano 15 minuta na st. Reakcija je započeta dodavanjem 10 µL supstrata (rastvor 1). Nakon 60 minuta reakcija je stopirana dodavanjem glacijalne sirćetne kiseline i merena je apsorbancija na 405 nm. Inhibitorna sposobnost cistatina je izračunavana korišćenjem linearne regresije.

7.6.2 Test aktivacije bazofila

Test se zasniva na određivanju broja bazofila aktiviranih odgovarajućim alergenom od ukupne populacije bazofila. Puna krv alergičnog pacijenta se inkubira sa fluorescentno obeleženim antitelima specifičnim za populaciju bazofila (anti-CD203c), kao i sa antitelima specifičnim za aktivirane ćelije (anti-CD63). Nakon lize eritrocita na

protočnom citimetru broje se bazofili, a i od ukupne populacije bazofila određivan je procenat onih koji su aktivirani.

Rastvori:

FITC- konjugovano monoklonsko anti-CD63 antitelo vezuje se za CD63 koji se eksprimira na površini neutrofila i bazofila nakon njihove aktivacije (*Immunotech*)

PE-konjugovano monoklonsko anti-CD203c antitelo prepoznaje CD203c, antigen ekspimiran na humanim bazofilima iz periferne krvi ali ne i na drugim ćelijama (*Immunotech*)

Za test se koristila heparinizirana puna krv alergičog pacijenta. Pre izvođenja testa krv je blago mešana na st tokom 30 min.

Pufer za lizu eritrocita

NH ₄ Cl	154 mM
KHCO ₃	10 mM
EDTA	100 μM

* pufer mora da se pravi svež neposredno pre upotrebe

Postupak:

U FACS tube odmeravano je po 45 μL pune krvi i 45 μL RPMI, a zatim je dodavano 10 μL alergena. Umesto alergena u pozitivne kontrole dodato je 10 μL monoklonskog anti-humanog IgE (finalno 1 μg/ml i 0,1 μg/ml), dok je u tube sa samim ćelijama i negativnom kontrolom dodato po 10 μL PBS-a. Tube su kratko promešane na vortexu (2-3 sekunde) i inkubirane tokom 20 min na 37°C.

Nakon toga uzorci su ohlađeni na 4°C i dodato je po 5 μL anti-CD63 antitela obeleženog sa FITC i po 5 μL anti-CD203c antitela obeleženog sa PE. Antitela nisu dodavana u epruvetu u kojoj su nalazile samo ćelije, dok se u pozitivnu kontrolu / FITC dodavalo samo 5 μL anti-CD63 antitela, a u pozitivnu kontrolu / PE 5 μL anti-CD203c antitela. Tube su kratko promešane na vortexu, a potom inkubirane tokom 30 min na 4°C u mraku.

Nakon inkubiranja eritrociti su lizirani dodatkom po 1 mL lizirajućeg pufera. Liza je kompletna kada se mutna ćelijska suspenzija skoro potpuno izbistri (5 min). Nelizirane ćelije (među njima i bazofili) su istaložene centrifugiranjem (300 x g, 5 min, 4°C). Ćelije su isprane jedan put (ili dva puta) dodatkom 1 mL PBS-a, epruvete mešati blagim izvrtanjem gore-dole i centrifugirati na 300 g tokom 5 min na 4°C. Isprane ćelije su resuspendovane u 400 µL PBS-a i odmah ih analizirati na protočnom citometru.

7.6.3 Kožne probe na pacijentima alergičnim na kivi

Kožne probe urađene su ljubaznošću dr Marine Atanasković-Marković (Univerzitetna dečija klinika Tiršova, Beograd, Srbija). Kožne probe su rađene sa punim ekstraktom kivija (koncentracija proteina 500 µg/mL) i prečišćenim nCPI (50 µg/mL) u PBS/glicerol (1:2 v:v) prema standardnoj proceduri [152]. Na unutrašnju stranu podlaktice nanošen je histamin (10 mg/mL), PBS kao pozitivna i negativna kontrola, respektivno i rastvori alergena. Nakon toga koža je zagrebana, a nakon 20 minuta meren je prečnik papule i poređen sa pozitivnom tj. negativnom kontrolom. Kao pozitivan rezultat smatrao se dijametar veći od 3 mm. Kao kontrola eksperimenta 3 nealergične osobe takođe su testirane ekstraktom i prečišćenim alergenom.

7.6.4 *In vitro* antifungalna aktivnost nCPI i rCPI

Antifungalna aktivnost nCPI i rCPI je ispitivana na sojevima fitopatogenih gljiva *Alternaria radicina* i *Botrytis cinerea* dobijene ljubaznošću dr Aleksandre Bulajić (Institut za fitomedicinu, Katedra za Fitopatologiju, Poljoprivredni fakultet, Beograd, Srbija).

Rastvori:

PDA-Krompir dekstrozni agar (*Difco*)

2 % rastvor Tween-20 (*Serva*) u dejonizovanoj vodi (sterilan)

TSB-tripton soja bujon (*Institutu za virusologiju, vakcine i serume Torlak.*)

Postupak:

Esej je rađen u sterilnim mikrotitar pločicama sa ravnim dnom (*Sarsted*). Izolati gljiva su gajeni na PDA podlozi 7 dana na 28°C. Inokulum je pripremljen grebanjem agar ploča sa sterilnim 2 % rastvorom Tween-20 u dejonizovanoj vodi. Inokulumi su

razblaženi u TSB do 10^4 spora/mL. 90 μ L inokuluma pomešano je sa 10 μ L rastvora CPI različite koncentracije nCPI (0; 0,47; 1,87; 3,75; 7,50 or 15 μ M) i rCPI (0; 0,47; 1,87; 3,75; 7,50 or 15 μ M) i gajeni su 48 h na 28°C. Rast gljiva praćen je merenjem optičke gustine (OD) na 620 nm. Rezultati su iskazani kao procenat relativnog rasta, izračunat u odnosu na kontrolni uzorak koji je rastao bez prisustva inhibitora. Svaka koncentracija je ponovljena triplikatu, a čitav ekperiment je ponovljen 2 puta. Srednja vrednosti rasta gljiva u odnosu na kontrolu (bez inhibitora) prevedena je u procenat rasta po formuli:

$$\text{MGI}(\%) = [(dc - dt) / dc] \times 100$$

gde su dc i dt vrednosi OD_{620} u kontrolnom, onosno tretiranom uzorku respektivno. Da bi se utvrdilo da li CPI dovodi do morfoloških promena na gljivama, uzorci su ispitivani pod mikroskopom.

7.6.5 Uticaj nCPI na klijanje fungalnih konidija

Da bi se utvrdio mehanizam antifungalne aktivnosti koju nCPI ispoljava meren je uticaj koji ispoljava na rane faze fungalnog razvoja, tj. klijanje aseksualnih spora (konidija). Test je rađen brojanjem prokljalih spora (od 100 ukupno izbrojanih) iz suspenzije u preparatu viseće kapi.

Rastvori:

2 % rastvor Tween-20 (*Serva*) u dejonizovanoj vodi (sterilan)

2 % rastvor d-glukoze u dejonizovanoj vodi (sterilan)

Postupak:

Suspenzija spora je napravljena kako je prethodno opisano (7.6.5.). Razblaženje od 10^4 spora/mL je napravljeno u 2 % rastvoru glukoze ili različitim koncentracijama nCPI (1,25; 2,5; 5; 10 μ M) u istom rastvoru. Za pripremu preparata visećih kapi, alikvot od 50 μ L suspenzije spora je stavljan na mikroskopsko staklo i pokriven sa pokrovnim staklom. Svaka pločica je sadržala dva uzorka, kontrolni uzorak suspenzije spora bez dodatog CPI i tretman koji je sadržavao CPI. Preparati su inkubirani na 22°C u vlažnoj atmosferi dok germinacija u kontroli nije dostizala 80 % (4 h u slučaju *A.radicina* i 24 h u slučaju *B.cinerea*). Germinacija, odnosno klijanje spora, je definisana kao trenutak u

kome dužina klice prevazilazi dijametar spore. Procenat prokljalih spora je procenjen mikroskopskom analizom preparata viseće kapi. Za svaku koncentraciju postavljeno je 5 ponavljanja i minimum od 100 spora je broj u svakom uzorku. Procenat inhibicije je računat na osnovu Abbottove formule:

$$\text{MGI}(\%) = [(G_c - G_t) / G_c] \times 100$$

gde G_t i G_c predstavljaju srednju vrednost prokljalih spora u kontrolnom uzorku, odnosno tretmanu, respektivno. Eksperimenti su ponovljeni dva puta.

7.6.6 *In vivo* antifungalna aktivnost nCPI-testovi patogenosti na voću i povrću

Ispitivanje *in vivo* antifungalne aktivnosti nCPI je izvedeno na sveže ubranim jabukama (*Malus domestica* var. Idared) i šargarepama (*Daucus carota*).

Rastvori:

2 % rastvor d-glukoze u dejonizovanoj vodi (sterilan)

5 % komercijalni rastvor varikine (ekvivalentno 0,025 % rastvora hlora)

Postupak:

Biljni organi su sterilisani rastvorom varikine, oprani česmenskom vodom i ostavljeni da se osuše na vazduhu. Na jabukama su napravljeni ubodi (5 mm dubine), na četiri mesta, duž ekvatora, dok je kod šargarepa to urađeno duž duže ose korena. Rane na jabukama su inokulisane suspenzijom spora gljive *B. cinerea* dok su rane na korenu šargarepe inokulisane gljivom *A. radicina*. Inokulumi su pripremljeni u 2 % glukozi sa (tretman) i bez (kontrola) nCPI. Inokulumi su sadržavali 10^4 konidija/mL dok je koncentracija nCPI bila 10 μ M. Inokulumi (10 μ L) su naneti na svaku od rana. I tretman i kontrola su postavljeni u multiplikatu (pet jabuka/šargarepa po koncentraciji, 4 rane po komadu). Nakon inokulacije voće/povrće je inkubirano na 20°C u vlažnoj atmosferi (90 % RH-relativna vlažnost *engl.* relative humidity). Simptomi su očitani 7 dana po inokulaciji i izraženi su kao broj inficiranih rana po tretmanu. Eksperimenti su ponovljeni dva puta.

7.6.7 Određivanje inhibitorne aktivnosti nCPI prema unutarćelijskim i vanćelijskim proteazama gljiva *A. radicina* i *B. cinerea*

Da bi se utvrdilo na koji način nCPI ispoljava svoj antifungalni uticaj ispitivan je inhibitorni potencijal ovog molekula na unutarćelijske i ekstracelularne proteaze gljiva *Alternaira radicina* i *Botrytis cinerea*. Za ovo je korišćen kazeinolički esej ranije opisan u literaturi [153].

Rastvori:

TSB-tripton soja bujon (*Institutu za virusologiju, vakcine i serume Torlak.*)

Pufer za enzimsku aktivnost: 300 mM kalijum fosfatni pufer, pH 7 koji sadrži 12 mM L-cistein, 12 mM (EDTA) and 12 mM NaOH.

1 % kazein (w/v) u puferu za enzimsku aktivnost

100 % TCA u vodi

Postupak:

Izolati gljiva *Alternaira radicina* i *Botrytis cinerea* gajeni su u TSB medijumu na 28°C 48 h. Nakon perioda rasta, ćelije su odvojene od podloge centrifugiranjem (5 000 x g, 15 minuta). Ćelije su lizirane, zamrzavanjem i odmrzavanjem (3 ciklusa), koje je praćeno sonifikacijom ćelija (20 kHz frekvencija, 9.5 W učinak, 20 minuta) na ledenom kupatilu. 25 µL ćelijskog lizata ili fermentacione tečnosti inkubirano je tokom 10 minuta na st sa 10 µL rastvor nCPI različite koncentracije, a potom je pomešano sa 1 mL rastvora kazeina. Nakon 20 minuta inkubacije na 37°C u reakcionu smešu je dodata TCA tako da je finalna koncentracija TCA bila 5 % i nakon 1 h vremena inkubacije na 37°C reakciona smeša je centrifugirana (10 minuta, 13 000 x g). U supernatantima je merena apsorbance na 280 nm. Jedna jedinica je definisana kao količina enzima koja daje ΔA_{280} /minuti od 1,0. Srednje vrednosti inhibicije ponovljenih merenja su sračunate, potom je koristeći njih dobijen procenat inhibicije po formuli:

$$\text{MGI}(\%) = [(dc - dt) / dc] \times 100$$

gde su dc i dt vrednosti A_{280} u neinhibiranom, odnosno tretiranom uzorku. Eksperimenti su ponovljeni dva puta.

7.6.8 *In vitro* antibakterijska aktivnost nCPI

Antibakterijska aktivnost nCPI je ispitivana na sojevima fitopatogenih bakterija *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404, *Burkholderia cepacia* ATCC 2159, i *Erwinia carotovora* dobijenih ljubaznošću dr Tanje Berić (Katedra za mikrobiologiju, Biološki fakultet, Beograd, Srbija)

Rastvori:

LA agar

LB podloga

2 % rastvor Tween-20 (*Serva*) u dejonizovanoj vodi (sterilan)

TSB-tripton soja bujon (*Institutu za virusologiju, vakcine i serume Torlak.*)

Postupak:

Esej je rađen u sterilnim mikrotitar pločicama sa ravnim dnom (*Sarsted*). Bakterije su gajene na LA podlozi na 28°C. Inokulum je pripremljen gajenjem pojedinačne kolonije u LB preko noći na 28°C. Inokulumi su razblaženi u LB do 10⁴ CFU/mL. 90 µL inokuluma pomešano je sa 10 µL rastvora CPI različite koncentracije nCPI (0; 0,47; 1,87; 3,75; 7,50 ili 15 µM) i gajeni su 20 h na 28°C. Rast bakterija praćen je merenjem optičke gustine (OD) na 620 nm. Rezultati su iskazani kao procenat relativnog rasta koji je izračunat u odnosu na kontrolni uzorak koji je rastao bez prisustva inhibitora. Svaka koncentracija je ponovljena triplikatu, a čitav eksperiment je ponovljen 2 puta. Srednja vrednosti rasta bakterija u odnosu na kontrolu (bez inhibitora) prevedena je u procenat rasta po formuli:

$$\text{MGI}(\%) = [(dc - dt) / dc] \times 100$$

gde su dc i dt vrednosi OD₆₂₀ u kontrolnom, onosno tretiranom uzorku respektivno.

7.6.9 Određivanje inhibitorne aktivnosti nCPI prema unutarćelijskim i vanćelijskim proteazama bakterija *A. tumefaciens* LBA 4404, *B. cepacia* ATCC 2159, i *E. carotovora*

Da bi se utvrdilo na koji način nCPI ispoljava svoj antibakterijski uticaj ispitivan je inhibicioni potencijal ovog molekula na unutarćelijske i vanćelijske proteaze bakterija

A. tumefaciens LBA 4404, *B. cepacia* ATCC 2159, i *E.carotovora*. Za ovo je korišćen kazeinolitički esej ranije opisan u literaturi [153].

Rastvori:

TSB-tripton soja bujon (*Institutu za virusologiju, vakcine i serume Torlak*)

Pufer za enzimsku aktivnost: 300 mM kalijum fosfatni pufer pH 7 koji sadrži 12 mM L-cistein, 12 mM (EDTA) and 12 mM NaOH.

1 % kazein (w/v) u puferu za enzimsku aktivnost

100 % TCA u vodi

Postupak:

Bakterije su gajene u LB podlozi preko noći na 28°C Nakon perioda rasta, ćelije su odvojene od podloge centrifugiranjem (15 minuta, 5 000 x g). Ćelije su lizirane zamrzavanjem i odmrzavanjem (3 ciklusa) koje je praćeno sonifikacijom ćelija (20 kHz frekvencija, 9.5 W učinak, 20 minuta) na ledenom kupatilu. 25 µL ćelijskog lizata ili fermentacione tečnosti inkubirano je tokom 10 minuta na st sa 10 µL rastvor nCPI različite koncentracije, a potom je pomešano sa 1 mL rastvora kazeina. Nakon 20 minuta inkubacije na 37°C u reakcionu smešu je dodata TCA tako da je finalna koncentracija TCA bila 5 % i nakon sat vremena inkubacije na 37°C reakciona smeša je centrifugirana (10 minuta, 13 000 x g). U supernatantima je merena apsorbanca na 280 nm. Jedna jedinica je definisana kao količina enzima koja daje ΔA_{280} /minutu od 1. Srednje vrednosti inhibicije ponovljenih merenja korišćene su za određivanje procenta inhibicije po formuli:

$$\text{MGI}(\%) = [(dc - dt) / dc] \times 100$$

gde su dc i dt vrednosti A_{280} u neinhibiranom, odnosno tretiranom uzorku. Eksperimenti su ponovljeni dva puta.

7.7 Strukturni testovi

7.7.1 Cirkularni dihroizam (CD)

CD spektri proteina snimani su na 25°C on a Jasco J-815 A spectrometra (*Jasco*) koji je kalibrisan sa (+)-10-kamforsulfonskom kiselinom [154]. Merenja su rađena u dalekom UV regionu (190-240 nm) u rastvoru proteina od 0,2 mg/mL pri optičkom putu od 0,1 cm. Prirodni i rekombinantni CPI su prečišćeni po prethodno opisanom protokolu (7.3). Uzorci su pre merenja dijalizovani naspram 10 mM fosfatnog pufera pH 7,0. CD vrednosti su predstavljene kao molski elipticitet. Procena sadržaja sekundarnih struktura rađena je preko DichroWeb servera [155] koristeći K2D algoritam [156, 157].

7.7.2 Predviđanje trodimenzionalne strukture nCPI i rCPI

Trodimenzionalna struktura nCPI i rCPI predviđena je korišćenjen automatizovanog Phyre2 servera [158]. Za kreiranje modela baziranih na homologiji kao templat korišćena je struktura OC-I cistatina iz pirinča (PDB broj 1EQK). Strukturna analiza modela rađena je u UCSF Chimera 1.6.1 softveru [159].

7.8 Kreiranje, selekcija i proizvodnja hipoalergenih mutanata aktinidina glavnog alergena kivija

7.8.1 Priprema rastvora i podloga

7.8.1.1 YNB-CAA - tečna podloga

Sastav YNB-CAA tečnog medijuma:

Yeast nitrogen base	14 g
Kazaminokiseline	50 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	50 g
Dejonizovana voda do	900 mL

Postupak rada:

Za pripremu podloga korišćene su supstance Yeast nitrogen base (*Roth*), Kazaminokiseline (*Roth*) i (NH₄)₂SO₄ (*Roth*). Po rastvaranju sastojaka podloge, podloga je razlivena u odgovarajuće sudove i nakon toga autoklavirana 20 minuta na temperaturi od 121°C i pritisku od 103,5 kPa. Nakon autoklaviranja podloga je ohlađena i u nju je dodato 100 mL 20 % sterilnog rastvora šećera (glukoza ili galaktoza)

7.8.1.2 YNB-CAA - čvrsta podloga

Sastav YNB-CAA čvrstog medijuma:

Yeast nitrogen base	14 g
Kazaminokiseline	50 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	50 g
Agar	15 g
Dejonizovana voda do	900 mL

Postupak rada:

Za pripremu podloga korišćene su supstance Yeast nitrogen base (*Roth*), Kazaminokiseline (*Roth*) i (NH₄)₂SO₄ (*Roth*). Po rastvaranju sastojaka podloge, podloga

je razlivena u odgovarajuće sudove i nakon toga autoklavirana 20 minuta na temperaturi od 121°C i pritisku od 103,5 kPa. Nakon autoklaviranja podloga je ohlađena i u nju je dodato 100 mL 20 % sterilnog rastvora šećera (glukoza ili galaktoza), a potom je sterilno razlivena u Petri kutije.

7.8.1.3 20 % rastvor glukoze:

Sastav 20 % rastvora glukoze:

Glukoza anhidrovana	20 g
Dejonizovana voda	do 100 mL

Anhidrovana glukoza je rastvorena u dejonizovanoj vodi i sterilno proceđena kroz filter od 0,2 µM. Proceđeni rastvor je alikvotiran i čuvan na 4°C do upotrebe.

7.8.1.4 20 % rastvor galaktoze:

Sastav 20 % rastvora galaktoze:

Galaktoza anhidrovana	20 g
Dejonizovana voda	do 100 mL

Anhidrovana galaktoza je rastvorena u dejonizovanoj vodi i sterilno proceđena kroz filter od 0,2 µM. Proceđeni rastvor je alikvotiran i čuvan na 4°C do upotrebe.

7.8.1.5 2 x YPD - tečna podloga

Sastav 2 x YPD tečnog medijuma:

Pepton	14 g
Ekstrakt kvasca	50 g
Dejonizovana voda do	900 mL

Postupak rada:

Za pripremu podloga korišćene su supstance pepton (*Roth*) i ekstrakt kvasca (*Roth*). Po rastvaranju sastojaka podloge, podloga je razlivena u odgovarajuće sudove i nakon toga

autoklavirana 20 minuta na temperaturi od 121°C i pritisku od 103,5 kPa. 2xYPD - čvrsta podloga

Sastav 2xYPD čvrstog medijuma:

Pepton	14 g
Ekstrakt kvasca	50 g
Agar	15
Dejonizovana voda do	900 mL

Postupak rada:

Za pripremu podloga korišćene su supstance pepton (*Roth*) i ekstrakt kvasca (*Roth*). Po rastvaranju sastojaka podloge, podloga je razlivena u odgovarajuće sudove i nakon toga autoklavirana 20 minuta na temperaturi od 121°C i pritisku od 103,5 kPa. Nakon autoklaviranja podloga je sterilno razlivena u Petri kutije.

7.8.1.6 1 M rastvor litijum acetata:

Sastav 1M rastvora litijum acetata:

Litijum acetat	65,98 g
Dejonizovana voda	do 100 mL

Anhidrovani litijum acetat je rastvoren u dejonizovanoj vodi i autoklaviran 20 minuta na temperaturi od 12°C i pritisku od 103,5 kPa. Sterilni rastvor je čuvan na 25°C do upotrebe.

50 % (w/v) rastvor polietilen glikola (PEG) 3500:

Sastav 50 % rastvora PEG-a 3500:

PEG 3500	50 g
Dejonizovana voda	do 100 mL

PEG 3500 je rastvoren u dejonizovanoj vodi i autoklaviran 20 minuta na temperaturi od 121°C i pritisku od 103,5 kPa. Sterilni rastvor je čuvan na 25°C do upotrebe.

7.8.1.7 TE pufer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) pH 8,0:

Sastav TE pufera:

Tris	0,157 g
Di natrijum EDTA	0,037 g
Dejonizovana voda	do 100 mL

*pH je podešena dodatkom 4M HCl

TRIS i EDTA su rastvoreni u dejonizovanoj vodi i nakon podešavanja pH rastvor je autoklaviran 20 minuta na temperaturi od 121°C i pritisku od 103,5 kPa. Sterilni rastvor je čuvan na 25°C do upotrebe.

7.8.1.8 Jednolančana DNK nosilac ss-DNK (ss - *engl.* Ssingle-stranded) 2 mg/mL:

Sastav rastvora ss-DNK:

ss-DNK 10 mg/mL (Invitrogen)	100 µL
TE pufer	400 µL

Štok rastvor ss-DNK (*Invitrogen*) je razblažen u sterilnom TE puferu i alikvotiran. Pre upotrebe rastvor ss-DNK je zagreva 5-10 minuta na 99°C, a potom momentalno ohlađen u ledenom kupatilu. ss-DNK se može zagrevati 3-4 puta bez značajnog gubitka aktivnosti.

7.8.2 Kloniranje gena za aktinidin u pQE9

Gen za aktinidin u pQE9 dobijen je ljubaznošću v.prof Marije Gavrović-Jankulović (Katedra za biohemiju, Hemijski fakultet, Beograd, Srbija). Gen za aktinidin je izolovan iz cDNA biblioteke zelenog kivija (*Actinidia deliciosa*, Liang Ferguson) u okviru master rada Rogaie Dreidi [160].

7.8.3 Amplifikacija gena za aktinidin

Gen za aktinidin je umnožen PCR reakcijom koristeći specifične prajmere za aktinidin koji sadrže mesta za restrikcione endonukleaze Nhe I i Sal I. Za reakciju lančane

polimerizacije korišćeni su Pfu polimeraza i 10 x pufer za Pfu polimerazu (*Fermentas*), miks dezoksiribonukleotida-dNTPs (*Fermentas*), 10 μ M prajmeri (*Operon*) prema uputstvu proizvođača. Kao matična DNK korišćen je konstrukt aktinidina u pQE9 vektoru koji je dobijen na način opisan u poglavlju 7.8.2.

Sastav smeše za PCR:

10 x pufer za Pfu polimerazu	5 μ L
10 mM dNTPs	1 μ L
10 μ M uzvodni prajmer	1 μ L
10 μ M nizvodni prajmer	1 μ L
Dream Taq polimeraza	0,3 μ L
Templatna DNK	1 μ L
Dejonizovana voda	do 50 μ L

U dejonizovanu vodu dodat je 10 x pufer za Pfu polimerazu, dezoksiribonukleotidi (dNTPs), prajmeri, templatna DNK i Pfu polimeraza. Sekvence korišćenih prajmera su:

Uzvodni prajmer: 5' - ATG *GCT AGC* TTG CCG AGT TAT GTT GAT TGG AGG - 3'

Nizvodni prajmer: 5' - ATG *GTC GAC* TCC AGC GCG GTA CCT CTG TCC - 3'

Mesta za sečenje restrikcionim endonukleazama su označena kurzivom.

PCR reakcija je rađena po sledećem temperaturnom profilu:

Korak	Temperatura (°C)	Vreme (sec)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	95	180	
Denaturacija	95	60	30
Hibridizacija prajmera	64,5	60	
Elongacija prajmera	72	60	
Finalna elongacija	72	600	

Uspešnost i specifičnost PCR reakcije proveravana je gel elektroforezom na agaroznom gelu PCR proizvod je nakon analize prečišćen po postupku opisanom u delu 7.1.4.

7.8.4 Kloniranje gena za aktinidin u pCTCON2 vektor

pCTCON vektor je dobijen ljubaznošću profesora Dane Wittrupa (Massachusetts Institute of Technology, Masačusec, SAD). PCR proizvod i vektor pCTCON2 sečeni su upotrebom restrikcionih endonukleaza Nhe I (*New England Biolabs*) i Sal I (*New England Biolabs*) i 10 x NEB 4 pufera (*New England Biolabs*) prema uputstvima proizvođača.

Sastav restrikcione smeše:

komponenta	Zapremina	
	PCR proizvod	Vektor pCTCON2
Nhe I enzim	1 μL	1 μL
Sal I enzim	1 μL	1 μL
10 x NEB4 pufer	3 μL	3 μL
100 x BSA	0,3 μL	0,3 μL
DNK	24,7 μL	13 μL
Dejonizovana voda do	30 μL	30 μL

U dejonizovanu vodu dodat je 10 x NEB4 pufer, 100x BSA, DNK i na kraju restrikcioni enzimi. Restrikcija je rađena 1 h na 37°C, a restrikciona smeša je nakon toga zagrevana 20 minuta na 65°C da bi se prekinula reakcija digestije. Nakon restrikcije PCR proizvod i vektor su prečišćeni po postupku opisanom u delu 7.1.4.

Za ligaciju PCR proizvoda u pCTCON2 vektor korišćen je enzim T4 DNK ligaza i 10 x Ligacioni pufer (*Fermentas*) prema preporuci proizvođača. Ligacija je rađena tako da odnos koncentracija PCR proizvoda prema vektoru bio 5:1.

Sastav ligacione smeše:

Komponenta	Zapremina
10 × Ligacioni pufer	1 µL
PCR proizvod	5 µL
Plazmid	2.5 µL
T4 DNK ligaza	0.5 µL
Dejonizovana voda	1 µL

U dejonizovanu vodu dodat je 10 x Ligacioni pufer, DNK i na kraju T4 DNK ligaza. Ligacija je rađena preko noći na 16°C, a ligaciona smeša je nakon toga korišćena za dalji rad.

7.8.5 Transformacija DH5α ćelija ligacionim proizvodom

Nakon ligacije, ligaciona smeša je upotrebljena za transformaciju DH5α ćelija kako je opisano u delu 7.1.7. Ćelije su transformisane na LA čvrstu podlogu sa ampicilinom (100 µg/mL). Nakon selekcije pozitivnih klonova konstrukti pCTCON2-aktinidin su izolovani koristeći GenJET™ komplet za izolovanje plazmida (*Fermentas*) prema uputstvima proizvođača, a prema postupku opisanom u delu 7.1.8. Izolovani proizvod je poslat na sekvenciranje.

7.8.6 Sekvenciranje konstrukata pCTCON2-aktinidin

DNK sekvenciranje je rađeno na Fraunhofer institutu za molekularnu biologiju i primenjenu ekologiju korišćenjem kompleta Thermo Sequence dye terminator cycle (*Thermo Fisher Scientific*) i dobijeni proizvodi su analizirani na automatizovanom sekvencatoru ABI PRISM® 3730 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*). Analiza dobijenih sekvenci rađena je uz pomoć Vector NTI® programa (*Invitrogen*).

7.8.7 Diverzifikacija gena za aktinidin

Diverzifikacija gena za aktinidin postignuta je lančanom reakcijom polimeraze sklone greškama epPCR (*engl. error-prone PCR*) korišćenjem analoga baza 2'-deoksi-P-nukleozid-5'-trifosfata (dPTP, *Jena Bioscience*) i 8-okso-2'-deoksiguanozine-5'-trifosfata (8-Oxo-dGTP, *Jena Bioscience*) prema uputstvu proizvođača [120].

Za lančanu reakciju polimeraze korišćeni su Dream Taq polimeraza i 10 x pufer za Taq polimerazu (*Fermentas*), miks dezoksiribonukleotida-dNTPs (*Fermentas*), 10 µM

prajmeri (Operon) i 10 mM dPTP i 8-Oxo-dGTP prema uputstvima proizvođača. Kao templatna DNK korišćen je konstrukt aktinidina u pCTCON2 vektoru koji je dobijen na način opisan u poglavlju 7.8.4.

Sastav smeše za PCR:

10 x pufer za Taq polimerazu	2,5 µL
10 mM dNTPs	0,5 µL
10 µM uzvodni prajmer	0,5 µL
10 µM nizvodni prajmer	0,5 µL
Dream Taq polimeraza	0,15 µL
10 mM dPTP	0,5 µL
10 mM 8-Oxo-dGTP	0,5 µL
Templatna DNK	0,5 µL
Dejonizovana voda	do 25 µL

U dejonizovanu vodu dodat je 10 x pufer za Taq polimerazu, dezoksiribonukeotidi (dNTPs), prajmeri, templatna DNK, dPTP, 8-Oxo-dGTP i Taq polimeraza. Sekvence korišćenih prajmera su:

Uzvodni prajmer: 5' - ATG *GCT AGC* TTG CCG AGT TAT GTT GAT TGG AGG - 3'

Nizvodni prajmer: 5' - ATG *GTC GAC* TCC AGC GCG GTA CCT CTG TCC - 3'

Mesta za sečenje restrikcionim endonukleazama su označena kurzivom.

PCR reakcija je rađena po sledećem temperaturnom profilu:

Korak	Temperatura (°C)	Vreme (sec)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	95	180	
Hibridizacija prajmera	95	60	30
Elongacija prajmera	64,5	60	
Produžavanje	72	60	
Finalna elongacija	72	600	

Uspešnost i specifičnost PCR reakcija proveravana je gel elektroforezom na agaroznom gelu.

PCR proizvod je nakon analize izolovan iz gela. Agarozni gel je izmeren i rastvoren u 2 zapremine pufera PBI i rekaciona smeša je potom zagrevana na 50°C dok se agarozna nije rastopila. Nakon rastapanja agaroze postupak je dalje nastavljen kako je opisano u delu 7.1.4. Da bi se povećala količina DNK dobijena diverzifikacijom gena za aktinidin ponovljena je PCR reakcija prema protokolu opisanom u delu 7.8.3. Kao templat za ovu PCR reakciju korišćene su biblioteke dobijene deverzifikacijom gena za aktinidin epPCR-om.

7.8.8 Kloniranje biblioteka diverzifikovanog gena za aktinidin u pCTCON2 vektor

Kloniranje biblioteka diverzifikovanog gena za aktinidin u pCTCON2 vektor rađeno je po postupku opisanom u delu 7.8.4.

7.8.9 Transformacija ćelija kvasca (EBY 100) ligacionim proizvodom

Za pripremu kompetentnih EBY 100 ćelija (*Saccharomyces cerevisiae*) bilo je potrebno inokulisati 25 mL 2xYPD tečne podloge EBY 100 ćelijama i gajiti ih preko noći na 30°C uz mešanje. Nakon toga, prekonoćnom kulturom inokulisano je 500 mL 2xYPD medijuma i ćelije su gajene na 30°C uz mešanje dok nisu postigle gustina od 2×10^7 ćelija tj. OD600 od 1-2 (1×10^6 ćelija daje OD600 od 0,1). Nakon toga, kultura je sterilno prebačena u tube od 50 mL i ćelije su centrifugiranjem (5 min, 3 000 x g) odvojene od medijuma u kome su rasle. Supernatant je odbačen, a ćelije su isprane sa 250 mL sterilne dejonizovane vode, a potom su resuspendovane u 5 mL sterilne dejonizovane vode i ponovo centrifugirane (5 min, 3 000 x g) a supernatant je odbačen. Ćelije su resuspendovane u 5 mL sterilnog rastvora 5 % glicerola, 10 % DMSO u vodi alikvotirane po 50 µL ćelija u tube od 1,5 mL i polako zaleđene. Ćelije su do upotrebe čuvane na -80°C.

Kompetentne EBY 100 ćelije transformisane su plazmidom ili proizvodom nastalim u reakciji ligacije. Kompetentne ćelije su izvađene na led i pažljivo odleđene u vodenom kupatilu na 37°C. Ćelije su potom centrifugirane (2 minuta, 13 000 x g), a supernatant je odbačen. U ćelije su dodati sledeći sterilni rastvori

50 % PEG 3500	260 μ L
1,0 M Litijum acetat	36 μ L
Kuvana ss-DNK 2 mg/mL	50 μ L
Plazmidna DNK (0,1-1 mg)	14 μ L
Ukupna zapremina	360 μ L

Celokupna smeša je intenzivno izmešana na vorteksu. Čelije su inkubirane 1-3 h na 42°C uz povremeno mešanje na vorteksu (svakih 15 minuta). Potom su čelije prelivene sa 1000 μ L YNB-CAA tečne podloge sa glukozom. 100 μ L suspenzije čelija je sterilno zasejano na YNB-CAA tečne podloge sa glukozom i čelije su ostavljene da rastu 2 dana (48 h) na 30°C. Ostatak čelija je dodat u 2 mL YNB-CAA tečne podloge sa glukozom i gajene su 2 dana) na 30°C.

Efikasnost transformacije je računata po formuli:

$$\text{Efikasnost transformacije} = \frac{\text{broj kolonija} \times \text{zapremina suspenzije}}{\text{zasejana zapremina} \times \text{količina DNK } (\mu\text{g})}$$

7.8.10 Ekspresija rekombinantnog aktinidina i njegovih mutantata

Plazmid pCTCON2 omogućava ekspresiju ukloniranog proteina na površini čelija kvasca. Jedna kolonija sa čvrste podloge ili cela biblioteka su zasejani u YNB-CAA tečnu podlogu sa glukozom i gajeni 48 h na 30°C uz konstantno mućkanje. Nakon 48 h, 300 μ L tečne kulture prebačeno je u 3 mL YNB-CAA podloge sa galaktozom i gajeno 12-16 h na 30°C uz konstantno mućkanje. Nakon ekspresije čelije su odvajane od podloge centrifugiranjem (13 000 x g, 2 minuta) i ispirane PBS-om, a nakon toga su dalje analizirane. U slučaju analize proteina rAktinidin ili mutanti aktinidina su skidani sa površine čelija inkubiranjem u 1 mM rastvoru DTT-a u odgovarajućem puferu (PBS, CB) 1h na ST.

7.8.11 Analiza i razdvajanje biblioteka mutanata aktinidina upotrebom protočne citometrije

Radi dobijanja mutanta aktinidina sa smanjenim IgE vezivanjem biblioteke mutanata aktinidina su razdvajane korišćenjem protočne citometrije. Pre razdvajanja čelije su gajene i indukovane kako je opisano u delu 7.8.10. Nakon ekspresije i ispiranja, 10⁶ čelija je inkubirano sa 200 μ L seruma pacijenata alergičnih na kivi iz kojih je uklonjen

IgG i kojima je komplement termalno inaktiviran. Čelije su inkubirane sa serumima 2 h na st. nakon toga ćelije su isprane PBS-om, a potom inkubirane u 200 μ L rastvora monoklonskog anti-IgE antitela PE obeleženog (1:10; *Mytlenyi Biotec*) i zecijeg poliklonskog anti-aktinidin aniseruma (1:50) u 0,05 % BSA u PBS-u 1h na st. U poslednjem koraku bojenja ćelije su inkubirane u rastvoru kozijeg poliklonskog antizečijeg IgG antiseruma obeleženog bojom DyLight™ 680, ispirane PBS-om i analizirane i razdvajane na protočnom citometru.

7.8.12 Imunohemijska analiza aktinididna i biblioteka mutanata aktinidina

7.8.12.1 Dot blot analiza

Nanošenje aktinidina na membranu i postupak razvijanja opisani su u delu 7.4.1. Kao uzorak korišćen je rastvor aktinidina dobijen nakon inkubacije ćelija, koje su gajene u YNB-CAA medijumu sa glukozom, u PBS-u koji sadrži 1 mM DTT. Svi uzorci aktinidina posle razdvajanja kapilarnog ili vakum transfera detektovani su zečijim poliklonskim anti-aktinidin antiserumom razblaženim 1:10 000 u 0,2 % BSA u tPBS, kozjim anti-zečijim IgG antitelom obeleženim alkalnom fosfatazom (*Sigma-Aldrich*) u razblaženju 1: 30 000 uz BCIP/NBT supstrate.

7.8.12.2 ELISA

Rastvori:

Fosfatom puferisani fiziološki rastvor pH 7,4, PBS: 10 mM fosfat, 150 mM NaCl

Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Dejonizovana voda do	1000 mL

Citratni pufer pH 4,0: 100 mM citrat

Na ₂ HC ₆ H ₅ O ₇	2,36 g
Dejonizovana voda do	100 mL

Štok rastvor ABTSa

ABTS	4 mg
Dejonizovana voda do	1 mL

Supstrat za peroksidazu

ABTS štok rastvor	1 mL
30 % H ₂ O ₂ u dejonizovanoj vodi	10 µL
0,1 M citrat pH 4	11 mL

Postupak kuplovanja aktinidina za pločicu i razvijanja opisan je u delu 7.4.2. Kao uzorak za kuplovanje korišćen je rastvor aktinidina dobijen nakon inkubacije ćelija u puferu za kuplovanje (CB – *engl.* coating buffer) koji sadrži 1 mM DTT. Za postavljanje saturacione krive vezivanja zečijeg poliklonskog antiseruma na aktinidin korišćena je serija razblaženja od 1:10 do 1:1 000 000 u 0.2 % BSA u tPBS. Svi uzorci su detektovani su zečijim poliklonskim anti-aktinidin antiserumom razblaženim 1:5 000 u 0.2 % BSA u tPBS, kozjim anti-zečijim IgG antitelom obeleženim peroksidazom (*Jackson Immunoresearch*) u razblaženju 1:5 000 uz ABTS/H₂O₂ kao supstrate.

Za detekciju IgE vezivanja uzorci su inkubirani sa pulom seruma pacijenata alergičnih na kivi razblaženih 3 x u 0,2 % BSA u tPBS na 4°C preko noći. Vezivanje IgE-a za aktinidin detektovano je anti-IgE antitelom PE obeleženim razblaženim 1:100 (*Mytlenyi Biotec*) u 0,1 % BSA tPBS, a potom kozijim poliklonskim antimišijim IgG antiserumom obeleženim peroksidazom (1:5 000, *Jackson Immunoresearch*) u 0,2 % BSA PBS-u uz ABTS/H₂O₂ kao supstrate.

7.8.12.3 Test aktivacije bazofila

Test aktivacije bazofila rađen je po protokolu opisanom u delu 7.6.2. Za aktivaciju bazofila korišćeni su prirodni aktinidin, rekombinantni aktinidin i mutant 17 u opsegu koncentracija od 10 – 0,0001 µg/mL. Prirodni aktinidin, izolovan iz ploda kivija po prethodno opisanom protokolu [161], dobijen je ljubaznošću Milice Grozdanović, diplomiranog biohemičara (Katedra za biohemiju, Hemijski fakultet, Beograd, Srbija) . Rekombinantni aktinidin i mutant 17 dobijeni su po protokolu opisanom u delu 7.8.10.

7.8.13 Izolovanje plazmida iz ćelija kvasca

Izolovanje plazmida iz ćelija kvasca rađeno je po modifikovanom protokolu opisanom u delu 7.1.8. Ćelije kvasca su gajene u tečnoj YNB-CAA podlozi sa glukozom 2 dana na 30°C. Nakon toga 1 mL ćelijske kulture je centrifugiran, podloga je odbačena, a ćelije su resuspendovane u 1 mL TRIS pufera pH 8,0 koji sadrži 25 mM 2-merkaptotetanolu i

5 U/mL enzima litikaze, i inkubirane 2h na 37°C. Nakon toga nastavljeno je sa protokolom opisanom u delu 7.1.8. Prinos plazmida koji se dobija izolovanjem direktno iz ćelija kvasca je mali pa je radi umnožavanja, izolovani plazmid korišćen za transformaciju DH5α ćelija i dalje tretiran kako je opisano u delovima 7.1.7. i 7.1.8.

7.9 Serumi

7.9.1 Dobijanje zečjih antiseruma

Antiserum na CPI dobijen je imunizacijom dva zeca koji su gajeni u vivarijumu Instituta za imunologiju, vakcine i serume – Torlak, Beograd, a prema Harboe & Ingild proceduri [162]. Emulzija kojom su imunizovani zečevi prilikom prve imunizacije je pripremljena dodatkom jednake količine Freund-ovog adjuvansa rastvoru antigena, dok je za svaku sledeću imunizaciju korišćen nekompletni Freund-ov adjuvans. Zečevi su imunizovani subkutano u predelu leđnog regiona sa po 0,1 mL emulzije na pet mesta. Imunizacija je izvršena 0., 14., 28. i 42. dana, a posle na svakih 28 dana (ukupno 8 imunizacija). 51-og dana i svake druge nedelje od tada zečevi su krvareni iz ušne vene. Iz dobijene zečje krvi odvajan je serum koji je dalje korišćen.

Antiserum na aktinidin je dobijen na isti način.

7.9.2 Humani serumi

Serumi pacijenata alergičnih na *Actinidia deliciosa* dobijeni su ljubaznošću dr. Olge Vučković (Institut za imunologiju, vakcine i serume – Torlak, Beograd, Srbija), dr. Mine Milovanović (Kliničko-bolnički centar Zvezdara, Beograd, Srbija), dr. Marine Atanasković-Marković (Univerzitet Beograd, Beograd, Srbija), dr. Karin Hoffman-Sommergruber (Medicinski univerzitet Beč, Austrija). Za imunohemijske eseje (ELISA, imunoblot) korišćeni su pulovi seruma od najmanje pet pacijenata. Za funkcionalne *in vitro* testove korišćeni su puna krv ili serumi pojedinačnih pacijenata. Za protočnu citometriju mutanata aktinidina korišćeni su serumi iz kojih je uklonjen IgG, propuštanjem kroz Protein A- Sepharose (*GE HealthCare*) prema uputstvima proizvođača [163]. Nakon uklanjanja IgG-a serumi su zagrevani na 56°C 10 minuta da bi se inaktivirao komplement

8 Literatura

1. Roitt I, Brostoff J & Male DK (2006) *Immunology*. 6 edn. C.V. Mosby.
2. Helm RM & Burks AW (2000) Mechanisms of food allergy. *Curr Opin Immunol* **12**, 647-653
3. Fine AJ (1981) Hypersensitivity reaction to kiwi fruit (Chinese gooseberry, *Actinidia chinensis*). *J Allergy Clin Immunol* **68**, 235-237
4. Bublin M, Mari A, Ebner C, Knulst A, Scheiner O, Hoffmann-Sommergruber K, Breiteneder H & Radauer C (2004) IgE sensitization profiles toward green and gold kiwifruits differ among patients allergic to kiwifruit from 3 European countries. *J Allergy Clin Immunol* **114**, 1169-1175
5. Lucas JS, Lewis SA & Hourihane JO (2003) Kiwi fruit allergy: a review. *Pediatr Allergy Immunol* **14**, 420-428
6. Pastorello EA, Conti A, Pravettoni V, Farioli L, Rivolta F, Ansaloni R, Ispano M, Incorvaia C, Giuffrida MG & Ortolani C (1998) Identification of actinidin as the major allergen of kiwi fruit. *J Allergy Clin Immunol* **101**, 531-537
7. Gavrovic-Jankulovic M, cIrkovic T, Vuckovic O, Atanaskovic-Markovic M, Petersen A, Gojgic G, Burazer L & Jankov RM (2002) Isolation and biochemical characterization of a thaumatin-like kiwi allergen. *J Allergy Clin Immunol* **110**, 805-810
8. Rassam M & Laing WA (2004) Purification and characterization of phytocystatins from kiwifruit cortex and seeds. *Phytochemistry* **65**, 19-30
9. Larsen J & Dreborg S (2008) Standardization of Allergen Extracts Allergy Methods and Protocols. In (Jones M & Lympny P, eds), pp. 133-145. Humana Press.
10. Løwenstein H & Larsen J (2001) Recombinant allergens/ allergen standardization. *Curr Allergy Asthm R* **1**, 474-479
11. Gavrovic-Jankulovic M, Polovic N, Prusic S, Jankov R, Atanaskovic-Markovic M, Vuckovic O & Velickovic TC (2005) Allergenic potency of kiwi fruit during fruit development. *Food Agric Immunol* **16**, 117-128
12. Platts-Mills TAE, Hayden ML, Chapman MD & Wilkins SR (1987) Seasonal variation in dust mite and grass-pollen allergens in dust from the houses of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* **79**, 781-791
13. Sampson HA, Srivastava K, Li XM & Burks AW (2003) New perspectives for the treatment of food allergy (peanut). *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M*, 236-244; discussion 244-236
14. Holm J, Gajhede M, Ferreras M, Henriksen A, Ipsen H, Larsen JN, Lund L, Jacobi H, Millner A, Würtzen PA, et al. (2004) Allergy Vaccine Engineering: Epitope Modulation of Recombinant Bet v 1 Reduces IgE Binding but Retains Protein Folding Pattern for Induction of Protective Blocking-Antibody Responses. *J Immunol* **173**, 5258-5267
15. Valenta, Lidholm, Niederberger, Hayek, Kraft & GrÖNlund (1999) The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy* **29**, 896-904
16. Kay AB (2000) Overview of 'allergy and allergic diseases: with a view to the future'. *Br Med Bull* **56**, 843-864
17. Grammatikos AP (2008) The genetic and environmental basis of atopic diseases. *Ann Med* **40**, 482-495
18. Jenneway CA, Travers P, Walport M & Shlomchik MJ (2001) *Immunobiology, 5th edition*. Garland Science, New York.
19. Galli SJ (2000) Allergy. *Curr Biol* **10**, R93-95
20. De Swert LF (1999) Risk factors for allergy. *Eur J Pediatr* **158**, 89-94
21. Lonjou C, Barnes K, Chen H, Cookson WO, Deichmann KA, Hall IP, Holloway JW, Laitinen T, Palmer LJ, Wjst M, et al. (2000) A first trial of retrospective collaboration for positional cloning in complex inheritance: assay of the cytokine region on chromosome 5 by the consortium on asthma genetics (COAG). *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10942-10947
22. Barnes KC, Grant AV, Hansel NN, Gao P & Dunston GM (2007) African Americans with asthma: genetic insights. *Proc Am Thorac Soc* **4**, 58-68
23. Croner S (1992) Prediction and detection of allergy development: influence of genetic and environmental factors. *J Pediatr* **121**, S58-63
24. Cooper PJ (2004) Intestinal worms and human allergy. *Parasite Immunol* **26**, 455-467
25. Braun-Fahrlander C, Gassner M, Grize L, Neu U, Sennhauser FH, Varonier HS, Vuille JC & Wuthrich B (1999) Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and

- their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. *Clin Exp Allergy* **29**, 28-34
26. von Mutius E (2002) Environmental factors influencing the development and progression of pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol* **109**, S525-532
 27. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, et al. (2002) Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* **347**, 869-877
 28. Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA & Bottomly K (2002) Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med* **196**, 1645-1651
 29. Carvalho EM, Bastos LS & Araujo MI (2006) Worms and allergy. *Parasite Immunol* **28**, 525-534
 30. Yazdanbakhsh M, Kremsner PG & van Ree R (2002) Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* **296**, 490-494
 31. Valenta R (2002) The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nat Rev Immunol* **2**, 446-453
 32. Niederberger V, Niggemann B, Kraft D, Spitzauer S & Valenta R (2002) Evolution of IgM, IgE and IgG(1-4) antibody responses in early childhood monitored with recombinant allergen components: implications for class switch mechanisms. *Eur J Immunol* **32**, 576-584
 33. Larche M, Akdis CA & Valenta R (2006) Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **6**, 761-771
 34. Hellman L (2007) Regulation of IgE homeostasis, and the identification of potential targets for therapeutic intervention. *Biomed Pharmacother* **61**, 34-49
 35. Sampson HA (1999) Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* **103**, 717-728
 36. Atkins FM (1986) Food allergy and behavior: definitions, mechanisms and a review of the evidence. *Nutr Rev* **44 Suppl**, 104-112
 37. Astwood JD, Leach JN & Fuchs RL (1996) Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat Biotechnol* **14**, 1269-1273
 38. Host A & Halken S (1990) A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first 3 years of life. Clinical course in relation to clinical and immunological type of hypersensitivity reaction. *Allergy* **45**, 587-596
 39. Amlot PL, Kemeny DM, Zachary C, Parkes P & Lessof MH (1987) Oral allergy syndrome (OAS): symptoms of IgE-mediated hypersensitivity to foods. *Clin Allergy* **17**, 33-42
 40. Vieths S, Jankiewicz A, Wuthrich B & Baltes W (1995) Immunoblot study of IgE binding allergens in celery roots. *Ann Allergy Asthma Immunol* **75**, 48-55
 41. Van Loon LC & Van Strien EA (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Molec Plant Pathol* **55**, 85-97
 42. Hoffmann-Sommergruber K (2002) Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. *Biochem Soc Trans* **30**, 930-935
 43. Vieths S, Scheurer S & Ballmer-Weber B (2002) Current Understanding of Cross-Reactivity of Food Allergens and Pollen. *Ann N Y Acad Sci* **964**, 47-68
 44. Yagami T (2002) Allergies to cross-reactive plant proteins. Latex-fruit syndrome is comparable with pollen-food allergy syndrome. *Int Arch Allergy Immunol* **128**, 271-279
 45. Mempel M, Rakoski J, Ring J & Ollert M (2003) Severe anaphylaxis to kiwi fruit: Immunologic changes related to successful sublingual allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* **111**, 1406-1409
 46. Mancuso G & Berdondini RM (2001) Oral allergy syndrome from kiwi fruit after a lover's kiss. *Contact Dermatitis* **45**, 41
 47. Palacin A, Rodriguez J, Blanco C, Lopez-Torrejon G, Sanchez-Monge R, Varela J, Jimenez MA, Cumplido J, Carrillo T, Crespo JF, et al. (2008) Immunoglobulin E recognition patterns to purified Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) allergens in patients sensitized to Kiwi with different clinical symptoms. *Clin Exp Allergy* **38**, 1220-1228
 48. Tamburrini M, Cerasuolo I, Carratore V, Stanziola A, Zofra S, Romano L, Camardella L & Ciardiello MA (2005) Kiwellin, a Novel Protein from Kiwi Fruit. Purification, Biochemical Characterization and Identification as an Allergen*. *Protein J* **24**, 423-429
 49. Ebo DG (2009) Basophil activation tests in food allergy. *Clin Exp Allergy* **39**, 1115-1116

50. Paul W, Amiss J, Try R, Praekelt U, Scott R & Smith H (1995) Correct processing of the kiwifruit protease actinidin in transgenic tobacco requires the presence of the C-terminal propeptide. *Plant Physiol* **108**, 261-268
51. SHEWRY PR (2003) Tuber Storage Proteins. *Ann Bot* **91**, 755-769
52. Nieuwenhuizen NJ, Maddumage R, Tsang GK, Fraser LG, Cooney JM, De Silva HN, Green S, Richardson KA & Atkinson RG (2012) Mapping, Complementation, and Targets of the Cysteine Protease Actinidin in Kiwifruit. *Plant Physiol* **158**, 376-388
53. Varughese KI, Su Y, Cromwell D, Hasnain S & Xuong NH (1992) Crystal structure of an actinidin-E-64 complex. *Biochemistry* **31**, 5172-5176
54. Nieuwenhuizen NJ, Beuning LL, Sutherland PW, Sharma NN, Cooney JM, Bielecki LRF, Schroder R, MacRae EA & Atkinson RG (2007) Identification and characterisation of acidic and novel basic forms of actinidin, the highly abundant cysteine protease from kiwifruit. *Funct Plant Biol* **34**, 946-961
55. Ciardiello MA, Giangrieco I, Tuppo L, Tamburrini M, Buccheri M, Palazzo P, Bernardi ML, Ferrara R & Mari A (2009) Influence of the Natural Ripening Stage, Cold Storage, and Ethylene Treatment on the Protein and IgE-Binding Profiles of Green and Gold Kiwi Fruit Extracts. *J Agric Food Chem* **57**, 1565-1571
56. Bublin M, Pfister M, Radauer C, Oberhuber C, Bulley S, Dewitt AM, Lidholm J, Reese G, Vieths S, Breiteneder H, et al. (2010) Component-resolved diagnosis of kiwifruit allergy with purified natural and recombinant kiwifruit allergens. *J Allergy Clin Immunol* **125**, 687-694, 694 e681
57. Chruszcz M, Maleki SJ, Majorek KA, Demas M, Bublin M, Solberg R, Hurlburt BK, Ruan S, Mattison CP, Breiteneder H, et al. (2011) Structural and immunologic characterization of Ara h 1, a major peanut allergen. *J Biol Chem* **286**, 39318-39327
58. Keen NT (1999) Plants and microorganisms-listening in on the conversation. *Nat Biotechnol* **17**, 958-959
59. Jayaraj J, Anand, A. and Muthukrishnan, S (2004) *Pathogenesisrelated proteins and their roles in resistance to fungal pathogens. In: Fungal Disease Resistance in Plants. Biochemistry, Molecular Biology, and Genetic Engineering.* Haworth Press, New York.
60. Ferreira RB, Monteiro S, Freitas R, Santos CN, Chen Z, Batista LM, Duarte J, Borges A & Teixeira AR (2006) Fungal Pathogens: The Battle for Plant Infection. *Crit Rev Plant Sci* **25**, 505-524
61. Heath MC (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol* **3**, 315-319
62. Van Loon LC (1997) Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *E J Plant Pathol* **103**, 753-765
63. Yang Y, Shah J & Klessig DF (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev* **11**, 1621-1639
64. van Loon L, Pierpoint W, Boller T & Conejero V (1994) Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molec Biology Rep* **12**, 245-264
65. van Loon L (1999) *Occurrence and properties of plant pathogenesis-related protein in Datta SK, Muthukrishnan S, eds. Pathogenesis-related Proteins in Plants* CRC Press, Boca Raton, FL.
66. Antoniow JF, Dunkley AM, White RF & Wood J (1980) Soluble leaf proteins of virus-infected tobacco (*Nicotiana tabacum*) cultivars [proceedings]. *Biochem Soc Trans* **8**, 70-71
67. Jayaraj J, Anand, A. and Muthukrishnan, S ((2004)) *Pathogenesisrelated proteins and their roles in resistance to fungal pathogens. In: Fungal Disease Resistance in Plants. Biochemistry, Molecular Biology, and Genetic Engineering.* Haworth Press, New York.
68. Blilou I, Ocampo JA & Garcia-Garrido JM (2000) Induction of Ltp (lipid transfer protein) and Pal (phenylalanine ammonia-lyase) gene expression in rice roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *J Exp Bot* **51**, 1969-1977
69. Desaki Y, Miya A, Venkatesh B, Tsuyumu S, Yamane H, Kaku H, Minami E & Shibuya N (2006) Bacterial Lipopolysaccharides Induce Defense Responses Associated with Programmed Cell Death in Rice Cells. *Plant Cell Physiol* **47**, 1530-1540
70. Zehnder GW, Murphy JF, Sikora EJ & Kloepper JW (2001) Application of Rhizobacteria for Induced Resistance. *E J Plant Pathol* **107**, 39-50
71. van Loon LC (1975) Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN': IV. Similarity of qualitative changes of

- specific proteins after infection with different viruses and their relationship to acquired resistance. *Virology* **67**, 566-575
72. Bol JF, Linthorst HJM & Cornelissen BJC (1990) Plant Pathogenesis-Related Proteins Induced by Virus Infection. *Annu Rev Phytopathol* **28**, 113-138
73. van Loon LC, Rep M & Pieterse CMJ (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu Rev Phytopathol* **44**, 135-162
74. van Loon LC (1990) The nomenclature of pathogenesis-related proteins. *Physiol Molec Plant Pathol* **37**, 229-230
75. Ferreira RB, Monteiro S, Freitas R, Santos CN, Chen Z, Batista LM, Duarte J, Borges A & Teixeira AR (2007) The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Molec Plant Pathol* **8**, 677-700
76. Kombrink E & Somssich IE (1997) *Pathogenesis-related proteins and plant defense*. In: *The Mycota (Plant Relationships)* Springer-Verlag, Berlin.
77. Derckel J-P, Legendre L, Audran J-C, Haye B & Lambert B (1996) Chitinases of the grapevine (*Vitis vinifera* L.): five isoforms induced in leaves by salicylic acid are constitutively expressed in other tissues. *Plant Sci* **119**, 31-37
78. Xie Z-P, Staehelin C, Wiemken A, Broughton WJ, Müller J & Boller T (1999) Symbiosis-stimulated chitinase isoenzymes of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *J ExpBotany* **50**, 327-333
79. Yu X-M, Griffith M & Wiseman SB (2001) Ethylene Induces Antifreeze Activity in Winter Rye Leaves. *Plant Physiol* **126**, 1232-1240
80. Boller T, Gehri A, Mauch F & Vögeli U (1983) Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta* **157**, 22-31
81. Hamel F & Bellemare G (1995) Characterization of a class I chitinase gene and of wound-inducible, root and flower-specific chitinase expression in *Brassica napus*. *Biochim Biophys Acta* **1263**, 212-220
82. Samac DA, Hironaka CM, Yallaly PE & Shah DM (1990) Isolation and Characterization of the Genes Encoding Basic and Acidic Chitinase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **93**, 907-914
83. Selitrennikoff CP (2001) Antifungal Proteins. *App Environ Microb* **67**, 2883-2894
84. Thomma B, Cammue B & Thevissen K (2002) Plant defensins. *Planta* **216**, 193-202
85. Ye XY, Ng TB & Rao PF (2001) A Bowman-Birk-Type Trypsin-Chymotrypsin Inhibitor from Broad Beans. *Biochem Biophys Res Comm* **289**, 91-96
86. Ng TB, Lam SK & Fong WP (2003) A Homodimeric Sporamin-Type Trypsin Inhibitor with Antiproliferative, HIV Reverse Transcriptase-Inhibitory and Antifungal Activities from Wampee (*Clausena lansium*) Seeds. *Biol Chem* **384**, 289-293
87. Anastasi A, Brown MA, Kembhavi AA, Nicklin MJ, Sayers CA, Sunter DC & Barrett AJ (1983) Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases. Improved purification from egg white, characterization, and detection in chicken serum. *Biochem J* **211**, 129-138
88. Margis R, Reis EM & Villeret V (1998) Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. *Arch Biochem Biophys* **359**, 24-30
89. Martinez B, Crews E, Dowd A & M MM (2003) Comparative testing for weak expression of D antigen: manual tube testing vs. a semiautomated IgG gel system. *Immunohematology* **19**, 7-9
90. Wesierska E, Saleh Y, Trziszka T, Kopec W, Siewinski M & Korzekwa K (2005) Antimicrobial activity of chicken egg white cystatin *World J Microbiol Biotechnol* **21**, , 59-64
91. Abe M, Abe K, Kuroda M & Arai S (1992) Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin. Molecular cloning and expression studies. *Eur J Biochem* **209**, 933-937
92. Martinez M, Abraham Z, Gambardella M, Echaide M, Carbonero P & Diaz I (2005) The strawberry gene *Cyf1* encodes a phytocystatin with antifungal properties. *J Exp Bot* **56**, 1821-1829
93. Pernas M, Lopez-Solanilla E, Sanchez-Monge R, Salcedo G & Rodriguez-Palenzuela P (1999) Antifungal activity of a plant cystatin. *Mol Plant-Microbe Interact* **12**, 624-627
94. Urwin PE, Lilley CJ, McPherson MJ & Atkinson HJ (1997) Characterization of two cDNAs encoding cysteine proteinases from the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. *Parasitology* **114**, 605-613
95. Leplé JC, Bonadé-Bottino M, Augustin S, Pilate G, Lê Tân VD, Delplanque A, Cornu D & Jouanin L (1995) Toxicity to *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor. *Mol Breed* **1**, 319-328

96. Zhao Y, Botella MA, Subramanian L, Niu X, Nielsen SS, Bressan RA & Hasegawa PM (1996) Two wound-inducible soybean cysteine proteinase inhibitors have greater insect digestive proteinase inhibitory activities than a constitutive homolog. *Plant Physiol* **111**, 1299-1306
97. Jordá L, Conejero V & Vera P (2000) Characterization of P69E and P69F, Two Differentially Regulated Genes Encoding New Members of the Subtilisin-Like Proteinase Family from Tomato Plants. *Plant Physiol* **122**, 67-74
98. Tornero P, Conejero V & Vera P (1996) Primary structure and expression of a pathogen-induced protease (PR-P69) in tomato plants: Similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6332-6337
99. Crespo JF, Rodriguez J, James JM, Daroca P, Reano M & Vives R (2002) Reactivity to potential cross-reactive foods in fruit-allergic patients: implications for prescribing food avoidance. *Allergy* **57**, 946-949
100. Fah J, Wuthrich B & Vieths S (1995) Anaphylactic reaction to lychee fruit: evidence for sensitization to profilin. *Clin Exp Allergy* **25**, 1018-1023
101. Akdis M & Akdis CA (2007) Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* **119**, 780-791
102. Verhagen J, Blaser K, Akdis CA & Akdis M (2006) Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: T-regulatory cells and more. *Immunol Allergy Clin North Am* **26**, 207-231, vi
103. Flicker S & Valenta R (2003) Renaissance of the blocking antibody concept in type I allergy. *Int Arch Allergy Immunol* **132**, 13-24
104. van Neerven RJ, Wikborg T, Lund G, Jacobsen B, Brinch-Nielsen A, Arnved J & Ipsen H (1999) Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activation of CD4+ T cells by inhibiting serum-IgE-facilitated allergen presentation. *J Immunol* **163**, 2944-2952
105. Maasch HJ & Marsh DG (1987) Standardized extracts modified allergens--allergoids. *Clin Rev Allergy* **5**, 89-106
106. Larche M (2007) Peptide immunotherapy for allergic diseases. *Allergy* **62**, 325-331
107. Hiroi T & Takaiwa F (2006) Peptide immunotherapy for allergic diseases using a rice-based edible vaccine. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **6**, 455-460
108. Saxon A, Zhu D, Zhang K, Allen LC & Kepley CL (2004) Genetically engineered negative signaling molecules in the immunomodulation of allergic diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **4**, 563-568
109. Spiegelberg HL, Horner AA, Takabayashi K & Raz E (2002) Allergen-immunostimulatory oligodeoxynucleotide conjugate: a novel allergoid for immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **2**, 547-551
110. Allison LA (2007) *Fundamental Molecular Biology*. Blackwell Publishing New York.
111. Brajuskovic G (2012) *Molekularna biologija 2*. Savremena administracija, Beograd.
112. 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**, 976-990
113. Sander I, Fleischer C, Meurer U, Brüning T & Raulf-Heimsoth M (2009) Allergen content of grass pollen preparations for skin prick testing and sublingual immunotherapy. *Allergy* **64**, 1486-1492
114. Aalberse RC, Akkerdaas J & van Ree R (2001) Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. *Allergy* **56**, 478-490
115. Niederberger V, Stubner P, Spitzauer S, Kraft D, Valenta R, Ehrenberger K & Horak F (2001) Skin Test Results but not Serology Reflect Immediate Type Respiratory Sensitivity: A Study Performed with Recombinant Allergen Molecules. *J Invest Dermatol* **117**, 848-851
116. Otten LG & Quax WJ (2005) Directed evolution: selecting today's biocatalysts. *Biomol Eng* **22**, 1-9
117. Bornscheuer UT & Pohl M (2001) Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr Opin Chem Biol* **5**, 137-143
118. Jackel C, Kast P & Hilvert D (2008) Protein design by directed evolution. *Annu Rev Biophys* **37**, 153-173
119. (2005) *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, New York.
120. Zacco M, Williams DM, Brown DM & Gherardi E (1996) An approach to random mutagenesis of DNA using mixtures of triphosphate derivatives of nucleoside analogues. *J Mol Biol* **255**, 589-603

121. Martinez M, Diaz-Mendoza M, Carrillo L & Diaz I (2007) Carboxy terminal extended phycocystatins are bifunctional inhibitors of papain and legumain cysteine proteinases. *FEBS Lett* **581**, 2914-2918
122. Nissen MS, Kumar GNM, Youn B, Knowles DB, Lam KS, Ballinger WJ, Knowles NR & Kang C (2009) Characterization of *Solanum tuberosum* Multicystatin and Its Structural comparison with Other Cystatins. *Plant Cell* **21**, 861-875
123. Mo H, Winter HC, Van Damme EJ, Peumans WJ, Misaki A & Goldstein IJ (2001) Carbohydrate binding properties of banana (*Musa acuminata*) lectin I. Novel recognition of internal alpha1,3-linked glucosyl residues. *Eur J Biochem* **268**, 2609-2615
124. Palacin A, Rodriguez J, Blanco C, Lopez-Torrejon G, Sánchez-Monge R, Varela J, Jiménez MA, Cumplido J, Carrillo T, Crespo JF, et al. (2008) Immunoglobulin E recognition patterns to purified Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) allergens in patients sensitized to Kiwi with different clinical symptoms. *Clin Exp Allergy* **38**, 1220-1228
125. Lucas JS, Nieuwenhuizen NJ, Atkinson RG, Macrae EA, Cochrane SA, Warner JO & Hourihane JO (2007) Kiwifruit allergy: actinidin is not a major allergen in the United Kingdom. *Clin Exp Allergy* **37**, 1340-1348
126. Vieths S, Scheurer S, Reindl J, Lüttkopf D, Wangorsch A, Kästner M, Haase T & Haustein D (2001) Optimized allergen extracts and recombinant allergens in diagnostic applications. *Allergy* **56**, 78-82
127. Sancho AI, Foxall R, Browne T, Dey R, Zuidmeer L, Marzban G, Waldron KW, van Ree R, Hoffmann-Sommergruber K, Laimer M, et al. (2006) Effect of postharvest storage on the expression of the apple allergen Mal d 1. *J Agric Food Chem* **54**, 5917-5923
128. Reuter A, Lidholm J, Andersson K, Ostling J, Lundberg M, Scheurer S, Enrique E, Cistero-Bahima A, San Miguel-Moncin M, Ballmer-Weber BK, et al. (2006) A critical assessment of allergen component-based in vitro diagnosis in cherry allergy across Europe. *Clin Exp Allergy* **36**, 815-823
129. Asero R, Ballmer-Weber BK, Beyer K, Conti A, Dubakiene R, Fernandez-Rivas M, Hoffmann-Sommergruber K, Lidholm J, Mustakov T, Oude Elberink JN, et al. (2007) IgE-mediated food allergy diagnosis: Current status and new perspectives. *Mol Nutr Food Res* **51**, 135-147
130. Rogers BL, Pollock J, Klapper DG & Griffith IJ (1993) Sequence of the proteinase-inhibitor cystatin homologue from the pollen of *Ambrosia artemisiifolia* (short ragweed). *Gene* **133**, 219-221
131. Ichikawa K, Vailes LD, Pomes A & Chapman MD (2001) Molecular cloning, expression and modelling of cat allergen, cystatin (Fel d 3), a cysteine protease inhibitor. *Clin Exp Allergy* **31**, 1279-1286
132. Rodriguez-Mahillo AI, Gonzalez-Munoz M, Gomez-Aguado F, Rodriguez-Perez R, Corcuera MT, Caballero ML & Moneo I (2007) Cloning and characterisation of the *Anisakis simplex* allergen Ani s 4 as a cysteine-protease inhibitor. *Int J Parasitol* **37**, 907-917
133. Martinez M, Cambra I, Carrillo L, Diaz-Mendoza M & Diaz I (2009) Characterization of the Entire Cystatin Gene Family in Barley and Their Target Cathepsin L-Like Cysteine-Proteases, Partners in the Hordein Mobilization during Seed Germination. *Plant Physiol* **151**, 1531-1545
134. Martinez M & Diaz I (2008) The origin and evolution of plant cystatins and their target cysteine proteinases indicate a complex functional relationship. *BMC Evol Biol* **8**, 198
135. Boyes S, Strubi P & Marsh H (1997) Actinidin levels in fruit of *Actinidia* species and some *Actinidia arguta* rootstock scion combinations. *Food Sci Technol-LWB* **30**, 379-389
136. Prusky D, Alkan N, Miyara I, Barad S, Davidzon M, Kobiler I, Brown-Horowitz S, Lichter A, Sherman A & Fluhr R (2010) *Mechanisms Modulating Postharvest Pathogen Colonization of Decaying Fruits Postharvest Pathology*. Vol. 2 Springer Netherlands.
137. Wesierska E, Saleh Y, Trziszka T, Kopec W, Siewinski M & Korzekwa K (2005) Antimicrobial activity of chicken egg white cystatin. *World J Microbiol Biotechnol* **21**, 59-64
138. d'Enfert C (1997) Fungal Spore Germination: Insights from the Molecular Genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **21**, 163-172
139. Griffin DH (1994) *Spore dormancy and germination*. 2 edn. John Wiley & sons (ed.), New York.
140. Ball AM, Ashby AM, Daniels MJ, Ingram DS & Johnstone K (1991) Evidence for the requirement of extracellular protease in the pathogenic interaction of *Pyrenopeziza brassicae* with oilseed rape. *Physiol Molec Plant Pathol* **38**, 147-161

141. Machida S & Saito M (1993) Purification and characterization of membrane-bound chitin synthase. *J Biol Chem* **268**, 1702-1707
142. Martínez M, López-Solanilla E, Rodríguez-Palenzuela P, Carbonero P & Díaz I (2003) Inhibition of Plant-Pathogenic Fungi by the Barley Cystatin Hv-CPI (Gene Icy) Is Not Associated with Its Cysteine-Proteinase Inhibitory Properties. *Molec Plant-Microbe In* **16**, 876-883
143. Pernas M, Sanchez-Monge R, Gomez L & Salcedo G (1998) A chestnut seed cystatin differentially effective against cysteine proteinases from closely related pests. *Plant Mol Biol* **38**, 1235-1242
144. Popovic MM, Milovanovic M, Burazer L, Vuckovic O, Hoffmann-Sommergruber K, Knulst AC, Lindner B, Petersen A, Jankov R & Gavrovic-Jankulovic M (2010) Cysteine proteinase inhibitor Act d 4 is a functional allergen contributing to the clinical symptoms of kiwifruit allergy. *Mol Nutr Food Res* **54**, 373-380
145. Popovic M, Bulajic A, Krstic B, Ristic D, Jankov RM & Gavrovic-Jankulovic M (2012) In vitro and in vivo antifungal properties of cysteine proteinase inhibitor from green kiwifruit, *J Food Sci Agric* doi 10.1002/jsfa.5728
146. Harlow E & Lane D (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
147. Towbin H, Staehelin T & Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354
148. Bollag DM, Rozycki MD & Stuart JE (1996) *Protein Methods*. Wiley-Liss, New York.
149. Gavrovic-Jankulovic M, Poulsen K, Brckalo T, Bobic S, Lindner B & Petersen A (2008) A novel recombinantly produced banana lectin isoform is a valuable tool for glycoproteomics and a potent modulator of the proliferation response in CD3+, CD4+, and CD8+ populations of human PBMCs. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 929-941
150. Bradford MM (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
151. Shevchenko A (2001) Evaluation of the efficiency of in-gel digestion of proteins by peptide isotopic labeling and MALDI mass spectrometry. *Anal Biochem* **296**, 279-283
152. Mailing HJ (1993) 2. Methods of skin testing. *Allergy* **48**, 55-56
153. Liener IE & Friedensen B (1970) Ficin (E.C. 3.4.4.12.). *Methodes in enzymology* **19**, 261-273
154. Hennessey Jr JP & Johnson Jr WC (1982) Experimental errors and their effect on analyzing circular dichroism spectra of proteins. *Anal Biochem* **125**, 177-188
155. Whitmore L & Wallace BA (2008) Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers* **89**, 392-400
156. Andrade MA, Chacón P, Merelo JJ & Morán F (1993) Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng* **6**, 383-390
157. Merelo JJ, Andrade MA, Prieto A & Morán F (1994) Proteinotopic feature maps. *Neurocomputing* **6**, 443-454
158. Kelley LA & Sternberg MJE (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protocols* **4**, 363-371
159. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC & Ferrin TE (2004) UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605-1612
160. Dreidi R (2010) *Cloning of actinidin from green kiwifruit into pQE9 vector for protein expression*. Master of Science, Faculty of Chemistry, Belgrade.
161. Grozdanovic M, Popovic M, Polovic N, Burazer L, Vuckovic O, Atanaskovic-Markovic M, Lindner B, Petersen A & Gavrovic-Jankulovic M (2012) Evaluation of IgE reactivity of active and thermally inactivated actinidin, a biomarker of kiwifruit allergy. *Food Chem Toxicol* **50**, 1013-1018
162. Harboe N & Ingild A (1973) Immunization, isolation of immunoglobulins, estimation of antibody titre. *Scand J Immunol Suppl* **1**, 161-164
163. Grodzki A & Berenstein E (2010) Antibody Purification: Affinity Chromatography – Protein A and Protein G Sepharose Immunocytochemical Methods and Protocols. In *Immunocytochemical Methods and Protocols* (Oliver C & Jamur M, eds), pp. 33-41. Humana Press.

Prilog

Biografija autora

Milica Popović rođena je 25.03.1982. godine u Beogradu. Godine 2001. upisala je Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani biohemičar. Fakultet je završila 2007. Godine sa prosečnom ocenom 8,88 i ocenom deset na diplomskom radu. Doktorske studije na Katedri za biohemiju Hemijskog fakulteta upisala je 2007. godine.

Od 2008. godine je angažovana na Hemijskom fakultetu kao saradnik u nastavi na Katedri za biohemiju. Od 2009. godine izabrana je za asistenta na Katedri za biohemiju Hemijskog fakulteta. Član je Srpskog Hemijskog Društva, Biohemijskog društva Srbije, Evropske akademije za alergiju i kliničku imunologiju, Evropskog biotehnološkog društva.

Govori, čita i piše engleski i španski jezik.

Milica Popović je 2010. godine i ponovo 2012. boravila na tromesečnom usavršavanju na Faunhofer institutu u Ahenu, Nemačka. Godine 2010. i ponovo 2012. bila je dobitnik FEBS Kolaborativne eksperimentalne stipendije za centralnu i istočnu Evropu (FEBS Collaborative scholarship for Central and Eastern Europe). Godine 2011. dobila je nagrada Evropske akademije za alergiju i kliničku imunologiju za prezentaciju postera na XXX Kongresu EAACI u Istanbulu, Turska.

Milica Popović do sada ima objavljena 4 naučna rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21) i 3 u međunarodnim časopisima (M23). Autor je i brojnih saopštenja na međunarodnim skupovima štampanih kako u celini tako i u izvodu.

Milica Popović učestvuje u realizaciji projekta iz osnovnih istraživanja koji finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije Alergeni, antitela, enzimi i mali fiziološki značajni molekuli: dizajn, struktura, funkcija i značaj (OI 172049). Takođe, učestvuje u realizaciji međunarodnih projekata Jačanje Hemijskog fakulteta Univerzitea u Beogradu u cilju uspostavljanja Centra izvrsnosti za molekularnu biologiju i istraživanje hrane u regionu Zapadnog Balkana (FCUB-ERA 256716) i Multivalent Glycosystems for Nanoscience - MultiGlycoNano", COST Action CM1102.

