

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Jelena Z. Radosavljević

**ALERGENOST ENZIMSKI
PROCESOVANIH NUTRITIVNIH
ALERGENA**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Jelena Z. Radosavljević

**ALLERGENICITY OF ENZYMATICALLY
PROCESSED NUTRITIVE ALLERGENS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Članovi Komisije:

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

Datum odbrane:

Zahvalnica

Zahvaljujem se svim dragim ljudima koji su doprineli da postanem čovek i biohemičar kakav jesam.

Ovu tezu posvećujem svojoj majci.

Naziv: Alergeni potencijal nutritivnih alergena**Izvod**

U cilju poboljšanja funkcionalnih karakteristika hrane sve se češće upotrebljavaju enzimi. Prilikom modifikacije proteina hrane enzimima u cilju dobijanja poboljšanih svojstava neophodno je obratiti pažnju na moguće promene u alergenosti novonastalih modifikata.

U ovoj tezi ispitan je uticaj umrežavanja alergena kikirikija i mleka na njihovu alergenost. Pokazano je da se tretmanima proteina kikirikija oksidativnim enzimima ne pojačava *in vitro* IgE reaktivnost alergena, niti *ex vivo* aktivacija bazofila. Umrežavanje kazeina, kao glavnog alergena mleka, pokazalo je neznatno izmenjeno vezivanje IgE antitela, bez narušavanja funkcionalnog odgovora u smislu aktivacije bazofila.

Rezultati dobijeni u *in vitro* studijama, kada je reč o potencijalnoj primeni enzima u komercijalne svrhe, uzimaju se sa rezervom, s obzirom na složenost mehanizama alergijske senzitivacije i opasnosti koje uvođenje izmenjenih alergena može da prouzrokuje. Ispitivanja na životinjskim modelima alergija na hranu predstavljaju pouzdaniji pokazatelj efekata koje bi modifikovani alergeni mogli da prouzrokuju. U slučaju proteina kikirikija umreženih tirozinazama, u mišjem modelu alergije na kikiriki, nije došlo do pojačanja alergijske senzitivacije i proteini su sačuvali sposobnost indukcije oralne tolerancije. Umrežavanje proteina kikirikija lakazom smanjuje alergijsku senzitivaciju, izaziva jači tolerogeni odgovor i potencijalno bi mogao da se koristi i za imunoterapiju alergija na kikiriki.

Alergeni hrane često podležu proteolitičkom procesovanju, kako u organizmu-izvoru, tako i prilikom digestije u gastrointestinalnom sistemu. U slučaju glavnog alergena kikirikija, proteina Ara h 2, dolazi do proteolize u samoj biljci koja ne dovodi do promene u trodimenzionalnoj strukturi proteina, niti u njegovoj alergenosti.

Ispitivanje sudbine alergena mleka pri digestiji u *in vivo* uslovima pokazalo je da su svi glavni alergeni sačuvali svojstvo da vežu IgE: α -laktalbumin i β -laktoglobulin kao intaktni proteini, a kazein kao smeša peptida koja odgovara IgE-vezujućim epitopima ovog alergena.

Ključne reči: alergenost/ proteini kikirikija/ proteini mleka/ umrežavanje proteina/ enzimi/ digestibilnost/ proteoliza

Naučna oblast: Prirodno-matematičke nauke

Uža naučna oblast: Biohemija

UDK broj: 577.112

Title: Allergenic potential of enzymatically processed nutritive allergens**Abstract**

Enzymes are increasingly exploited for improving functional characteristics of food. During the enzymatic modification of food, it is necessary to pay attention to a possible change in allergenicity of obtained novel modifies.

The influence of crosslinking of peanut and milk allergens on their allergenicity has been investigated in this thesis. It has been shown that treatment of peanut proteins by oxidative enzymes does not enhance the *in vitro* IgE reactivity of these allergens, nor *ex vivo* activation of basophils. Crosslinking of casein, which is a major milk allergen, slightly altered binding of IgE antibodies, without disturbing the functional response in terms of the activation of basophils.

Results of *in vitro* studies regarding the potential application of enzymes for commercial purposes are not taken for granted, due to the complexity of the mechanisms of allergic sensitization and the risk that the modified allergen may introduce. Results obtained from studies of animal models of food allergy more reliably reflect the effects caused by modified allergens. There was no increase in allergic sensitization with peanut proteins crosslinked by action of tyrosinases in a mouse model of peanut allergy, and, also, induction of oral tolerance was preserved. Crosslinking of peanut proteins by laccase reduced allergic sensitization, mounted more pronounced tolerogenic response and potentially could be used for immunotherapy of allergy to peanuts.

Food allergens are often subjected to proteolytic processing in the organism of origin and during digestion in the gastrointestinal system. It has been shown that the major peanut allergen, protein Ara h 2, is proteolysed in the plant, without change in the three-dimensional structure of the protein, nor in its allergenicity.

The fate of milk allergens during digestion was examined *in vivo* and showed that all of the major allergens preserved ability to bind human IgE: α -lactalbumin and β -lactoglobulin are present as intact proteins and casein, represented as a mixture of the peptides, which correspond to the IgE-binding epitopes of this allergen.

Key words: allergenicity/ peanut proteins/ milk proteins/ protein crosslinking/ enzymes/ digestibility/ proteolysis

Scientific field: Life sciences

Scientific discipline: Biochemistry

UDK number: 577.112

Skraćenice

ALA – α -laktalbumin

ANOVA – analiza varijanse

AP – alkalna fosfataza

bp – bazni par

BCA – bicinhoninska kiselina

BCIP – 5-bromo-4-hloro-indolil fosfat

BLG – β -laktoglobulin

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

Caco-2 (*Carcinoma Coloni*) – ćelije kolorektalnog adenokarcinoma

CAS – kazein

CT – toksin kolere

EDTA – etilendiamin-tetrasirćetna kiselina

ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) – imunoadsorpcijski enzimski test

ESI – elektrosprej jonizacija

FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) – Organizacija za hranu i poljoprivredu pri Ujedinjenim Nacijama

FITC – fluorescein izotiocijanat

IFN- γ – interferon γ

IL-13 – interleukin 13

Ig – imunoglobulin

GIT – gastrointestinalni trakt

HSA (*Human Serum Albumin*) – serum albumin čoveka

LC – ekstrakt kikirikija umrežen lakazom

LC-CAS – kazein umrežen lakazom

L-DOPA – 3, 4-dihidroksi-L-fenilalanin

MHC (*Major Histocompatibility Complex*) – glavni kompleks tkivne podudarnosti

mMCP-1 (*Mouse Mast Cell Protease-1*) – proteaza mišjih mast ćelija-1

MS – masena spektrometrija

NBT – 4-nitroblue tetrazolium

OAS (*Oral Allergy Syndrome*) – oralni alergijski sindrom
PBS – fosfatom puferisan fiziološki rastvor
PCR (*Polymerase Chain Reaction*) – lančana reakcija polimeraze
PE (*peanut extract*) – ekstrakt kikirikija
PMSF – fenilmetilsulfonil fluorid
PVDF – polivinildifluorid
RBL SX-38 (*Rat Basophilic Leukemia*) – ćelije bazofilske leukemije pacova
SD – standardna devijacija
SDS-PAGE – natrijum-dodecilsulfat elektroforeza na poliakrilamidnom gelu
SGF – simulirani želudačni fluid
SPT (*Skin Prick Testing*) – kožne probe
TA – ekstrakt kikirikija umrežen tirozinazom iz *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach
TBS – Trisom puferisan fiziološki rastvor
TCA – trihlorsirćetna kiselina
TCR – T ćelijski receptor
TFA – trifluorsirćetna kiselina
TMB – tetrametilbenzidin
TPBS – 0.1% Tween 20 u PBS-u
TT – ekstrakt kikirikija umrežen tirozinazom iz *Trichoderma reesei*
TTBS – 0.1% Tween 20 u TBS-u
TT-CAS – kazein umrežen tirozinazom iz *Trichoderma reesei*
WHO (*World Health Organization*) – Svetska zdravstvena organizacija

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Opšti deo	3
2.1. Mehanizam nastanka alergijskih reakcija	3
2.2. Imunski sistem mukoze gastrointestinalnog trakta.....	5
2.3. Gastrointestinalni sistem i varenje hrane kod čoveka	7
2.4. Digestibilnost alergena hrane.....	8
2.5. Neželjene reakcije na hranu	10
2.6. Alergija na hranu	12
2.6.1. Alergija na kikiriki	12
2.6.1.1. Alergeni kikirikija	13
2.6.2. Alergija na mleko	15
2.6.2.1. Alergeni mleka	17
2.7. Primena enzima u cilju smanjenja alegenosti proteina hrane.....	19
2.7.1. Fenol-oksidaze	20
2.7.1.1. Lakaze	20
2.7.1.2. Tirozinaze	21
3. Ciljevi istraživanja	23
4. Alergenost enzimski procesovanih alergena kikirikija i mleka u in vitro i ex vivo testovima	24
4.1. Alergenost enzimski procesovanih alergena kikirikija u <i>in vitro</i> i <i>ex vivo</i> testovima.....	24
4.1.1. Uvod	24
4.1.2. Materijal i metode	25
4.1.3. Rezultati	29
4.1.3.1. Veličina i agregacija umreženih proteina kikirikija	29
4.1.3.2. Molekulske osobine i IgE vezujući epitopi umreženih proteina kikirikija	30
4.1.3.3. <i>In vitro</i> pepsinska digestibilnost umreženih proteina kikirikija.....	32
4.1.4. Diskusija.....	33

4.2. Alergenost enzimski procesovanih alergena mleka u <i>in vitro</i> i <i>ex vivo</i> testovima.....	35
4.2.1. Uvod	35
4.2.2. Materijal i metode.....	36
4.2.3. Rezultati	38
4.2.3.1. Uticaj umrežavanja kazeina na vezivanje IgE antitela.....	38
4.2.3.2. Uticaj umrežavanja kazeina na aktivaciju bazofila	39
4.2.4. Diskusija.....	40
5. Alergenost enzimski procesovanih proteina kikirikija u <i>in vivo</i> modelima	42
5.1. Alergenost proteina kikirikija modifikovanih tirozinazama.....	42
5.1.1. Uvod	42
5.1.2. Materijal i metode.....	44
5.1.3. Rezultati	49
5.1.3.1. <i>In vitro</i> biodostupnost proteina umreženih tirozinazama	49
5.1.3.2. Alergijske reakcije na hranu nakon intragastričnog izlaganja proteinima kikirikija umreženim tirozinazama.....	49
5.1.3.3. Indukcija oralne tolerancije proteinima kikirikija umreženim tirozinazama	51
5.1.4. Diskusija.....	52
5.2. Alergenost proteina kikirikija modifikovanih lakazom	56
5.2.1. Uvod	56
5.2.2. Materijal i metode.....	57
5.2.3. Rezultati	61
5.2.3.1. Alergijske reakcije na hranu nakon intragastričnog izlaganja proteinima kikirikija umreženim lakazom.....	61
5.2.3.2. Indukcija oralne tolerancije proteinima kikirikija umreženim lakazom	62
5.2.3.3. Imunoterapija proteinima kikirikija umreženim lakazom	64
5.2.4. Diskusija.....	66
6. Uticaj proteolitičkog procesovanja Ara h 2 proteina na njegovu alergenost.....	68
6.1. Uvod.....	68
6.2. Materijal i metode.....	70
6.3. Rezultati	74
6.3.1.1. Izolovanje Ara h 2 i Ara h 6 iz sirovog ekstrakta kikirikija	74

6.3.1.2.	SDS-PAGE analiza Ara h 2 i Ara h 6.....	75
6.3.1.3.	Identifikacija izolovanih proteina pomoću ESI-masene spektrometrije.....	77
6.3.1.4.	Analiza Ara h 2 i Ara h 6 genskih sekvenci	79
6.3.1.5.	Molekulska modelovanje Ara h 2 izoforme	79
6.3.1.6.	Vezivanje humanih IgE antitela od strane Ara h 2 izoformi.....	80
6.4.	Diskusija	81
7.	Uticaj proteolize u digestivnom traktu na alergenost proteina mleka	85
7.1.	Uvod.....	85
7.2.	Materijal i metode.....	88
7.3.	Rezultati	95
7.3.1.1.	Uticaj pH vrednosti SGF na digestiju BLG i ALA.....	95
7.3.1.2.	Pepsinoliza svežeg mleka u želucima pacova in vivo	97
7.3.1.3.	Analiza proteina mleka koji preživljavaju digestiju u želucu pacova	98
7.3.1.4.	Analiza peptida dobijenih ekstrakcijom želudačnog sadržaja.....	99
7.3.1.5.	Digestija mleka u uslovima koji oponašaju in vivo uslove.....	102
7.3.1.6.	Vezivanje peptida dobijenih digestijom svežeg mleka za IgE	103
7.4.	Diskusija	105
8.	Zaključci.....	107
9.	Literatura.....	110
10.	Biografija autora	123

1. Uvod

Zbog porasta učestalosti alergija na hranu sve više se ulažu naporu u stvaranje hipoalergenih prehrambenih proizvoda. U cilju poboljšanja tehnofunkcionalnih svojstava hrane koriste se različiti hemijski i fizički postupci. U poslednje vreme sve više se ispituje mogućnost primena enzima u ove svrhe zbog primene blagih reakcionih uslova (temperatura, pH, pritisak), a sa druge strane konzumenti enzimske tretmane smatraju prirodnim. Primena oksidativnih enzima (tirozinaze i lakaze) i proteaza u cilju dobijanja hrane sa poboljšanim karakteristikama i hipoalergenih proizvoda predmet je mnogih savremenih istraživanja.

Alergija na proteine kravljeg mleka je najčešći uzrok alergije kod beba i dece, sa incidencom od 2-6%. Glavni alergeni mleka su kazein, β -laktoglobulin (BLG) i α -laktalbumin (ALA).

Sve veća upotreba procesovane hrane koja sadrži kikiriki kao suplement dovodi do povećanja broja osoba koje imaju alergiju na kikiriki. Alergija na kikiriki se razvija rano u detinjstvu i najčešće traje tokom celog života individue. Pri ingestiji veoma malih količina proteina kikirikija kod osoba koje su senzitivisane može doći do veoma ozbiljnih alergijskih reakcija, pa čak i anafilaktičkog šoka. Do senzitivizacije najčešće dolazi unosom hrane (npr. kikiriki puter), *in utero*, prilikom dojenja ili korišćenjem preparata za kožu koji sadrže ulje kikirikija. Pokazano je da način obrade kikirikija u prehrambenoj industriji ima veze sa mogućnošću da izazove alergijske reakcije.

U ovoj tezi ispitani su uticaji umrežavanja kazeina i proteina kikirikija oksidativnim enzimima na njihovu alergenost. Pokazano je da tretman oksidativnim enzimima na proteine kikirikija u *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* testovima ne pokazuje veći alergeni potencijal u odnosu na nemodifikovane proteine kikirikija i kazein. U *in vivo* studiji pokazano je da tretman proteina kikirikija ima potencijal za primenu u proizvodnji hipoalergenih preparata.

Proteini umreženi lakazom slabije senzitišu miševе i izazivaju izraženiji tolerogeni odgovor.

Proteolitičko procesovanje glavnog alergena kikirikija Ara h 2, koje se odvija u samoj biljci, nije promenilo alergena svojstva ovog proteina. Pošto prilikom ove obrade dolazi do uklanjanja dipeptida sa C-terminusa koja ne obuhvata IgE-vezujuće epitope ovog proteina i nije praćena značajnim strukturnim promenama, očuvanje sličnih alergeniх svojstava je očekivano.

Opšte je prihvaćena veza između stabilnosti alergena u uslovima želudačne digestije i ozbiljnosti reakcija koje mogu da izazovu kod osetljivih osoba. Kao kriterijum za ispitivanje alergeniх potencijala proteina uzima se otpornost na digestiju pepsinom. U poslednje vreme sve je veći pritisak da testovi koji ispituju pepsinsku rezistenciju što više oponašaju uslove koji vladaju *in vivo*.

Jedno poglavlje ove teze posvećeno je ispitivanju efekata digestije mleka u želucima pacova na glavne alergene mleka. Nakon digestije ALA i BLG su prisutni kao intaktni proteini. Najznačajniji alergen mleka, kazein, digestovan je do peptida koji se u značajnoj meri vežu za IgE iz seruma pacijenata alergičnih na mleko.

2. Opšti deo

Više od 25% ukupne svetske populacije, i čak 40% populacije u industrijalizovanim zemljama ima neki od simptoma alergije (rinitis, konjunktivitis, astma). Alergija je prvi put opisana od strane bečkog pedijatra Clemens von Pirquet-a kao preosetljivost nekih njegovih pacijenata na inače bezopasne čestice, kao što su polen, prašina ili neke vrste hrane (Bukantz, S. C. 2002).

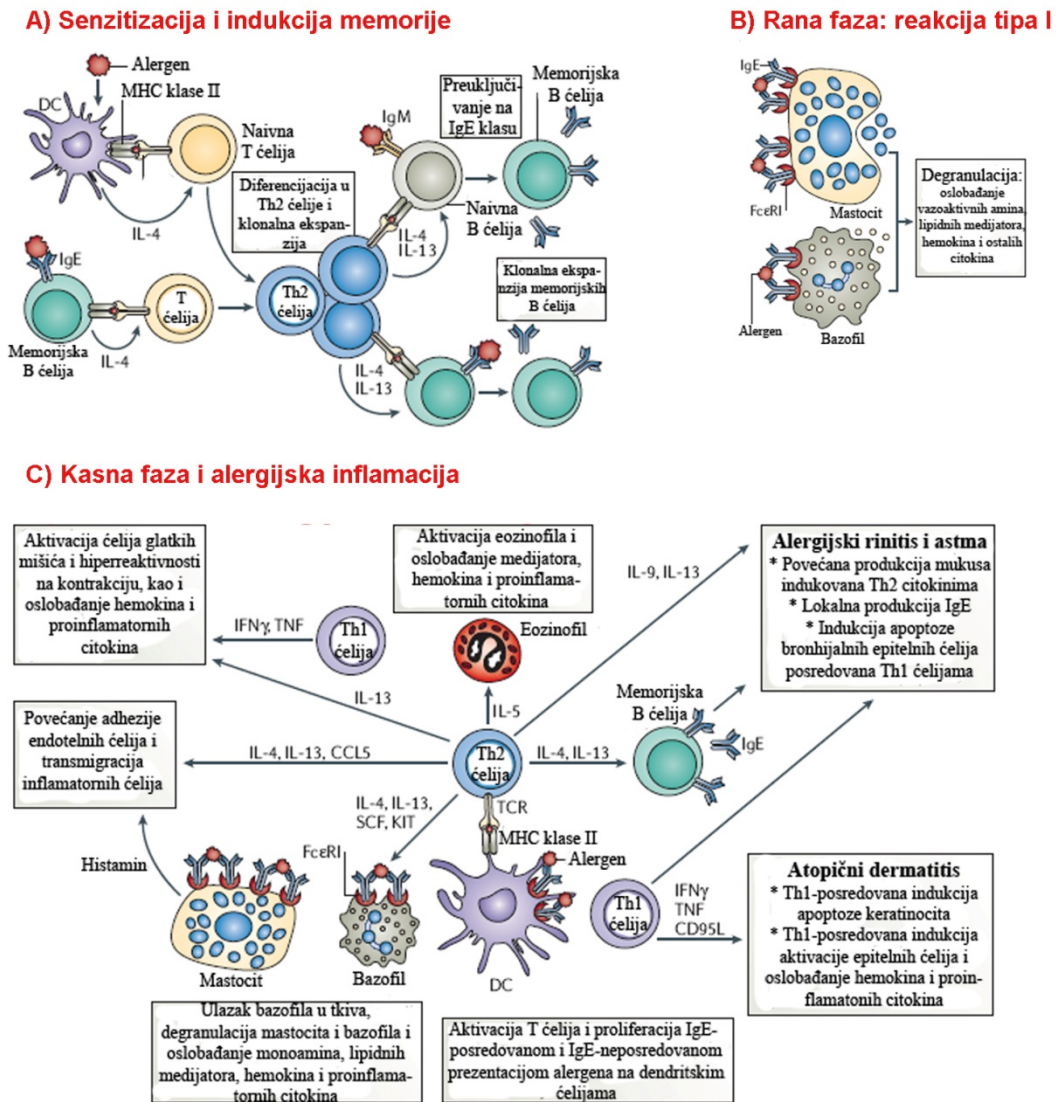
Alergija je poremećaj imunskog sistema i predstavlja prvi tip od četiri tipa preosetljivosti (hipersenzitivnosti) za koji je karakteristična povećana proizvodnja IgE antitela na inače bezopasne molekule iz spoljašnje sredine (alergena). Alergeni su molekuli dominantno proteinske ili glikoproteinske strukture, molekulskih masa u rasponu od 5 do 80 kDa (Breiteneder, H. and Clare Mills, E. N. 2005).

2.1. Mehanizam nastanka alergijskih reakcija

Nastanak alergijske reakcije može se posmatrati kao proces koji ima 3 faze (Slika 1).

U prvoj fazi dolazi do senzitivacije. Tada počinje proizvodnja IgE antitela i to se najčešće dešava prilikom prvog izlaganja alergenu. Antigen-prezentujuće ćelije (dendritske ćelije, B ćelije) fagocituju alergen i obrađuju ga u endolizozomina do peptida. Peptidi izvedeni od alergena bivaju udruženi sa MHC klase II receptorima i prikazani naivnim T ćelijama. Udruživanje peptid-MHC II kompleksa i T ćelijskog receptora je signal za diferencijaciju i klonalnu ekspanziju naivnih CD4⁺ T ćelija u T pomoćničke ćelije Th2 fenotipa što je kontrolisano i citokinima prisutnim u mikrookolini. Ove ćelije proizvode specifične citokine (IL-4 i IL-13) koji deluju na alergen-specifične B ćelije preoključivanjem izotipa antitela u IgE (Valenta, R. 2002). Tokom i nakon

procesa senzitivacije, B ćelije kod alergičnih osoba produkujaju alergen-specifična antitela klase E. Kod nealergičnih individua može se detektovati nizak nivo alergen-specifičnih IgG molekula (Niederberger, V., Niggemann, B. et al. 2002).



Slika 1: Mehanizam alergijske reakcije. Adaptirano sa dozvolom Macmillan Publishers Ltd: [Nature Reviews Immunology] (Larche, M., Akdis, C. A. et al. 2006), Copyright (2006)

Rana faza alergijske reakcije dešava se pri sledećem susretu sa alergenom, kada dolazi do njegovog vezivanja za IgE antitela. 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 (Hellman, L. 2007).

Multivalentno vezivanje alergena za IgE, koji je pak vezan za FcεRI, i sledstveno agregiranje FcεRI, aktiviraju mastocite i bazofile. Aktiviranje signalne kaskade udruživanjem FcεRI ima za posledicu oslobađanje inflamatornih medijatora iz sekretornih granula (histamin, leukotrijeni, prostaglandini, faktori aktivacije trombocita) i citokina. Ovi molekuli već u prvih nekoliko minuta uzrokuju patofiziološke promene, kao što su kontrakcija glatkih mišića, produkcija mukusa i povećana propustljivost krvnih sudova, koji su odgovorni za akutne simptome 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 (Roitt, I., Brostoff, J. et al. 2006).

Pored trenutnih simptoma, oslobađanje medijatora ima za posledicu i dugotrajne inflamatorne procese koji su vezani za privlačenje T_h2 limfocita, eozinofila, bazofila i monocita na mesto kontakta sa alergenom. Ove ćelije produkuju različite citokine i medijatore koji dovode do oštećenja okolnog tkiva, što predstavlja kasnu fazu alergijskog odgovora. Ovaj odgovor najčešće se javlja od 2 do 24 časa nakon početne reakcije (Jenneway, C. A., Travers, P. et al. 2001).

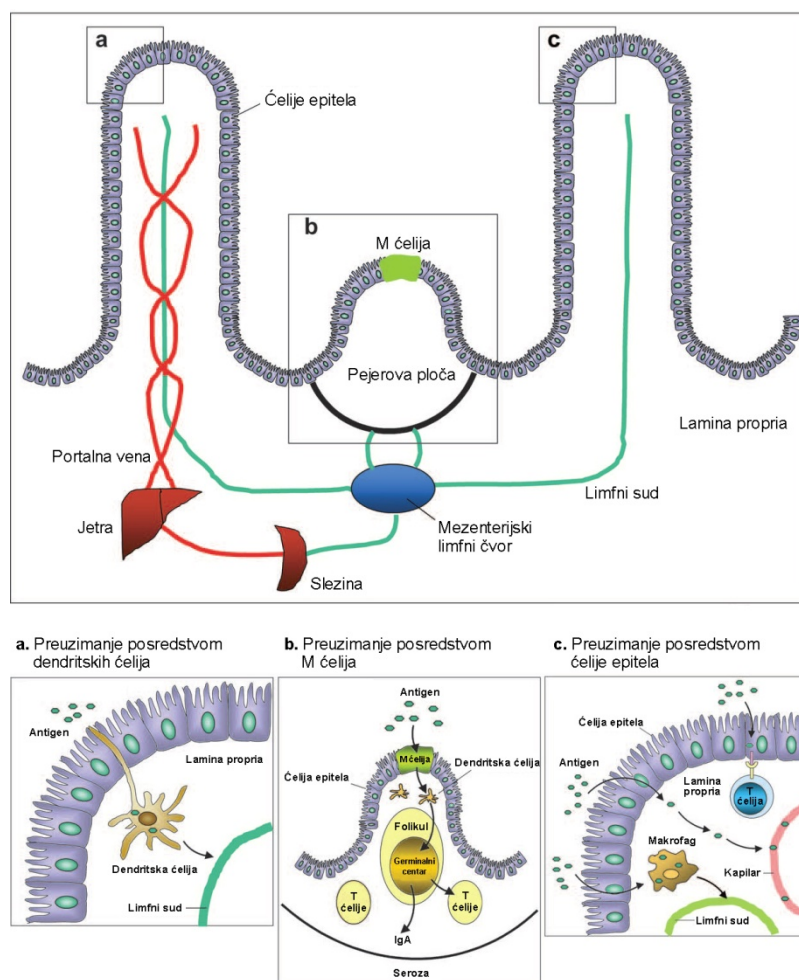
2.2. Imunski sistem mukoze gastrointestinalnog trakta

Gastrointestinalni mukozni sistem poseduje mehanizme kojima razlikuje proteinske antigene unete ishranom i bakterije koje su fiziološki prisutne u crevima od mogućih patogenih mikroorganizama. Osobine imunskih ćelija prisutnih u subepitelu creva, kao i specifični citokini, obezbeđuju jak tolerogeni odgovor koji se naziva oralna toleranca (Mayer, L. and Shao, L. 2004).

Odgovor mukoznog imunskog sistema gastrointestinalnog trakta na antigene zavisi od načina ulaska u organizam i prikazivanja imunskom sistemu. (Slika 2)

Organizovane strukture limfnog tkiva u mukozi creva nazivaju se Pejerove ploče i nalaze se duž intestinalnog zida, ispod M ćelija. M ćelije su specijalizovane za preuzimanje čestičnih antigena iz lumena creva i transport transcitozom do

antigen-prezentujućih ćelija (dendritičnih ćelija ili makrofaga). Nakon preuzimanja antigena, antigen-prezentujuće ćelije migriraju u Pejerove ploče, gde pokreću imunski odgovor. Antitela koja se proizvode u Pejerovim pločama su dominantno IgA i/ili IgG klase. Od citokinskog profila u Pejerovim pločama zavisi da li će se proizvoditi antitela neke druge klase. (Mowat, A. M. 2003; Chehade, M. and Mayer, L. 2005; Stertman, L., Lundgren, E. et al. 2006).



Slika 2: Načini ulaska antigena iz lumena creva u organizam. Reprodukivano iz Journal of Allergy and Clinical Immunology, 115/1, Mirna Chehade, Lloyd Mayer, Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities, 3-12, Copyright (2005), sa dozvolom Elsevier-a.

Drugi način ulaska antigena u organizam je preko podepitelskih dendritskih ćelija. Ove ćelije mogu da izbace nastavke u lumen creva i da zahvate solubilne antigene ili bakterije (Rescigno, M., Urbano, M. et al. 2001; Rimoldi, M. and Rescigno, M. 2005). Podepitelske dendritske ćelije su dominantnog naivnog fenotipa i mogu da migriraju u periferne limfne organe izazivajući perifernu

tolerancu (Steinman, R. M., Hawiger, D. et al. 2003). Međutim, u prisustvu patogenih bakterija, dendritske ćelije se aktiviraju posredstvom Toll-like receptora na površini i uz pomoć enterocita koji proizvode proinflammatorni citokin IL-8 (Mowat, A. M. 2003; Rimoldi, M. and Rescigno, M. 2005; Stertman, L., Lundgren, E. et al. 2006).

Ukoliko dendritske ćelije ne fagocituju antigene koji su prošli kroz intestinalni zid, oni preko kapilara i portalne vene ulaze u sistemsku cirkulaciju (Chehade, M. and Mayer, L. 2005).

Ćelije epitela intestinuma mogu da fagocituju antigene i ponašaju se kao neprofesionalne antigen-prezentujuće ćelije (ekspresiraju MHC klase I i MHC klase II, ali ne i kostimulatorne molekule) i dovode do anergije antigen specifičnih CD4⁺ ćelija, ili moduliraju lokalni imunski odgovor aktiviranjem regulatornih T ćelija (Grdic, D., Hornquist, E. et al. 1998; Allez, M., Brimnes, J. et al. 2002; Mowat, A. M. 2003).

2.3. Gastrointestinalni sistem i varenje hrane kod čoveka

Pojednostavljeno gledajući, gastrointestinalni trakt (GIT) čoveka predstavlja cev, koja se proteže od usnog do analnog otvora. Odvojen je epitelom od cirkulacije i ostalih organa i predstavlja spoljašnju sredinu u imunološkom pogledu.

GIT je organizovan u nekoliko organa koji imaju različitu funkciju. Početak GIT-a je usna duplja u kojoj se luči pljuvačka i otpočinje varenje hidrolizom skroba i glikogena. Hranljiva masa se zatim transportuje gutanjem kroz ždrelo i jednjak do želuca (Guyton, A. C. and Hall, J. E. 1996).

Želudac je organ bubrežnog oblika sačinjen iz jedne komore. Na ulasku i izlasku iz želuca nalaze se dva sfinktera, kardijačni i pilorusni koji obezbeđuju otvaranje i zatvaranje želudačne komore. Gornji deo želuca je kardijačni deo, iza koga je fundus i na kraju pilorusni deo. Zid želuca ima tri sloja: mukozni, spoljašnji mišićni sloj i serozni sloj. Mukozu čine različiti tipovi žlezdanih ćelija, lamina

propria i tanak sloj glatkih mišićnih ćelija. Spoljašnji mišićni sloj čine uzdužni, kosi i kružni glatki mišićni snopovi. Seroza se nalazi ispod mišićnog sloja i čini je vezivno tkivo (Guyton, A. C. and Hall, J. E. 1996).

Egzokrine žlezde fundusa želuca luče želudačni sok kojim se vari hrana. Postoji tri tipa fundusnih sekretornih žlezdi želuca: mukozne, peptične i parijetalne. Parijetalne ćelije luče HCl, a peptične žlezde luče pepsinogen iz zimogenih granula (Hersey, S. J. and Sachs, G. 1995; Guyton, A. C. and Hall, J. E. 1996). Mukozne ćelije, kao i kardijačne i pilorusne luče sluz koja oblaže zid želuca i štiti ga od oštećenja želudačnim sadržajem.

Lučenje pepsina je pod kontrolom nerva vagusa i hormona gastrina. Nakon oslobađanja pepsinogena iz granula u kiseloj sredini dolazi do autokatalitičkog aktiviranja pepsina isecanjem 47 aminokiselina sa N-terminusa. Humani pepsin je prisutan u nekoliko izoformi, ali je najzastupljenija pepsin A. Pripada aspartat proteazama (EC 3.4.23.1), mase je oko 36 kDa i katalizuje hidrolizu peptidnih veza preferencijalno iza aromatičnih aminokiselina. Ireverzibilno se denaturiše na $\text{pH} > 5$ i pH optimum mu je 1.5-2.

Varenje se zatim nastavlja u tankom crevu u kom se odvija digestija enzimima koje luči pankreas i apsorpcija nutrijenata. Na tanko crevo se nastavlja debelo crevo u kom se odvija reapsorpcija vode i elektrolita i završava se analnim otvorom (Guyton, A. C. and Hall, J. E. 1996).

Postoji nekoliko razlika između GIT-a čoveka i pacova. Jedna od njih je razlika u kardijačnom (nesekretornom) delu želuca, koji je kod pacova naseljen bakterijama. Takođe, postoje razlike i u nivou ždrele, tankog i debelog creva. Bez obzira na ove razlike, smatra se da podaci o digestiji dobijeni na pacovima verno prikazuju situaciju i kod ljudi (Kararli, T. T. 1995; DeSesso, J. M. and Jacobson, C. F. 2001).

2.4. Digestibilnost alergena hrane

Najšire prihvaćena podela alergena hrane je na kompletne i nekompletne na osnovu digestibilnosti u simuliranom želudačnom soku. Kompletni alergeni

hrane su oni koji mogu i da senzitišu i da izazovu reakciju, tj. preživljavaju digestiju pepsinom. Nekompletni alergeni su oni koji nisu otporni na digestiju u želucu, pa stoga ne mogu da senzitišu pacijente oralnim putem. Ovi alergeni mogu da izazovu reakciju koja je posledica senzitivacije nekim drugim ukršteno reaktivnim alergenom hrane koji je stabilan na proteolizu, ili senzitivacije nekim drugim alergenom koji u organizam nije dospelo oralnim putem (Aalberse, R. C. 1997). Ovi alergeni uglavnom izazivaju oralni alergijski sindrom (OAS).

Oralni alergijski sindrom predstavlja klasu II alergije na hranu i do senzitivacije dolazi proteinima polena ili lateksa, a kontakt sa nekompletnim alergenom pokreće lokalnu alergijsku reakciju. Najviše izučavana veza između senzitivacije polenom i oralnog alergijskog sindroma na hranu je reakcija na alergen iz jabuke Mal d 1 kod osoba alergičnih na polen breze (Son, D. Y., Scheurer, S. et al. 1999).

Iako je od strane Svetske zdravstvene organizacije (WHO) i Organizacije za hranu i poljoprivredu pri Ujedinjenim Nacijama (FAO) prihvaćen test proteolize kao pouzdan za procenu alergenog potencijala genetski modifikovanih biljaka, provera digestibilnosti čistih proteina nije pouzdan kriterijum za utvrđivanje mogućih posledica koje ovi proteini mogu da izazovu u realnim uslovima. Takođe, pokazano je i da podložnost proteolizi pepsinom zavisi ne samo od količine pepsina koji se koristi, već da zavisi i od strukture proteina. Primećeno je da proteini koji pripadaju istim familijama slično se ponašaju u prisustvu pepsina, nezavisno od toga da li su identifikovani kao alergeni ili ne (Fu, T. J., Abbott, U. R. et al. 2002).

Sa druge strane, pokazano je da na proteolizu proteina hrane pepsinom utiče i prisustvo komponenti matriksa. Iako se prečišćeni proteini lako digestuju pepsinom, u prisustvu polisaharida (Polovic, N., Blanus, M., et al. 2007) ili fosfolipida vreme opstanka u simuliranom žrludačnom soku je značajno produženo (Moreno, F. J., Mackie, A. R. et al. 2005). Ovi rezultati upućuju da za predviđanje ponašanja proteina u *in vivo* uslovima digestije treba uzeti u obzir i prisustvo drugih komponenti koje mogu drastično da promene ishod pepsinolize. Nažalost, za sad još uvek ne postoji usaglašen protokol za ispitivanje digestije pepsinom u uslovima koji najbolje oponašaju *in vivo* digestiju.

2.5. Neželjene reakcije na hranu

Alergije na hranu i druge osetljivosti na hranu su neželjene reakcije na hranu (Taylor, S. L. and Hefle, S. L. 2001). Ove reakcije su do skoro posmatrane kao pojedinačne jer se smatralo da pogađaju samo mali broj ljudi iz celokupne populacije, t.j. da većina ljudi može jesti istu hranu bez štetnih efekata. Međutim, u poslednje vreme broj ljudi koji ispoljavaju neželjene reakcije pri susretu sa nekim komponentama hrane raste, pa se ove reakcije ne posmatraju kao izolovani slučajevi. Nephodno je naglasiti da nisu sve neželjene reakcije na hranu alergijske. Neželjene reakcije na hranu mogu biti primarne imunske osetljivosti posredovane IgE-om ili neposredovane IgE-om, neimunske netolerancije i sekundarne osetljivosti.

Netolerancije na hranu obuhvataju neuobičajene reakcije na hranu koje ne uključuju imunski sistem. Obuhvataju reakcije koje su posledica metaboličkog poremećaja (pr. netolerancija laktoze), anafilaktoidne reakcije (posledica oslobađanja histamina iz ćelijskih depoa – npr. jagode mogu da izazovu ovakvu reakciju) i idiosinkratske reakcije (neobične reakcije na hranu nepoznatog mehanizma koje mogu uključivati čak i psihosomatske poremećaje – npr. astma indukovana sulfitom) (Taylor, S. L. and Hefle, S. L. 2001).

Sekundarne osetljivosti na hranu posledica su nekog drugog poremećaja u organizmu i javljaju se u toku ili posle primarnog oboljenja. Mogu biti posledica poremećaja npr. organa za varenje (pr. netolerancija laktoze kao posledica kolitisa) ili mogu biti indukovane lekovima (npr. osetljivost na tiramin kod osoba koje su lečene inhibitorima monoamino oksidaze) (Taylor, S. L. and Hefle, S. L. 2001).

S obzirom da uloga reakcije kasne preosetljivosti još uvek nije jasna u nastanku pravih alergija na hranu, danas se pod terminom alergija na hranu podrazumeva isključivo IgE-om posredovana reakcija. Preosetljivost se javlja kao posledica povećane produkcije IgE u odgovoru na antigen. IgE se vezuje za FcεRI receptor visokog afiniteta na površini efektorskih ćelija (bazofili, mastociti) pri čemu dolazi do njihove aktivacije koja ima za posledicu

oslobađanje anafilaktogenih medijatora (histamin, leukotrijeni...) (Taylor, S. L. 1987; Simecka, J. W. 1998; Hefle, S. L. 2001).

Prave alergije na hranu predstavljaju pojačani (neuobičajeni odgovor) imunskog sistema na komponente određene hrane i mogu biti, u zavisnosti od imunskog odgovora, svrstane u 2 kategorije: reakcije rane preosetljivosti i reakcije kasne preosetljivosti. U reakcijama rane preosetljivosti dolazi do razvoja simptoma par minuta do sat nakon ingestije hrane. Ovakve reakcije su posredovane alergen-specifičnim IgE molekulima i često su veoma ozbiljne. U reakciji kasne preosetljivosti do pojave prvih simptoma dolazi 24 sata ili više od ingestije hrane i ogleda se u neuobičajenom ćelijskom imunskom odgovoru. Njena uloga još nije razjašnjena (Simecka, J. W. 1998; Shreffler, W. G., Lencer, D. A. et al. 2005).

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 želuca i pankreasa (bar delimično). Samo celi proteini ili njihovi veći fragmenti mogu biti fagocitovani od strane antigen-prikazujućih ćelija i izazvati imunski odgovor koji za posledicu u sledećem koraku ima povezivanje IgE na mastocitima i bazofilima (Hefle, S. L. 2001; Taylor, S. L. and Hefle, S. L. 2001).

Imunološke osobine oralno unetih antigena (alergena) mogu se razlikovati od osobina antigena sa parenteralnom administracijom. 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. (Taylor, S. L. 1987; Taylor, S. L., Lemanske, R. F., Jr. et al. 1987; Hefle, S. L. 2001; Taylor, S. L. and Hefle, S. L. 2001).

2.6. Alergija na hranu

Uobičajeni uzročnici alergije na hranu svrstani su u 8 grupa od strane FAO. Smatra se da ove namirnice izazivaju alergijske reakcije u preko 90% slučajeva svih IgE-om posredovanih reakcija na svetu. Ove grupe su:

1. mleko i mlečni proizvodi
2. žitarice koje sadrže gluten (pšenica, pirinač, ovas, ječam i njihovi hibridni sojevi i proizvodi)
3. ljuskari
4. jaja i proizvodi koji sadrže jaja
5. kikiriki i proizvodi od kikirikija
6. soja i proizvodi od soje
7. riba
8. koštuničavo voće (badem, lešnik, kesten, orah, američki orah, brazilski orah, makadamija, pistači i sl.).

2.6.1. Alergija na kikiriki

Smatra se da oko 1% svetske populacije ima alergiju na kikiriki sa tendencijom povećanja prevalencije (de Leon, M. P., Rolland, J. M. et al. 2007). Simptomi koji se javljaju nakon unosa kikirikija su uobičajeni za alergije na hranu: povraćanje, urtikarija, nauzeja, angioedem, bronhospazam, anafilaksa (Taylor, S. L. and Hefle, S. L. 2001; de Leon, M. P., Rolland, J. M. et al. 2007).

Alergija na kikiriki (*Arachis hypogea* L.) je glavni uzrok anafilakse indukovane hranom, kako kod dece i adolescenata, tako i kod odraslih. Iako su tipične doze koje izazivaju reakciju na kikiriki od 0.1-1 g, kod veoma osetljivih osoba je dovoljno da čak količine do 100 µg kikirikija izazovu po život opasne reakcije (Astier, C., Morisset, M. et al. 2006; Lehmann, K., Schweimer, K. et al. 2006).

Alergija na kikiriki se razvija rano u detinjstvu i najčešće traje tokom celog života individue. Do senzitivizacije najčešće dolazi unosom hrane (npr. kikiriki puter), *in utero*, prilikom dojenja ili korišćenjem preparata za kožu koji sadrže

ulje kikirikija. Sve veća upotreba procesovane hrane koja sadrži kikiriki kao suplement dovodi do povećanja broja osoba koje imaju alergiju na kikiriki (King, N., Helm, R. et al. 2005; de Leon, M. P., Rolland, J. M. et al. 2007).

Pokazano je da način obrade kikirikija ima veze sa mogućnošću da izazove alergijske reakcije. Naime, pečenjem kikirikija se njegov alergeni potencijal povećava u odnosu na termički netretirani, kuvani i prženi kikiriki. Ovime se može objasniti veći procenat osoba alergičnih na kikiriki u SAD i Evropi (dominira pečeni kikiriki u ishrani) u odnosu na Kinu, gde je i pored veće konzumacije kikirikija u ishrani manji broj osoba alergičan (kikiriki se najčešće prži ili kuva) (Beyer, K., Morrow, E. et al. 2001; Maleki, S. J., Viquez, O. et al. 2003; King, N., Helm, R. et al. 2005; Mondoulet, L., Paty, E. et al. 2005; Lehmann, K., Schweimer, K. et al. 2006; de Leon, M. P., Rolland, J. M. et al. 2007).

Ne postoji lek za alergiju na kikiriki i do sada jedini način da se izbegne reakcija je izbegavanje hrane koja sadrži kikiriki.

2.6.1.1. Alergeni kikirikija

Do sada je dobro proučeno 9 alergena prisutnih u kikirikiju od ukupno 13, koliko je prijavljeno (www.allergen.org).

Ara h 1 je glikoprotein, molekulske mase 64 kDa. Pripada grupi vicilina. Ima tendenciju da formira trimere i velike multimere, čije monomerne jedinice (od 64 kDa) su agregirane u stabilnu formu zahvaljujući hidrofobnim interakcijama. Sintetiše se kao prekursor i tokom maturacije proteina dolazi do uklanjanja N-terminalnog peptida (78.-84. aminokiseline) u biljci. Ovaj peptid takođe poseduje IgE-vezujuće epitope (Viquez, O. M., Konan, K. N. et al. 2003; Wichers, H. J., De Beijer, T. et al. 2004; van Boxtel, E. L., van Beers, M. M. et al. 2006; van Boxtel, E. L., van den Broek, L. A. et al. 2007; Barre, A., Sordet, C. et al. 2008).

Ara h 2 pripada familiji konglutina. Na elektroforezi se zapaža kao dublet Ara h 2.01 (16 670 Da) i Ara h 2.02 (18 050 Da). Ove dve izoforme nisu rezultati

različitog splajsovanja primarnog transkripta, već su produkti dva različita gena. Razlika između varijante Ara h 2.01 i Ara h 2.02 je insercija 12 aminokiselina koja počinje od pozicije 75 u polipeptidnom lancu. S obzirom da je ovaj peptid prepoznat od strane serumskih IgE antitela, smatra se da bi Ara h 2.02 mogao biti snažniji alergen od Ara h 2.01 (Chatel, J. M., Bernard, H. et al. 2003). Za razliku od većine konglutina, Ara h 2 ne podleže posttranslacionim modifikacijama sem formiranja 4 disulfidne veze, pa je protein prisutan u kikirikiju kao jedan polipeptidni lanac bez subjedinica. Pokazano je da njegova tercijarna struktura i funkcija tripsin-inhibitora bivaju očuvane čak i nakon termičke obrade (pečenja) zahvaljujući prisustvu disulfidnih veza (Beyer, K., Morrow, E. et al. 2001; Maleki, S. J., Viquez, O. et al. 2003; Lehmann, K., Schweimer, K. et al. 2006).

Ara h 2 je glavni alergen kikirikija i pokazuje veću reaktivnost od Ara h 1 i Ara h 3 u *in vitro* i *in vivo* eksperimentima: imunoblotu, oslobađanju histamina od strane bazofila, kožnim probama (Koppelman, S. J., Wensing, M. et al. 2004; Palmer, G. W., Dibbern, D. A., Jr. et al. 2005; Astier, C., Morisset, M. et al. 2006; Flinterman, A. E., van Hoffen, E. et al. 2007; McDermott, R. A., Porterfield, H. S. et al. 2007; Peeters, K. A., Koppelman, S. J. et al. 2007). Oko 90% osoba alergičnih na kikiriki ima antitela na Ara h 2, a ozbiljnost simptoma po ingestiji kikirikija je u korelaciji sa raznolikošću epitopa na Ara h 2 koje IgE osobe prepoznaju. Takođe, pozitivne kožne probe na Ara h 1 i Ara h 3, osim Ara h 2, u vezi su sa ozbiljnijim simptomima alergije na kikiriki (Shreffler, W. G., Lencer, D. A. et al. 2005; Astier, C., Morisset, M. et al. 2006).

Ara h 3 je protein koji pripada grupi glicinina, molekulske mase 60 kDa. Podaci vezani za ovaj alergen su veoma oskudni i uglavnom se odnose na rekombinantni Ara h 3 ili na N-terminalni fragment od 14 kDa. Posle translacije polipeptidni niz koji kodira gen za Ara h 3 podleže proteolitičkom procesovanju, tako da je „zreli“ Ara h 3 dimer kisele i bazne subjedinice koje su povezane disulfidnom vezom i formiraju stabilni heksamer. S obzirom da se proteolitičko procesovanje Ara h 3 ne odvija na strogo uređeni način, subjedinice variraju u masi, a prilikom elektroforeze Ara h 3 se detektuje kao mnoštvo traka u opsegu od 14-60 kDa (Piersma, S. R., Gaspari, M. et al. 2005). S obzirom da se reakcija

na Ara h 3 ne javlja pojedinačno, već zajedno sa drugim alergenima kikirikija, smatra se da je senzitivizacija na Ara h 3 sekundarna i posledica povećane propustljivosti intestinalnog epitela usled alergijske reakcije pri susretu sa primarnim alergenom (Koppelman, S. J., Wensing, M. et al. 2004).

Ara h 6 pripada familiji konglutina (2 S albumina). Homolog je Ara h 2, pokazuje ukrštenu reaktivnost sa Ara h 2 u imunoblotu (Koppelman, S. J., de Jong, G. A. et al. 2005) i dominantan je alergen prepoznat od strane IgE antitela dece alergične na kikiriki (Flinterman, A. E., van Hoffen, E. et al. 2007). Njegov klinički značaj ogleda se u stabilnosti (kao i Ara h 2) i otpornosti na digestiju pepsinom (Suhr, M., Wicklein, D. et al. 2004). Molekulska masa ovog alergena je 14 981 Da prema (Koppelman, S. J., de Jong, G. A. et al. 2005), odnosno 14 843 Da prema (Bernard, H., Mondoulet, L. et al. 2007). Jedan deo Ara h 6 podleže proteolitičkom procesovanju u biljci koje iseca dipeptid IR, tako da nastaje dimer dve subjedinice koje su povezane disulfidnom vezom. Oba oblika Ara h 6 (procesovani i neprocesovani) su prisutna u biljci (Bernard, H., Mondoulet, L. et al. 2007).

Minorni alergeni kikirikija su: Ara h 4 (37 kDa, glicinin), Ara h 5 (15 kDa, profilin), Ara h 7 (15 kDa, konglutin), Ara h 8 (17 kDa, PR-10, analog Bet v 1), Ara h 9 (9.8 kDa, nespecifični lipidni transporter).

Najbolje okarakterisani za sada su Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 i Ara h 6 i čine oko 75% ukupnih proteina kikirikija.

2.6.2. Alergija na mleko

Alergija na proteine kravljeg mleka je najčešći uzrok alergije kod beba, sa incidencom od 2-6% (Hill, D. J. and Hosking, C. S. 1996). Srećom većina dece preraste alergiju na mleko posle treće godine (Hill, D. J. and Hosking, C. S. 1996). Kod odraslih alergija na mleko je retka, ali jako naglašena. Ukoliko je osoba senzitivisana, unošenjem malih količina alergena pokreće se alergijska reakcija koja je praćena simptomima kao što su rinokonjuktivitis, astmatični napad, povraćanje, dijareja, i u najtežim slučajevima anafilaktički šok i smrt (Sampson, H. A. 1999).

Za alergene mleka pokazano je da ALA i BLG, koji su solubilni proteini, bivaju preuzeti od strane epitelih ćelija creva, dok kazein, koji se nalazi prirodno u agregiranoj formi, biva preuzet drukčijim mehanizmom, tj. biva usmeren preko M-ćelija u Pejerove ploče (Roth-Walter, F., Berin, M. C. et al. 2008). Ovo donekle predstavlja objašnjenje za anafilaktičku reakciju koju mogu da izazovu ALA i BLG kod senzitivisanih osoba, dok za kazein, uprkos čestoj i jakoj senzitivizaciji ovim alergenom, nije pokazana sistemska reakcija kod pacijenata. Takođe, kuvanje mleka smanjuje alergenost ALA i BLG što se može objasniti agregiranjem ovih proteina, i objašnjava smanjenje alergijskih reakcija kod senzitivisanih osoba nakon ovakvog tretmana mleka (Paschke, A. and Besler, M. 2002).

Za sada, ne postoji efikasna terapija za alergiju na mleko, sem izbegavanja alergena. Ovo je u praksi teško izvodljivo usled široke upotrebe proteina mleka kao sastojaka ili aditiva mnogih proizvoda, pa su prisutni u prehrambenim proizvodima kao prikriveni alergeni.

2.6.2.1. Alergeni mleka

Pregled proteina kravljeg mleka dat je u Tabeli 1.

frakcija	protein	naziv alergena	koncentracija (g/L)	% u odnosu na ukupne proteine	MM	broj aminokiselina	pI
Kazeini			~30	80			
	α S1-CAS	Bos d 8	12-15	29	23.6	199	4.9-5.0
	α S2-CAS		3-4	8	25.2	207	5.2-5.4
	β -CAS		9-11	27	24.0	209	5.1-5.4
	γ 1-CAS		1-2	6	20.6	180	5.5
	γ 2-CAS				11.8	104	6.4
	γ 3-CAS				11.6	102	5.8
	κ -CAS			3-4	10	19.0	169
Surutka			~5	20			
	ALA	Bos d 4	1-1.5	5	14.2	123	4.8
	BLG	Bos d 5	3-4	10	18.3	162	5.3
	IgG	Bos d 7	0.6-1.0	3	160.0		
	BSA	Bos d 6	0.1-0.04	1	67.0	583	4.9-5.1
	laktoferin		0.09	tragovi	800	703	8.7
Ukupni proteini			36.0	100			

Tabela 1: Karakteristike proteina mleka (Restani, P., Ballabio, C. et al. 2009)

Kazeini predstavljaju dominantnu frakciju mleka i u ukupnoj populaciji pacijenata alergičnih na mleko, više od polovine reaguje na kazein (Docena, G. H., Fernandez, R. et al. 1996; Shek, L. P. C., Bardina, L. et al. 2005). Celokupna kazeinska frakcija predstavljena je grupama α s1, α s2, β i γ kazeina. Kazeinski koagulum (čvrsta frakcija dobijena nakon zakišeljavanja mleka) sadrži sve proteine kazeinske frakcije. U koagulumu pojedinačni kazeini formiraju agregate koji se udružuju u kazeinske micelle (Dalglish, D. G. and Corredig, M. 2012).

α s1-kazeini predstavljaju dominantnu kazeinsku frakciju (oko 40%) i sastoji se iz dve komponente glavne i velike, koje se ne razlikuju u aminokiselinskoj sekvenci, već samo u stepenu fosforilacije (Monaci, L., Tregoat, V. et al. 2006). Takođe, prisutne su i brojne varijante sa različitim aminokiselinskom sekvencom kod različitih vrsta životinja. Ovaj protein poseduje 6 glavnih i 3 sporedna IgE vezujuća epitopa (Chatchatee, P., Jarvinen, K. M. et al. 2001).

Najhidrofilnija frakcija kazeina je **α s2** i čini ukupno oko 12% svih kazeina prisutnih u mleku (Monaci, L., Tregoat, V. et al. 2006). Kao i α s1 frakcija, komponente ove frakcije razlikuju se isključivo u stepenu fosforilacije proteina. Takođe, ovi kazeini formiraju i disulfidne veze, ali isključivo u okviru svoje frakcije. Na ovom proteinu je identifikovano 3 glavna i 4 sporedna IgE vezujuća regiona (Jarvinen, K. M., Beyer, K. et al. 2002).

Oko 35% kazeinske frakcije su **β -kazeini** (Monaci, L., Tregoat, V. et al. 2006). Dejstvom proteaze mleka plazmina na proteine ove frakcije nastaju γ 1, γ 2 i γ 3 kazeini. Ova frakcija predstavlja najhidrofobniju komponentu kazeinske frakcije mleka. β -kazeini su takođe prisutni u više genetičkih varijanti i poseduju 6 glavnih i 4 sporedna IgE vezujuća epitopa (Chatchatee, P., Jarvinen, K. M. et al. 2001).

Klasteri α s1-, α s2- i β -kazeina koji se formiraju mogu da vežu dvovalentne katjone Ca^{2+} , pa čak i Zn^{2+} i Fe^{3+} .

κ -kazeini imaju ključnu ulogu u koagulaciji mleka i hidrolizom himozinom daju para- κ kazein i kazeinomakropeptid, koji imaju glavnu ulogu u pravljenju sira. U mleku je prisutan kao polimer formiran disulfidnim povezivanjem od 2 do 8 monomernih jedinica (Monaci, L., Tregoat, V. et al. 2006). Oni poseduju pet regiona za vezivanje IgE antitela (Chatchatee, P., Jarvinen, K. M. et al. 2001).

BLG predstavlja skoro polovinu ukupnih proteina surutke. Pripada superfamiliji lipokalina i može da veže različite ligande: ugljovodonike, karotenoide, masne kiseline i retinol. Poseduje više genetskih varijanti, pri čemu su varijante A i B najzastupljenije. Prisutan je kao monomer i kao dimer u kravljem mleku, dok je u humanom mleku prisutan u tragovima (Monaci, L., Tregoat, V. et al. 2006; Stanic, D., Radosavljevic, J. et al. 2012). Identifikovano je 4 IgE vezujuća regiona na ovom proteinu (Jarvinen, K. M., Chatchatee, P. et al. 2001).

ALA je monomerni globularni protein koji vezuje kalcijum i čini oko četvrtinu proteina surutke. Vezivanje kalcijuma stabilizuje tercijarnu strukturu ovog proteina. Interaguje sa β -1,4-galaktoziltransferazom i formira kompleks laktozo sintaze. Sekvenca ovog proteina ima 72% homologije sa humanim ALA. Ovaj

protein poseduje 3 linearna i 4 konformaciona epitopa (Jarvinen, K. M., Chatchatee, P. et al. 2001).

2.7. Primena enzima u cilju smanjenja alegenosti proteina hrane

Pod funkcionalnom hranom podrazumeva se hrana koja, ukoliko se konzumira u normalnim količinama, dovodi do poboljšanja fizioloških procesa i zdravlja (Diplock, A. T., Charleux, J. L. et al. 1998; Salminen, S., Bouley, C. et al. 1998; Isolauri, E., Salminen, S. et al. 1999; Betoret, E., Betoret, N. et al. 2011). U skladu sa ovim, funkcionalnom hranom može se smatrati hrana kojoj je jedna ili više komponenti zamenjena ili u potpunosti uklonjena korišćenjem različitih biotehnoloških i tehnoloških postupaka. Takođe, prilikom proizvodnje funkcionalne hrane mogu se promeniti osobine komponente i/ili biodostupnost pojedinih komponenti i na taj način se postići efekti koji dovode do poboljšanja zdravlja (Isolauri, E., Salminen, S. et al. 1999).

Posebna pažnja prilikom (bio)tehnološke obrade hrane se posvećuje procesima koji mogu da promene alergenost namirnica. Hipoalergena hrana, tj. funkcionalna hrana za atopijsku populaciju, može da se proizvede na više načina. Uobičajen je tretman toplotom ili enzimskom hidrolizom proteina za smanjenje alergenosti hrane, a očekuje se da će primena metoda genetičkog inženjeringa omogućiti proizvodnju hrane koja neće izazivati neželjene alergijske reakcije.

Kako su alergije na hranu u porastu poslednjih godina, posebna pažnja se posvećuje i primeni enzima u cilju proizvodnje hipoalergene funkcionalne hrane (Luz Sanz, M., Corzo-Martinez, M. et al. 2007; Chicon, R., Lopez-Fandino, R. et al. 2008). Metod za pripremu hipoalergenog pšeničnog brašna digestijom pšeničnog brašna celulazama i aktinazama je detaljno opisan (Watanabe, M., Watanabe, J. et al. 2000). U slučaju umreženih proteina kikirikija, dobijeni agregati pokazivali su smanjeno vezivanje IgE antitela (Chung, S. Y., Maleki, S. J. et al. 2004; Chung, S. Y., Kato, Y. et al. 2005; Clare, D. A., Gharst, G. et al.

2006; Clare, D. A., Gharst, G. et al. 2008), što je usmerilo primenu enzima za stvaranje hipoalergenih formula. U poslednje vreme posebno se ispituju potencijalne primene različitih mono- i di-fenol oksidaza u industriji hrane, kao i različitih proteaza za smanjenje alergenosti i istovremeno poboljšanje tehnoloških osobina.

2.7.1. Fenol-oksidade

Fenol oksidaze (tirozinaze i lakaze) su enzimi koji sadrže jone bakra i oksiduju fenolna jedinjenja transferom elektrona sa supstrata na molekularni kiseonik. Ovi enzimi takođe mogu katalizovati formiranje polimera, uključujući proteine (Riva, S. 2006).

2.7.1.1. Lakaze

Lakaze su difenol oksidaze koji katalizuju oksidaciju različitih fenolnih jedinjenja, kao što su difenoli, polifenoli, različiti supstituisani fenoli, aromatični amini i benzotioili (Canfora, L., Iamarino, G. et al. 2008) formirajući slobodno-radikalne intermedijere. Reaktivni slobodni radikali dalje mogu podleći neenzimskoj polimerizaciji ili mogu reagovati sa supstratima koji imaju visok redoks potencijal (uključujući aminokiselinske ostatke u proteinima). Lakaze katalizuju formiranje fenoksil radikala jednoelektronskom oksidacijom fenolnih hidroksilnih grupa sa kiseonikom kao akceptorom elektrona.

Lakaze reaguju sa velikim brojem supstrata što ih čini pogodnim za primenu u različitim biotehnološkim procesima.

U poslednje vreme sve više se ispituje mogućnost primene lakaza u industriji hrane radi poboljšanja reoloških osobina hrane. Pokazano je da lakaze umrežavaju arabinoksilan i pektin preko ferulne kiseline koja se esterifikuje u biopolimerima (Figuerola-Espinoza, M. C. and Rouau, X. 1999; Labat, E., Morel, M. H. et al. 2000). Takođe, lakaza može da umrežava i peptide i proteine (Faergemand, M., Otte, J. et al. 1998; Lantto, R., Puolanne, E. et al. 2005; Mattinen, M. L., Kruus, K. et al. 2005; Mattinen, M. L., Hellman, M. et al. 2006).

Mada je pokazano da lakaza direktno oksiduje ostatke i tirozina i cisteina (Mattinen, M. L., Kruus, K. et al. 2005), smatra se da se veze u proteinima formiraju uglavnom između ostataka tirozina (Mattinen, M. L., Hellman, M. et al. 2006). Radikalni posredovana oksidacija slobodnih sulfhidrilnih grupa proteina se ubrzava u reakcijama katalizovanim lakazom u prisustvu dodatnih fenolnih kiselina (Figuroa-Espinoza, M. C. and Rouau, X. 1999). Dalje, pokazano je da lakaza formira veze između fenolnih kiselina i tripeptida i proteina koji sadrže tirozin (Mattinen, M. L., Kruus, K. et al. 2005).

Lakaza takođe može oksidovati proteine dovodeći do njihove polimerizacije i fragmentacije (Mattinen, M. L., Hellman, M. et al. 2006; Selinheimo, E., Lampila, P. et al. 2008). Fragmentacija proteina, primećena prilikom oksidacije proteina mesa katalizovane lakazom, pripisana je nastanku slobodnih radikala samih proteina nastalih dejstvom lakaze (Lantto, R., Puolanne, E. et al. 2005). Umrežavanje proteina koji sadrže tirozin odvija se preko tirozil radikala, pri čemu se prvenstveno formiraju inter- i intramolekulske izoditirozinske veze, kao i mali broj ditirozinskih veza (Mattinen, M. L., Kruus, K. et al. 2005). Formiranje disulfidnih veza, oksidacijom cisteina u cistin, je takođe način na koji lakaza može dovesti do umrežavanja proteina. Oksidacija proteina radikalima može dovesti do više tipova oksidativnih modifikacija pored umrežavanja i fragmentacije. Stoga korišćenje lakaze za ciljani inženjering proteina zavisi od toga da li se mogu predvideti modifikacije datog proteina (poznate strukture i aminokiselinskog sastava) nastale dejstvom lakaze.

2.7.1.2. Tirozinaze

Tirozinaze (monofenol oksidaze) su bifunkcionalni enzimi koji katalizuju orto-hidroksilaciju monofenola (uključujući ostatke tirozina u u proteinima) i zatim oksidaciju difenola do hinona (Lerch, K. 1983). Ove fenol oksidaze su uključene u biosintezu melaninskih pigmenata kože i kose sisara (tirozinaze), kao i u enzimsko tamnjenje hrane biljnog porekla. Tirozinaza iz pečuraka *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach komercijalno je dostupna i ispitivana je njena primena za modifikacije proteina (Seo, S. Y., Sharma, V. K. et al. 2003; Selinheimo, E., Lampila, P. et al. 2008).

Tirozinaze katalizuju oksidaciju fenolnog jezgra tirozina do di-hinona preko intermedijera 3, 4-dihidroksi-L-fenilalanina (L-DOPA). Formirani di-hinoni su prekursori za formiranje smeše melaninskih pigmenata (Sanchez-Ferrer, A., Rodriguez-Lopez, J. N. et al. 1995; Rescigno, A., Sollai, F. et al. 2002). Takođe, ovi intermedijeri mogu reagovati i sa drugim jedinjenjima, npr. ostacima aminokiselina koji sadrže sulfhidrilne, amino, amido, indolne ili fenolne grupe, što dovodi do formiranja novih kovalentnih veza između proteina i njihovog umrežavanja (Ito, S., Kato, T. et al. 1984; Burzio, L. A. and Waite, J. H. 2000; Mattinen, M.-L., Hellman, M. et al. 2008).

Pokazano je i da tirozinaza može da polimerizuje i kratke peptide GYG i EGVYVHPV, kao i α - i β - kazeine (Selinheimo, E., NiEidhin, D. et al. 2007; Mattinen, M.-L., Hellman, M. et al. 2008). Polimerizacija u ovim slučajevima se odvija preko formiranja kovalentnih hemijskih veza.

Do sad nije detaljno ispitana mogućnost umrežavanja većine proteina tirozinazama. Reakcije umrežavanja zavise od dostupnosti tirozina u proteinu, kao i reakcionih uslova: pH vrednosti, temperature, pufera i prisustva fenolnih jedinjenja. U zavisnosti od reakcionih uslova mogu se dobiti čak i obojeni proizvodi (u nijansama od ružičaste do crne) (Ito, S., Kato, T. et al. 1984; Sanchez-Ferrer, A., Rodriguez-Lopez, J. N. et al. 1995; Bittner, S. 2006), što upućuje na formiranje različitih tipova veza. Potencijalno menjanje boje prilikom tretmana tirozinazama može ograničiti upotrebu ovih enzima u industriji hrane.

3. Ciljevi istraživanja

Cilj istraživanja u okviru ove teze bio je da se utvrdi alergeni potencijal proteina mleka i kikirikija nakon njihovih enzimskih obrada.

Dobijeni rezultati grupisani su u četiri celine:

1. ispitivanje alergnog potencijala ekstrakta kikirikija nakon tretmana tirozinazama i glavnog alergena mleka, kazeina, nakon tretmana tirozinazom i lakazom *in vitro* i *ex vivo* testovima;
2. ispitivanje alergnog potencijala ekstrakta kikirikija tretiranog tirozinazama i ekstrakta kikirikija tretiranog lakazom u *in vivo* mišjem modelu alergije na kikiriki;
3. ispitivanje uticaja proteolize Ara h 2, glavnog alergena kikirikija, endogenom proteazom prisutnom u kikirikiju na molekulske osobine i vezivanje IgE antitela;
4. ispitivanje pepsinske hidrolize mleka u *in vivo* uslovima na očuvanje alergnog potencijala proteina mleka.

4. Alergenost enzimski procesovanih alergena kikirikija i mleka u in vitro i ex vivo testovima

4.1. Alergenost enzimski procesovanih alergena kikirikija u in vitro i ex vivo testovima

4.1.1. Uvod

Povećanje poremećaja vezanih za ishranu, uključujući alergije na hranu, u industrijalizovanim zemljama je povezano sa promenama u navikama u ishrani i konzumiranjem sve više prerađene hrane (Nowak-Wegrzyn, A. and Fiocchi, A. 2009). Prerada hrane može promeniti alergenost proteina. Međutim, do sada, nema dostupnih kriterijuma koji bi se mogli koristiti za pouzdano predviđanje uticaja obrade hrane na alergenost proteina (Martos, G., Lopez-Exposito, I. et al. 2011). Efekti prerade hrane na alergeni potencijal proteina hrane mogu uključiti kako senzitivizaciju, tako i efektorne faze alergije na hranu, promenom stabilnosti alergena i konformacije, digestibilnosti u gastrointestinalnom traktu, kao i promenom puta preuzimanja u mukozi i agregaciju prehrambenih alergena (Buchert, J., Ercili Cura, D. et al. 2010; Martos, G., Lopez-Exposito, I. et al. 2011).

Na primer, pokazano je da zagrevanje, pasterizacija i druge metode prerade hrane imaju različite efekte na alergene, čak i kada su sadržani u istom složenom matriksu (Roth-Walter, F., Berin, M. C. et al. 2008; Nowak-Wegrzyn, A. and Fiocchi, A. 2009; Stanic-Vucinic, D., Stojadinovic, M. et al. 2012). Zagrevanje uglavnom smanjuje alergenost proteina narušavanjem konformacionih epitopa (Bublin, M., Radauer, C. et al. 2008). Nasuprot tome, kod kikirikija i škampa, glikacija Maillard-ovom reakcijom indukovanom

toplotom može da poveća alergenost (Nowak-Wegrzyn, A. and Fiocchi, A. 2009), dok sonikacijom indukovane strukturne promene alergena surutke nisu uticale na alergenost proteina (Aboumahmoud, R. and Savello, P. 1990; Tantoush, Z., Stanic, D. et al. 2011; Stanic-Vucinic, D., Stojadinovic, M. et al. 2012).

U ovoj studiji ispitan je uticaj tretmana dvema tirozinazama da molekulske osobine alergena kikirikija, kao i na sposobnost vezivanja IgE antitela i aktivacijuc bazofila.

4.1.2. Materijal i metode

4.1.2.1.1. Hemikalije i standardi

Ukoliko nije drugačije navedeno, sve hemikalije je proizvela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD) i bile su analitičke čistoće ili bolje.

4.1.2.1.2. Priprema ekstrakata kikirikija

Proteini kikirikija su ekstrahovani prema Radosavljević et al. (Radosavljevic, J., Dobrijevic, D. et al. 2010) sa modifikacijama: pre ekstrahovanja, sirovi kikiriki je odmašćen petroletrom i 50 mM amonijum bikarbonat je korišćen za ekstrakciju. Nakon ekstrakcije proteini kikirikija su liofilizovani.

4.1.2.1.3. Umrežavanje proteina

Za umrežavanje ekstrakta kikirikija korišćene su tirozinaza iz *Trichoderma reesei* (dajući umreženi ekstrakt kikirikija označen kao TT) i tirozinaza iz *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach (dajući umreženi ekstrakt kikirikija označen kao TA). Neumreženi proteini kikirikija označeni su sa PE.

Tirozinaza iz *Trichoderma reesei* je prečišćena i okarakterisana kao što je opisano ranije (Selinheimo, E., Saloheimo, M. et al. 2006; Selinheimo, E., Autio, K. et al. 2007). Tirozinaza iz *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach je proizvedena u kompaniji Fluka/Sigma (Seelze, Nemačka). Enzimska aktivnost tirozinaza (1900 nkat/mL za *T. reesei* i 320 nkat/mL za *A. bisporus* (Lange) Imbach) je

određena korišćenjem L-DOPA (3,4-dihidroksi-L-fenilalanin) kao supstrata (Selinheimo, E., Autio, K. et al. 2007).

Eksperimentalni uslovi koji se koriste za umrežavanje PE su preliminarno testirani u cilju obezbeđivanja najvećeg stepena umreženosti. Liofilizat ekstrakta kikirikija je rastvoren u 100 mM fosfatnom puferu pH 7.0 za produkciju TA, ili u 100 mM fosfatnom puferu pH 8.0 za produkciju TT. Koncentracija proteina kikirikija je podešena na 5 mg/mL. Korišćeno je po 1000 nkat svakog od enzima po 1 g proteina. Reakcija je trajala 24 h na 37 ° C uz mešanje, nakon čega je dobijeni materijal je dijalizovan 72 sata uz tri izmene amonijum-bikarbonatnog pufera (50 mM, pH 8.0) na 4 °C i liofilizovan.

4.1.2.1.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija i elektroforetska analiza dobijenog materijala

Rastvori koji sadrže 1 mg/mL proteina u PBS-u (određeno BCA testom prema literaturi (Smith, P. K., Krohn, R. I. et al. 1985) su osušeni na vazduhu i prekriveni zlatom katodnim prskanjem (LEICA SCDO05, Leica Microsystems, Nemačka). Morfologija materijala je analizirana skenirajućim elektronskim mikroskopom (JSM-6610LV, Jeol, Peabodi, MA, SAD). Posmatranje je urađeno pod sledećim uslovima: uvećanje 20000x, 30 kV, VD = 7 i signala= SEI.

SDS-PAGE (natrijum-dodecil sulfat elektroforeza na poliakrilamidnom gelu) na 8 i 12% gelovima se izvodi u skladu sa referencom (Laemmli, U. K. 1970) i gelovi su obojeni bojom Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva Elektroforeza GmbH, Heidelberg, Nemačka). Za upoređivanje uzoraka u opsegu većih molekulskih masa, izvedena je elektroforeza na 1% agaroznom gelu, sa molekulskim markerima napravljenim od miofibrilarnih proteina miša (Warren, C. M., Krzesinski, P. R. et al. 2003). U svim elektroforetskim analizama 40 µg proteina (određeno BCA testom) je naneto po bunaru.

4.1.2.1.5. Inhibitorna ELISA sa poliklonskim antitelima

Inhibitorni ELISA testovi sa poliklonskim zečjim serumima na pojedinačne alergene su izvedene kao što je prethodno opisano, uz modifikacije (Schmitt, D. A., Cheng, H. et al. 2004). Ukratko, ploče su preko noći inkubirane sa proteinima kikirikija (5 µg/mL) i blokirane sa 1% BSA u TTBS-u tokom 2 h. Umreženi proteini kikirikija su pripremljeni u desetostrukim serijskim razblaženjima (opseg od 1-10⁻⁷ mg/mL (suva masa/zapremina)) i inkubirani 1 sat sa poliklonskim zečjim antitelima na Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 i Ara h 6 na sobnoj temperaturi. Preinkubirana antitela su sipana u pločicu, inkubirana 1 h i isprana. Zatim su ploče inkubirane sa kozijim anti-zečjim antitelima obeleženim sa alkalnom fosfatazom (AP) tokom 1 h i ELISA je vizualizovana sa *p*-nitrofenilfosfatom. Absorbanca na 405 nm je merena 2 h posle dodavanja supstrata.

Procenat inhibicije (% inhibicije) je izražen kao: $((A_{405} \text{ neinhibiranog uzorka} - A_{405} \text{ inhibiranog uzorka}) / A_{405} \text{ neinhibiranog uzorka}) \times 100\%$.

Primarna poliklonska IgG antitela na alergene kikirikija, proizvedena u zečevima, poklon su dr Maarten Pennings-a, Univerzitetski medicinski centar u Utrehtu, u Holandiji.

4.1.2.1.6. Anti-IgE inhibitorna ELISA

Koncentracije proteina u ekstraktu kikirikija i umreženim ekstraktima kikirikija podešene su da budu 1,5 mg/mL prema BCA testu (prema literaturi (Smith, P. K., Krohn, R. I. et al. 1985)).

Za ELISA inhibiciju je korišćena je smeša seruma od pacijenata alergičnih na kikirikiki. Dobijena je mešanjem jednakih zapremina seruma 14 osoba sa ukupnim nivoima IgE antitela na kikiriki: 24.2 kU/L, 86.5 kU/L, 18.6 kU/L, 14.0 kU/L, 5,5 kU/L, > 100 kU/L, 4.9 kU/L, 42.2 kU/L, > 100 kU/L, 2.3 kU/L, < 0,35 kU/L, 1.0 kU/L, 10.01 kU/L, 22.0 kU/L. Ekstrakt kikirikija i umreženi ekstrakti kikirikija pripremljeni su u desetostrukim serijskim razblaženjima i prethodno inkubirani tokom 1 h sa smešom serumu finalno razblaženom 60 puta.

Inhibitorna ELISA je izvedena kao što je prethodno opisano (Koppelman, S. J., Vlooswijk, R. A. et al. 2001). Ukratko, ELISA ploče su preko noći inkubirane sa proteinima kikirikija u PBS-u. Nakon ispiranja i blokiranja sa 1% BSA u PBS sa 0.1% Tween 20, serumi inkubirani sa PE, TA ili TT su naneti na ploču i inkubirani tokom 2 časa. Nakon toga, ploče su isprane i inkubirane sa kozjim-anti-humani IgE-HRP konjugovanim antitelima (Pharmingen, San Diego, SAD) tokom jednog sata. ELISA je vizualizovana sa rastvorom tetrametilbenzidin (TMB) supstrata i zaustavljena posle 15 min sa 1 M H₂SO₄ i izmerena je apsorbancu na 450 nm. Procenat inhibicije (% inhibicije) je izražen kao: $((A_{450} \text{ neinhibiranog uzorka} - A_{450} \text{ inhibiranog uzorka}) / A_{450} \text{ neinhibiranog uzorka}) \times 100\%$.

4.1.2.1.7. Test aktivacije bazofila

Test aktivacije bazofila sa PE i umreženim uzorcima su izvedeni kao što je opisano u literaturi (Stanic, D., Monogioudi, E. et al. 2010). Heparinizovani uzorci krvi uzeti su od tri pacijenta alergična na kikiriki. Pacijenti su odabrani na osnovu pozitivnih kožnih proba, dokumentovane kliničke istorije alergije na kikiriki i pozitivnim *in vitro* testiranjem. Nivoi IgE su određeni na ImmunoCAP® 100 sistemu koji koristi ImmunoCAP® kod f13 (Pharmacia Diagnostics, Upsala, Švedska). Nivoi su smatrani pozitivnim ukoliko su bili iznad 0.35 kU/L. IgE nivoi na kikiriki kod tri testirana pacijenta su bili: 56.6 kU/L, 4.72.5 kU/L i 1.1 kU/L.

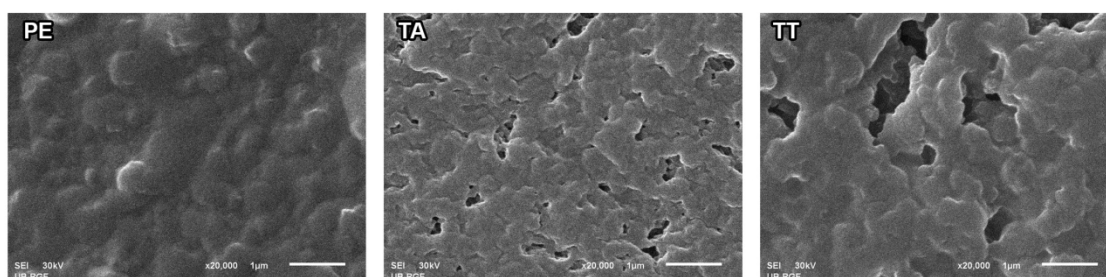
4.1.2.1.8. Digestija pepsinom

Digestija proteina pepsinom je izvedena u 0.1 M HCl sa 2 g/L natrijum hlorida, na pH 1.2, finalnom koncentracijom proteina od 0.25 mg/mL (određeno BCA testom) i aktivnošću pepsina 2300 U/mL (1 mg/mL) (Thomas, K., Aalbers, M. et al. 2004). Alikvoti su uzeti u 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 i 180 min, a reakcije su zaustavljene dodavanjem 2 M natrijum karbonata. pH vrednost posle dodavanja 2 M natrijum karbonata iznosila je 8.1. Pepsinolitički profili su analizirani na 12% SDS-PAGE pod redukujućim uslovima.

4.1.3. Rezultati

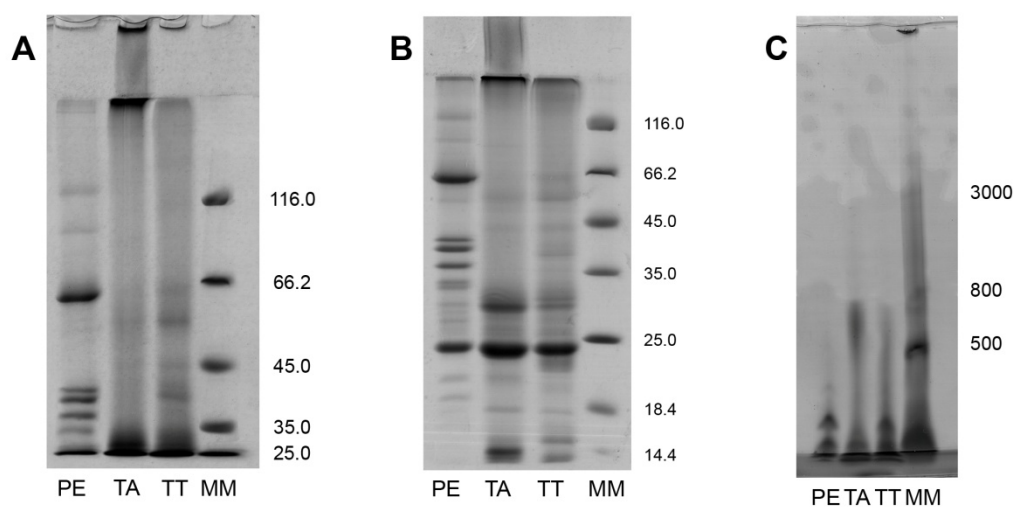
4.1.3.1. Veličina i agregacija umreženih proteina kikirikija

Elektroforetska i SEM karakterizacija umreženog materijala pokazala je da tretman obema tirozinazema povećava agregaciju proteina kikirikija, ali tretman tirozinazom iz *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach je bio efikasniji od tirozinaze iz *Trichoderma reesei*. Ispitivanje SEM-om umreženog PE-a pokazalo je da je ovaj materijal više agregiran u odnosu na ekstrakt kikirikija (Slika 3).



Slika 3: Skenirajuća elektronska mikroskopija uzoraka PE, TA i TT

SDS-PAGE analiza na 8% (Slika 4A) i 12% gelu (Slika 4B) je pokazala da je dobijeni materijal značajno osiromašen trakama koje odgovaraju glavnim alergenima kikirikija: Ara h 1 (oko 60 kDa), Ara h 2 (dublet od 16 i 18 kDa), Ara h 3 (višestruke trake od 10-50 kDa) i Ara h 6 (oko 15 kDa).

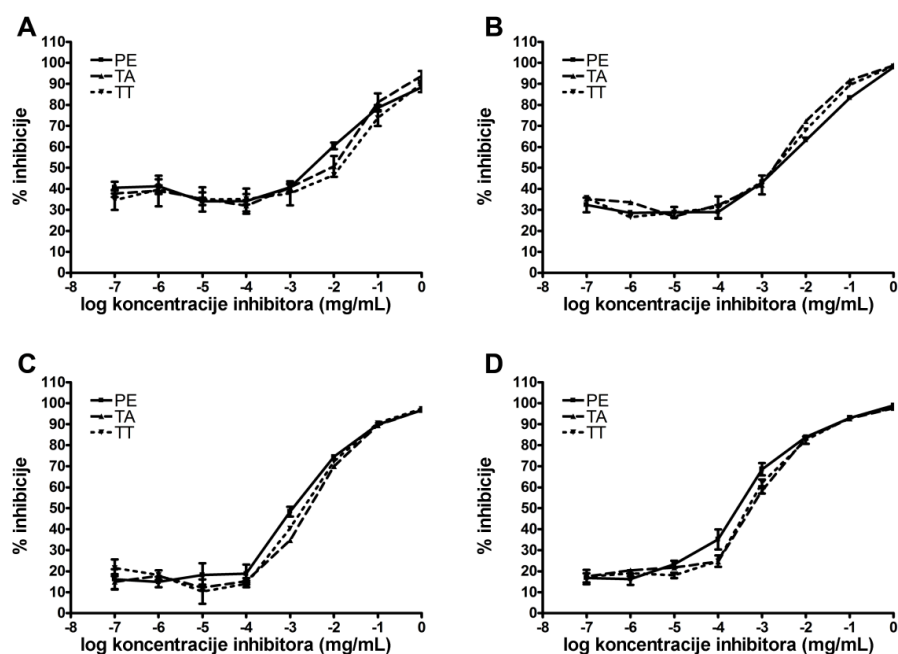


Slika 4: Elektroforetska analiza uzoraka PE, TA i TT na: A) 8% gelu; B) 12% gelu i C) 1% agaroznom gelu

Agarozna elektroforeza (Slika 4C) pokazala je da i TA i TT uzorci sadrže materijal proteine veće molekulske mase od nativnog ekstrakta kikirikija. U poređenju sa netretiranim proteinima kikirikija, TA je ekstenzivno umrežen, sa dominantnim proteinskim molekulskim masama u rasponu preko 500 kDa do 3000 kDa, sa većinom proteina od oko 700 kDa. TT uzorak sadrži proteine molekulske mase do 800 kDa, sa većinom proteina oko 500 kDa.

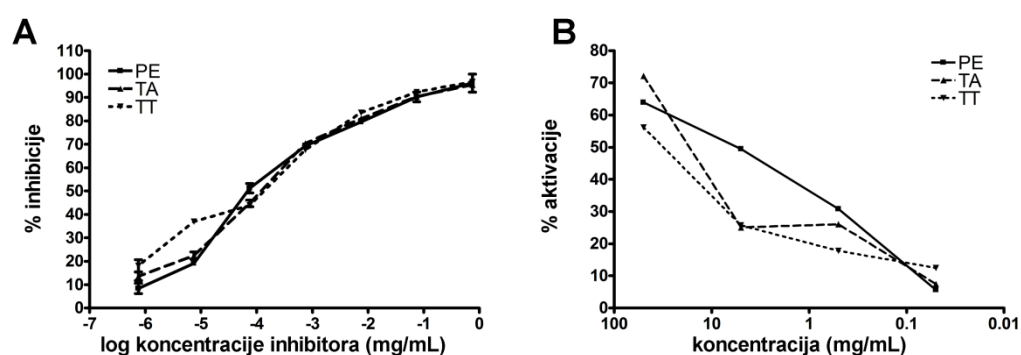
4.1.3.2. Molekulske osobine i IgE vezujući epitopi umreženih proteina kikirikija

Kako bismo obezbedili dublji uvid u imunogene osobine materijala dobijenog delovanjem tirozinaza, ispitivana je sposobnost materijala da inhibiraju anti Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 i Ara h 6 antitela (Slika 5). U svim slučajevima, krive inhibicije nativnih proteina kikirikija, TA i TT imaju isti oblik i uporedive trendove, pokazujući da nema razlike u vezivanju za poliklonska IgG antitela. Znači, alergeni kikirikija nisu intenzivno modifikovani na način koji može da se naruši 3D strukturu ili promeni površinu izraženim kovalentnim modifikacijama.



Slika 5: Inhibitorna ELISA sa PE, TA i TT : A) sa anti-Ara h 1 antitelima; B) anti-Ara h 2 antitelima; C) anti-Ara h 3 antitelima i D) anti-Ara h 6 antitelima. Prikazane su srednje vrednosti \pm SD

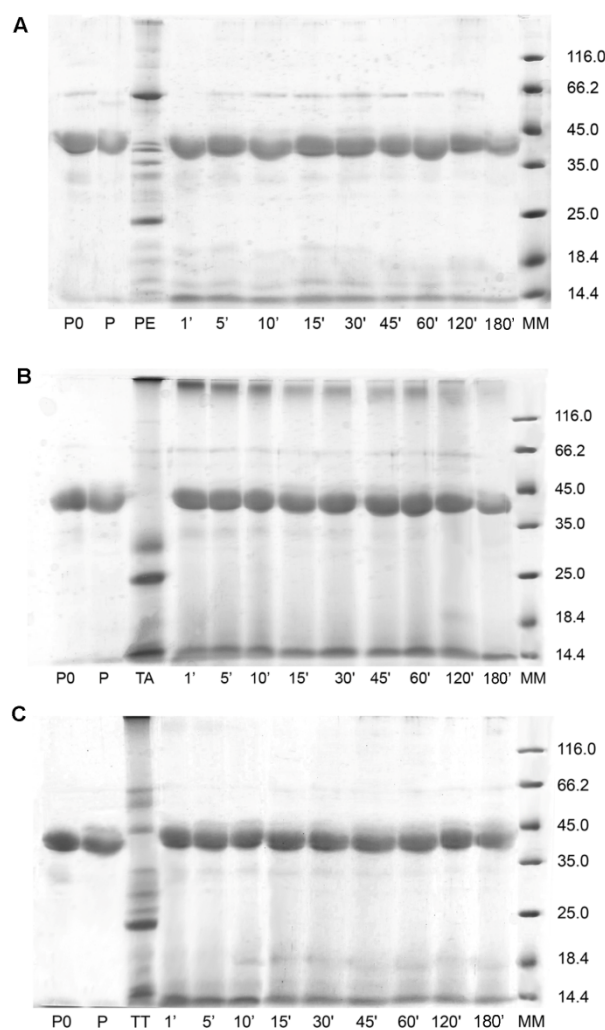
Da bi smo dokazali da tretman tirozinazama ne menja IgE-vezujuće epitope proteina, uradili smo inhibiciju vezivanja humanog IgE za proteine kikirikija (Slika 6A). Rezultati su pokazali da ekstrakti dobijeni tretmanom pomoću ova dva enzima sa istom sposobnošću vezuju IgE. Zadržavanje sposobnosti preparata kikirikija da izazovu degranulaciju bazofila je takođe ispitano. Nakon umrežavanja IgE antitela od strane alergena, bazofili regulišu nivoe površinskih markera CD203c i CD63. CD63 marker, kao mera anafilaktičke degranulacije bazofila, je pojačano eksprimiran nakon inkubacije sa sva tri testirana uzorka. Dakle, sposobnost proteina kikirikija umreženih tirozinazama da *ex vivo* aktiviraju humane bazofile je očuvana i uporediva je sa potencijalom netretiranih proteina kikirikija (Slika 6B).



Slika 6: Zadržavanje kapaciteta vezivanja humanog IgE za dobijeni materijal: a) inhibitona ELISA sa smešom humanih seruma (n=14), B) test aktivacije bazofila. Prikazane su srednje vrednosti \pm SD.

4.1.3.3. *In vitro* pepsinska digestibilnost umreženih proteina kikirikija

Podložnost digestiji pepsinom umreženih proteina kikirikija analizirana je pomoću SDS-PAGE.



Slika 7: Pepsinoliza uzoraka: A) PE; B) TA i C) TT. Po - pepsin u trenutku t=0 min, P – pepsin u 180 min, PE, TA, TT – kontrole uzoraka. MM – molekularni markeri.

Dobijeni proteinski profili (Slika 7) pokazali su da se uzorci različito ponašaju: TT materijal je imao elektroforetski profil uporediv sa nemonifikovanim proteinima kikirikija. Međutim, digestija TA uzorka pokazala je da prilikom pepsinolize proteinski fragmenti molekulske mase veće od 116 kDa preživljavaju tokom dvočasovnog perioda digestije.

4.1.4. Diskusija

Ovi eksperimenti pokazuju da proteini kikirikija umreženi tirozinazama poseduju alergena i imunološka svojstva slična polaznom materijalu. Umrežavanje utiče na veličinu i agregaciju proteina kikirikija i umereno menja digestibilnost proteina. Mnoge studije sa umreženim proteinima hrane su pokazale da se delovanjem različitih enzima alergeni proteini mogu promeniti tako da se smanji vezivanje za IgE (Chung, S. Y., Kato, Y. et al. 2005; Clare, D. A., Gharst, G. et al. 2006; Bublin, M., Radauer, C. et al. 2008; Stanic, D., Monogioudi, E. et al. 2010; Tantoush, Z., Stanic, D. et al. 2011; Stanic-Vucinic, D., Stojadinovic, M. et al. 2012). Materijali dobijen dejstvom tirozinaza na proteine kikirikija u našim eksperimentima nisu pokazali izraženu promenu u vezivanju IgE antitela, što je u saglasnosti sa prethodnim studijama koje pokazuju umerene efekte na vezivanje IgE: tretman proteina kikirikija polifenol oksidazom (tirozinaza) u prisustvu kafeinske kiseline, kao i transglutaminazom doveo je do formiranja umreženih proteina visoke molekulske mase bez uticaja na alergenost (Chung, S. Y., Kato, Y. et al. 2005; Clare, D. A., Gharst, G. et al. 2006). Glavni alergeni kikirikija poseduju mnoge linearne epitope (Burks, A. W., Shin, D. et al. 1997; Stanley, J. S., King, N. et al. 1997; Rabjohn, P., Helm, E. M. et al. 1999), tako da čak i velike konformacione promene indukovane preradom verovatno manje utiču na vezivanje IgE antitela za te regione. Pokazali smo da unakrsno povezani PE dobijeni posle tretmana tirozinazama imaju slično vezivanje (u poređenju sa nativnim PE) za poliklonski serum na glavne alergene kikirikija. Dakle, tretman proteina kikirikija tirozinazama očuvao je alergena svojstva glavnih alergena tj. sposobnost da veže IgE i aktivira degranulaciju bazofila.

Ekstrakt kikirikija umrežen tirozinazama pokazao je drugačiji stepen agregacije i stabilnost na digestiju pepsinom u odnosu na netretirani ekstrakt. TA uzorak je pokazao veći stepen agregacije i duže vreme opstanka fragmenata veće molekulske mase u *in vitro* digestiji pepsinom. Sa druge strane, TT uzorak je imao agregate manje molekulske mase i digestovan je na sličan način kao i netretirani proteini kikirikija. Stoga se može očekivati da se ova dva uzorka

drugačije ponašaju u GIT-u i na kraju izazovu drugačiji imunski odgovor u poređenju sa netretiranim proteinima kikirikija. Međutim, razlike u digestiji pepsinom umreženih proteina mogle bi biti umanjene ili čak potpuno zanemarene zbog sklonosti alergena kikirikija da se agregiraju nakon enzimske digestije. Ranije je pokazano da se najzastupljeniji glavni alergen kikirikija Ara h 1 lako digestuje pod fiziološkim uslovima (Koppelman, S. J., Hefle, S. L. et al. 2010). Međutim, proizvodi Ara h 1 nastali digestijom pepsinom zadržavaju potencijal da senzitišu u modelu sa norveškim braon pacovima (Bogh, K. L., Kroghsbo, S. et al. 2009), ali tu funkciju gube nakon frakcionisanja peptida nastalih dejstvom pepsina. Dakle, očuvan kapacitet za senzitivaciju digestovanog Ara h 1 je posledica agregiranja pepsinskih peptida, što očuvava strukturu nalik na intaktni molekul.

Ovi eksperimenti pokazali su da enzimski tretman ekstrakta kikirikija dvema različim tirozinazama proizvodi kovalentno agregirane i umrežene proteine velike molekulske mase uz očuvanje molekulskih i IgE-vezujućih svojstava alergena kikirikija. Takođe, ovakav vid umrežavanja proteina nije izmenio sposobnost proteina kikirikija da aktiviraju bazofile alergičnih pacijenata.

4.2. Alergenost enzimski procesovanih alergena mleka u *in vitro* i *ex vivo* testovima

4.2.1. Uvod

U prehrambenoj industriji enzimsko umrežavanje se često koristi za stabilizaciju strukture hrane, pogotovo mesnih i mlečnih proizvoda (Buchert, J., Ercili Cura, D. et al. 2010). Trenutno je u komercijalnoj upotrebi primena transglutaminaze za umrežavanje proteina u industriji hrane. Onaj enzim formira izopeptidne veze između ostataka glutamina i lizina na proteinu. Osim transglutaminaze, ispituju se još i moguće primene oksidativnih enzima kao što su tirozinaza i lakaza za umrežavanje proteina (Buchert, J., Ercili Cura, D. et al. 2010). Lakaza i tirozinaza deluju uglavnom na ostatke tirozina u proteinu, kao i na druga fenolna jedinjenja, formirajući veze između proteina, polisaharida i proteina i polisaharida (Selinheimo, E., Lampila, P. et al. 2008). Pokazano je da fenoli male molekulske mase poboljšavaju efikasnost umrežavanja ne samo lakazom, već i tirozinazom (Selinheimo, E., Lampila, P. et al. 2008).

Pokazano je da umrežavanje proteina enzimima utiče i na alergena svojstva proteina (Buchert, J., Ercili Cura, D. et al. 2010). Međutim, nije objavljeno mnogo studija koje ispituju uticaj različitih enzima na alergenost proteina. U slučaju proteina kikirikija koji su tretirani peroksidazom, dobijeni agregati su pokazali manje vezivanje IgE antitela nego netretirani proteini kikirikija, obezbeđujući primenu ovog enzima za proizvodnju hipoalergenih formula (Chung, S. Y., Maleki, S. J. et al. 2004; Chung, S. Y., Kato, Y. et al. 2005). Međutim, primena transglutaminaze za umrežavanje proteina kikirikija nije imala značajan uticaj na vezivanje IgE antitela (Clare, D. A., Gharst, G. et al. 2006; Clare, D. A., Gharst, G. et al. 2008). Takođe, tretman glijadina sa transglutaminazom u studiji sa velikim brojem pacijenata alergičnih na pšenicu pokazao je čak suprotno; da dolazi do značajnog povećanja vezivanja IgE antitela nakon tretmana sa ovim enzimom (Palosuo, K., Varjonen, E. et al. 2003). Umrežavanje proteina kikirikija polifenol oksidazom u prisustvu

kafeinske kiseline smanjuje potencijal za vezivanje IgE-a (Chung, S. Y., Kato, Y. et al. 2005).

β -kazein goveđeg mleka predstavlja ozbiljnu zdravstvenu pretnju kod pacijenata sa alergijom na kravlje mleko, jer biva prepoznat od strane IgE antitela kod više od 50% pacijenata sa alergijom na mleko (Docena, G. H., Fernandez, R. et al. 1996; Shek, L. P. C., Bardina, L. et al. 2005). Alergija na mleko je česta kod dece, a u populaciji odraslih je slabo zastupljena (Lam, H. Y., van Hoffen, E. et al. 2008).

Kazein je protein veoma fleksibilne trodimenzionalne strukture i čini oko 80% ukupne količine proteina mleka (Nieuwenhuizen, W. F., Dekker, H. L. et al. 2003; Monaci, L., Tregouat, V. et al. 2006). Lako se umrežava različitim enzimima zbog neuređene strukture (Lorenzen, P. C., Schlimme, E. et al. 1998; Schorsch, C., Carrie, H. et al. 2000).

U ovoj studiji ispitivan je potencijal kazeina modifikovanog dvema tirozinazama - iz *Trichoderma reesei* i *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach i lakazom iz *Trametes hirsuta* (Wulfen) Pilát da se veže za humani IgE i aktivira bazofile osoba alergičnih na mleko.

4.2.2. Materijal i metode

Ukoliko nije drugačije navedeno, sve hemikalije je proizvela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD) i bile su analitičke čistoće ili bolje.

4.2.2.1.1. Umrežavanje kazeina

Kazein je rastvoren u 50 mM natrijum fosfatnom puferu, pH 8.0 (1.7 mg/mL), i inkubiran sa lakazom iz *Trametes hirsuta* (Wulfen) Pilát (1000 nkat/g kazeina) – modifikat LC-CAS, tirozinazom iz *Trichoderma reesei* (1000 nkat/g kazeina) – modifikat TT-LAC i tirozinazom iz *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach (1000 nkat/g kazeina) – modifikat TA-LAC. Za umrežavanje lakazom i tirozinazom iz *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach dodata je kafeinska kiselina kao medijator (1 mM). Enzimske reakcije su izvedene na 40 °C u tokom 24 h, uz stalno mešanje.

Sve reakcije su zaustavljene zamrzavanjem (-20 °C). Kontrole bez enzima urađene su paralelno. Sve reakcije su urađene u duplikatu.

4.2.2.1.2. Inhibicija vezivanja IgE antitela

Serumi pacijenata alergičnih na kravljje mleko sa 0.5-57 kU/L IgE su sakupljeni za CAP inhibiciju. Dvadeset pet mikrolitara uzorka je pomešano sa 225 µL smeše humanih seruma tako da finalna koncentracija proteina bude 100 µg/mL i nivo IgE 11.5 kU/L. Posle inkubacije tokom noći na 4 °C, CAP rezultati su mereni na ImmunoCAP® 100 sistemu (Pharmacia Diagnostics, Upsala, Švedska) koristeći nBos d 8 kazein kod f78.

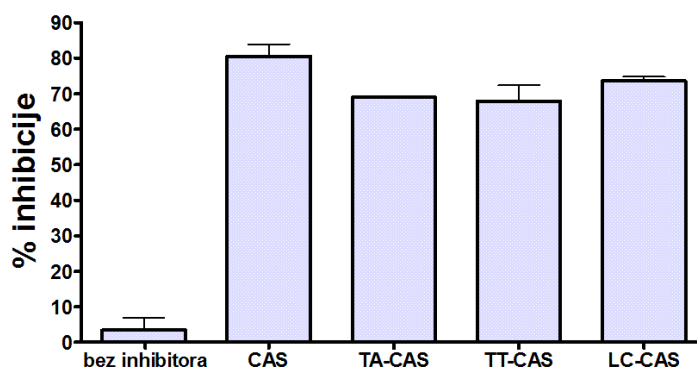
4.2.2.1.3. Test aktivacije bazofila

Heparinizovani uzorci krvi (100 µL) inkubirani sa serijskim razblaženjima kazeina i umreženog kazeina (50, 5, 0.5 i 0.05 µg/mL), anti-IgE antitelom kao pozitivnom kontrolom (1 mg/mL), ili PBS-om kao negativnom kontrolom tokom 15 min (37 °C). Posle inkubacije, ćelije su isprane sa PBS-om i potom inkubirane sa 10 µL CD203c monoklonskim antitelom 97A6 obeleženim fikoeritriinom (Immunotech) i CD63 monoklonskim antitelom obeleženim FITC-om (Immunotech) tokom 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga, uzorci su podvrgnuti lizi eritrocita sa 2 mL FACS™ rastvorom za lizu (BDBiosciences, SAD). Ćelije su zatim isprane, resuspendovane u PBS-u i analizirane protočnom citometrijom upotrebom FACSCalibura (BD Biosciences). Marker bazofila CD203c je korišćen za identifikaciju populacije. Sekrecija granula je analizirana iz prikupljenih ćelija korišćenjem anti-CD63 antitela. Aktivacija bazofila je izračunata kao procenat CD63⁺ događaja od ukupnih bazofila (CD63⁺/CD203c⁺ ćelije). Rezultati su izraženi na sledeći način: (aktivacija bazofila uzorkom/aktivacija bazofila u pozitivnoj kontroli (anti-IgE)) x 100.

4.2.3. Rezultati

4.2.3.1. Uticaj umrežavanja kazeina na vezivanje IgE antitela

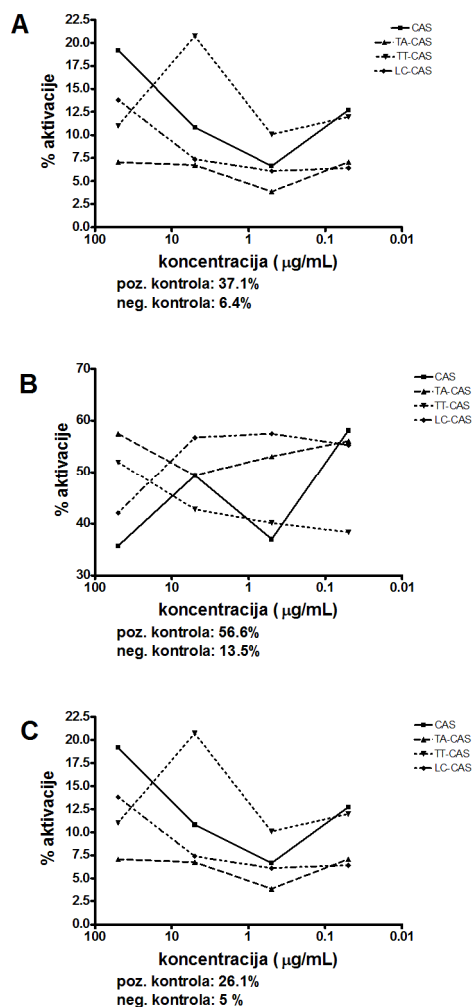
Umreženi kazein vezuje veliki deo specifičnih IgE antitela u smeši seruma pacijenata alergičnih na mleko. U prisustvu visokih koncentracija proteina koje su korišćene, prirodni protein postiže skoro maksimalnu inhibiciju vezivanja IgE (80%) za diskove sa kazeinom (Slika 8).



Slika 8: Inhibicija vezivanja IgE antitela za kazein na diskovima na ImmunoCap® uređaju u prisustvu modifikovanih kazeina.

U prisustvu TA-CAS i TT-CAS vezivanje IgE antitela je smanjeno u *in vitro* testu za 14 i 16%, u poređenju sa kontrolom kazeina.

4.2.3.2. Uticaj umrežavanja kazeina na aktivaciju bazofila



Slika 9: Aktivacija bazofila triju osoba alergičnih na mleko umreženim kazeinima

Kada je analiziran odgovor bazofila pacijenata na serijska razblaženja alergena i umreženih alergena, odgovor je varirao pojedinačno od pacijenta do pacijenta (Slika 9). Pacijenti su se razlikovali u specifičnostima prema različitim alergenima, i bazofili visoko reaktivnog pacijenta mogli su biti aktivirani čak i najmanjom koncentracijom alergena (0.05 µg/mL). Malo smanjenje u funkcionalnim svojstvima kazeina modifikovanog lakazom je primećeno kod dva od tri pacijenta za sve koncentracije alergena. Kod ta dva pacijenta, odgovor na LC-CAS uporediv je sa odgovorom negativne kontrole.

4.2.4. Diskusija

Umrežavanje proteina oksidativnim enzimima, pogotovo tirozinazama, je posebno izučavano poslednjih godina (Ito, S., Kato, T. et al. 1984; Seo, S. Y., Sharma, V. K. et al. 2003). Pokazano je da je tirozinaza iz *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach manje efikasna u umrežavanju proteina od tirozinaze iz *Trichoderma reesei* (Marumo, K. and Waite, J. H. 1986; Mattinen, M. L., Lantto, R. et al. 2008). Takođe, pokazano je da tirozinaza iz *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach nije u stanju da efikasno umreži kazein bez kafeinske kiseline kao medijatora (Mattinen, M.-L., Hellman, M. et al. 2008; Mattinen, M. L., Lantto, R. et al. 2008).

Lakaza katalizuje reakcije u kojima se preko slobodnoradikaliskog intermedijera fenolne grupe tirozina formira kovalentna veza (Mattinen, M. L., Kruus, K. et al. 2005). Lakaze slabo reaguju sa proteinima (Mattinen, M. L., Hellman, M. et al. 2006) i zato je potrebno prisustvo medijatora. Kao medijatori, obično se koriste mali molekuli, koji se lako oksiduju lakazom i proizvode radikale koji zatim reaguju sa proteinima. Pokazano je da je u prisustvu hlorogene kiseline kao medijatora, moguća polimerizacija ALA i BLG lakazom (Faergemand, M., Otte, J. et al. 1998).

U našim eksperimentima, kazein modifikovan tirozinazama i lakazom slabije inhibira vezivanje antitela za diskove sa kazeinom u ImmunoCap® testu. Iz ovoga se može pretpostaviti da tretmani kazeina oksidativnim enzimima mogu zakloniti i izmeniti IgE vezujuće epitope kroz novoformirane kovalentne veze.. Ovakva situacija je primećena i sa agregatima kazeina koji su povezani disulfidnim vezama; u imunoblotu serumi pacijenata su prepoznali ovaj agregat ukoliko je elektroforeza rađena u neredukujućim uslovima (Docena, G. H., Fernandez, R. et al. 1996). Ovo upućuje da je agregirani kazein važan u procesu senzitivizacije i da ima drukčije epitope od monomernog kazeina, jer serumi nekih od pacijenata su prepoznali samo agregirani kazein, a monomerni nisu. Iz ovoga možemo pretpostaviti da struktura umreženih kazeina liči na amorfni kazeinski agregat.

Druga mogućnost koja proizilazi iz ovoga je omogućavanje vezivanja niskoafinitetnih antitela za površinu umreženih proteina, jer su epitopi umrežavanjem dovedeni u blizinu. Ovakva antitela nemaju sposobnost vezivanja za monomerni kazein.

Umrežavanje kazeina oksidativnim enzimima je promenilo sposobnost aktivacije bazofila u značajnijoj meri nego samo vezivanje IgE antitela. Što se tiče funkcionalnosti na nivou aktivacije bazofila, tretman tirozinazom iz *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach i lakazom pokazao je smanjenje aktivacije senzitisanih bazofila pri susretu sa ova dva modifikata. Takođe treba napomenuti da je kod neatopičnog subjekta reaktivnost ka nemodifikovanom kazeinu jednaka kao reaktivnost umreženog kazeina, tj. alergenost nije bila povećana kod neatopičnih osoba.

Da zaključimo, tretman kazeina u prisustvu kafeinske kiseline lakazom (LC-CAS) i tirozinazom iz *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach (TA-CAS) smanjuje aktivaciju bazofila, iako sva tri ispitivana modifikata (LC-CAS, TA-CAS i TT-CAS) imaju slabiju mogućnost inhibiranja vezivanja za IgE antitela nego monomerni kazein.

5. Alergenost enzimski procesovanih proteina kikirikija u *in vivo* modelima

5.1. Alergenost proteina kikirikija modifikovanih tirozinazama

5.1.1. Uvod

Povećana prerada hrane, kako bi se obezbedila hrana sa poboljšanim organoleptičkim osobinama ili funkcijama, takođe nosi rizik od povećanja alergenosti proteina hrane (Roth-Walter, F., Berin, M. C. et al. 2008). Poznato je nekoliko faktora koji mogu da budu od važnosti za indukciju alergijskog odgovora na proteine hrane. Oni se mogu podeliti na faktore svojstvene proteinima i faktore domaćina. Od velikog značaja za alergena svojstva hrane su digestija alergena hrane, agregacija i put preuzimanja u GIT-u. (Bowman, C. C. and Selgrade, M. K. 2008; Bowman, C. C. and Selgrade, M. K. 2008; Bogh, K. L., Kroghsbo, S. et al. 2009)

Nivo agregacije proteina hrane smatra se najvažnijim faktorom proteina za razvoj alergijske reakcije. Značajno agregirani, umreženi i/ili termički obrađeni proteini hrane pokazuju drugačije ponašanje u digestivnim tečnostima, što objašnjava pristupnost intaktnih proteina i većih peptida u gastrointestinalnom traktu nakon digestije ovakvih proteina (Monogioudi, E., Faccio, G. et al. 2011). S druge strane, pokazano je da otpornost proteina na digestiju pepsinom i/ili otežana želudačna digestija zbog unosa antacida mogu da doprinesu razvoju alergijskog odgovora u životinjskim modelima (Untersmayr, E., Scholl, I. et al. 2003). Enzimi za umrežavanje se sve više koriste za prilagođavanje funkcionalnosti hrane (Aboumahmoud, R. and Savello, P. 1990; Selinheimo, E., Lampila, P. et al. 2008). Umrežavanje proteina hrane može da poveća molekulsku masu proteina, promeni trodimenzionalnu strukturu ili izmeni

površinske karakteristike molekula. Enzimsko umrežavanje proteina može, takođe, promeniti biološke osobine alergena, uključujući podložnost proteolizi od strane digestivnih enzima, rastvorljivost, vezivanje liganda, vezivanje za IgE antitela i antigenost (Stanic, D., Monogioudi, E. et al. 2010; Monogioudi, E., Faccio, G. et al. 2011; Tantoush, Z., Stanic, D. et al. 2011; Giosafatto, C. V. L., Rigby, N. M. et al. 2012). Primena raznih oksidaza, kao što su tirozinaza iz pečuraka *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach i tirozinaza iz filamentozne gljive *Trichoderma reesei*, su ispitivane kao novi agensi za umrežavanje proteina hrane (Mattinen, M. L., Lantto, R. et al. 2008; Buchert, J., Ercili Cura, D. et al. 2010). Oksidaze imaju potencijal za korišćenje u inženjeringu hrane, jer mogu da katalizuju nastanak veza između proteina, između polisaharida i između proteina i polisaharida (Selinheimo, E., Lampila, P. et al. 2008). Tirozinaze deluju na proteine i peptide tako što katalizuju oksidaciju tirozina i omogućavaju oksidativno umrežavanje bočnim lancima tirozina (Ito, S., Kato, T. et al. 1984; Buchert, J., Cura, D. E. et al. 2010). Alergija na kikiriki je najčešća alergija na hranu, i procenjeno je da 1-2% ukupne dečije populacije pokazuje alergijske simptome posle kontakta sa kikirikijem (Sicherer, S. H. and Sampson, H. A. 2007; Sicherer, S. H. and Leung, D. Y. 2013). Takođe, kikiriki je čest uzrok anafilaktičkih reakcija i smrtnih slučajeva kod dece i odraslih (Nelson, H. S., Lahr, J. et al. 1997; Sampson, H. A. 2004; Vetander, M., Helander, D. et al. 2012). Sklonost alergena kikirikija da agregiraju čak i posle enzimske digestije, u skladu je sa velikim potencijalom da izazovu alergijsku senzitivaciju (Bogh, K. L., Kroghsbo, S. et al. 2009). S obzirom da je kikiriki izuzetno potentan uzročnik alergije na hranu, enzimski tretman i formiranje stabilnih kovalentno umreženih agregata alergena kikirikija može predstavljati dodatni faktor rizika za razvoj alergija na hranu koja nije prethodno testirana.

U ovoj studiji smo koristili smo tirozinaze iz *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach i *Trichoderma reesei* da umrežimo proteine kikirikija i proverimo koji su efekti kovalentnog umrežavanja proteina u agregate velike molekulske mase na razvoj alergije na kikiriki i indukciju oralne tolerancije *in vivo*.

5.1.2. Materijal i metode

5.1.2.1.1. Hemikalije i standardi

Ukoliko nije drugačije navedeno, sve hemikalije je proizvela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD) i bile su analitičke čistoće ili bolje.

5.1.2.1.2. Priprema ekstrakata kikirikija

Proteini kikirikija su ekstrahovani prema Radosavljević et al. (Radosavljevic, J., Dobrijevic, D. et al. 2010) sa modifikacijama: pre ekstrahovanja, sirovi kikiriki je odmašćen petroletrom i 50 mM amonijum bikarbonat je korišćen za ekstrakciju.

5.1.2.1.3. Umrežavanje proteina

Za umrežavanje ekstrakta kikirikija korišćene su tirozinaza iz *Trichoderma reesei* (dajući umreženi ekstrakt kikirikija označen kao TT) i tirozinaza iz *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach (dajući umreženi ekstrakt kikirikija označen kao TA). Nakon ekstrakcije proteini kikirikija su liofilizovani.

Tirozinaza iz *Trichoderma reesei* je prečišćena i okarakterisana kao što je opisano ranije (Selinheimo, E., Saloheimo, M. et al. 2006; Selinheimo, E., Autio, K. et al. 2007). Tirozinaza iz *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach je proizvedena u kompaniji Fluka/Sigma (Seelze, Nemačka). Enzimska aktivnost tirozinaza (1900 nkat/mL za *T. reesei* i 320 nkat/mL za *A. bisporus* (Lange) Imbach) je određena korišćenjem L-DOPA (3, 4-dihidroksi-L-fenilalanin) kao supstrata (Selinheimo, E., Autio, K. et al. 2007). Neumreženi proteini kikirikija označeni su sa PE.

Eksperimentalni uslovi koji se koriste za umrežavanje PE su preliminarno testirani u cilju obezbeđivanja najvećeg stepen umreženosti. Liofilizat ekstrakta kikirikija je rastvoren u 100 mM fosfatnom puferu pH 7.0 za produkciju TA, ili u 100 mM fosfatnom puferu pH 8.0 za produkciju TT. Koncentracija proteina kikirikija je podešena na 5 mg/mL. Korišćeno je 1000 nkat enzima po 1 g proteina. Reakcija je trajala 24 h na 37 °C uz mešanje, nakon čega je dobijeni

materijal je ekstenzivno dijalizovan (72 h uz tri izmene pufera) naspram amonijum-bikarbonatnog pufera (50 mM i pH 8.0) i liofilizovan.

5.1.2.1.4. Obeležavanje umreženog materijala i ekstrakta kikirikija FITC-om

Umreženi materijali i ekstrakt kikirikija obeleženi su fluorescein izotiocijanatom (FITC) prema uputstvima proizvođača (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD)). Neizreagovali FITC odvojen je od proteina obeleženih FITC-om gel filtracijom na PD-10 koloni za uklanjanje soli (GE Healthcare, Uppsala, Švedska). Koncentracije proteina u uzorcima obeleženim FITC-om su određene pomoću Pierce® 660 nm Protein Assay (Thermo Scientific, Bon, Nemačka).

5.1.2.1.5. Gajenje Caco-2 ćelija i transportne studije

TC-7 klon (ATCC br. HTB-37) Caco-2 ćelijske linije bio je poklon od Monique Rousset (Nancy University, Lorraine, Francuska). Caco-2 ćelije su gajene u Dulbecco-ovom modifikovanom Eagle-ovom medijumu (DMEM + GlutaMAKS ; Gibco), sa dodatkom 1% neesencijalnih aminokiselina, 20% fetalnog govedeg seruma inaktiviranog toplotom (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, California), 1% smeše penicilina i streptomicina (10000 jedinica/mL i 10 mg/mL, redom) i presejavane sedmično nakon dostizanja približno 80% konfluentnosti. Kulture su održavane na 37 °C u atmosferi 5% CO₂, 95% vazduha i na 95% relativne vlažnosti. Zasejano je po 1.6×10^4 ćelija/insertu na polikarbonatnim membranama (veličina pora 1 µm), u pločama sa 24 bunara (Transwell, Corning Costar, Cambridge, MA, SAD). Ćelije su kultivisane 16 dana od 18. pasaža. Korišćeni su samo ćelijski monoslojevi sa transepitelskim električnim otporom većim od 500 Ω.

Transportne studije su rađene sa 100 µg/mL PE ili umreženog PE obeleženog FITC-om u DMEM medijumu u 200 µl ukupne zapremine tečnosti. Fluorescencija u alikvotima je merena korišćenjem spektrofluorimetra FluoroMax®-4, HORIBA Jobin Yvon Inc, NY, SAD), a koncentracija proteina obeleženog materijala je izračunata iz standardnih krivih odgovarajućih materijala.

5.1.2.1.6. Određivanje Ara h 2 i Ara h 6 transportovanog preko Caco-2 ćelijskog monosloja

Koncentracija Ara h 2 i Ara h 6, kao i fragmenata izvedenih iz ovih proteina u bazolateralnim kompartmentima Caco-2 ćelija je određena kompetitivnom inhibitornom ELISA-om, kao što je opisano ranije (Schmitt, D. A., Cheng, H. et al. 2004). Ukratko, ploče su preko noći inkubirane sa Ara h 2 ili Ara h 6. Alikvoti medijuma koji sadrži peptide dobijene od 2 h do 4 h sata transcitoze su inkubirani sa odgovarajućim zečjim poliklonskim antitelima do finalnog razblaženja uzorka od 10 puta. Smeša antitela i uzoraka supernatanata su dodati u bunare i inkubirani 2 sata na sobnoj temperaturi. Posle ispiranja, anti-zečje antitelo kuplovano sa alkalnom fosfatazom (ABD Serotec, Oksford, Ujedinjeno Kraljevstvo) u 1% BSA u TPBS –u je dodato u svaki bunar i inkubirano preko noći na 4 °C. ELISA je razvijena sa *p*-nitrofenilfosfatom i apsorbancu na 405 nm je merena. Standardne krive inhibicije su pripremljene sa antitelima inkubiranim sa prečišćenom Ara h 2 i Ara h 6, pripremljenim u petostrukim serijskim razblaženjima počev od 25 i 10 µg/mL, redom. Merenja za svaki uzorak su urađena u triplikatu. Procenti inhibicije za PE i umrežene proteine su izračunate u odnosu na kontrolni uzorak koji sadrži samo medijum u transportnim studijama.

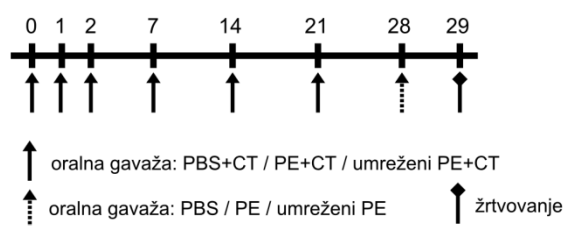
5.1.2.1.7. Miševi

Ženke C3H/HeO_uJ soja miševa (4 nedelje starosti), su nabavljene od Charles River (Lion, France). Miševi su gajeni u kavezima sa piljevinom, na srednjoj temperaturi od 23 ± 2 °C, relativnoj vlažnosti od 50-55%, i pri dvanaestočasovnom ciklusu svetlo/mrak. Pijaća voda i standardna laboratorijska hrana su obezbeđene *ad libitum*. Proteini kikirikija nisu bili prisutni u ishrani. Eksperimenti su odobreni od strane Komiteta za eksperimente na životinjama Univerziteta u Utrehtu, u Holandiji.

5.1.2.1.8. Oralna senzitivacija na kikiriki

Pojedinačna doza kojoj su miševi izloženi sadržavala je 6 mg PE (n=8) ili umreženih PE (n=5) sa 15 µg toksina kolere (List Biological Laboratories, Inc,

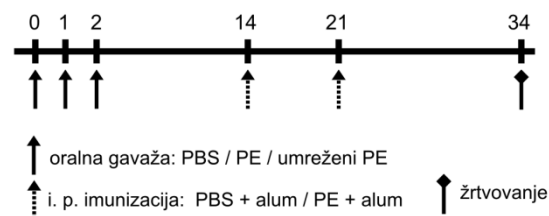
Campbell, CA, SAD). Životinje su podvrgnute intragastričnoj gavaži tokom 3 uzastopna dana i zatim svake nedelje tokom 4 nedelje. Kontrolna grupa (n=5) je primila fosfatom puferisan fiziološki rastvor (PBS) sa toksinom kolere (CT). Svi miševi su izazvani sa 12 mg PE intragastrično na dan 28, i bili su žrtvovani 1 dan kasnije. Za merenje nivoa specifičnih antitela, krv je sakupljena u 22 i 29 dana, punkcijom obraza. Uzorci krvi za merenje nivoa mMCP-1 su sakupljeni 30 min posle provokacije 28. dana (Shema 1).



Shema 1: Senzitivacioni protokol

5.1.2.1.9. Indukcija oralne tolerancije na kikiriki

Miševi (n=8) su dobili po 1 mg PE ili umreženi materijal ili PBS intragastričnom gavažom tokom 3 uzastopna dana. Ovo je bilo praćeno intraperitonealnom (i.p.) imunizacijom sa 100 µg PE sa alumom (Imject, Thermo Scientific, Rockford, IL, SAD) 14. i 21. dana od početka eksperimenta. Krv je uzeta 34. dana i životinje su žrtvovane. Negativna kontrolna grupa je primila PBS i injektovana je PBS-om sa alumom (Shema 2).



Shema 2: Protokol za indukciju tolerance

5.1.2.1.10. Merenje IgE, IgG1 i IgG2a antitela na kikiriki i nivoa proteaze mišjih mast ćelija-1 (MMCP-1)

Nivoi IgE, IgG1, i IgG2a antitela u serumu specifičnih za kikiriki su detektovani kao što je ranije opisano (van Wijk, F., Nierkens, S. et al. 2007; Bol-Schoenmakers, M., Bleumink, R. et al. 2011; Smit, J. J., Bol-Schoenmakers, M. et al. 2011) i izraženi su u arbitrarnim jedinicama (AU). MMCP-1 je određena korišćenjem komercijalnog ELISA kompleta (Moredun Scientific Ltd, Midlothian, Škotska) i urađena je prema uputstvima proizvođača.

5.1.2.1.11. Ćelijske kulture i merenja citokina

Suspenzije pojedinačnih ćelija slezine (3.75×10^5 ćelija u 200 μ L kompletnog RPMI 1640) su inkubirane sa PE (100 μ g/mL) ili samo sa medijumom u ploči sa 96 bunara tokom 96 h na 37 °C, 5% CO₂ (van Wijk, F., Nierkens, S. et al. 2007; Bol-Schoenmakers, M., Bleumink, R. et al. 2011). Posle centrifugiranja tokom 10 min na 150 \times g, supernatant je sakupljen i čuvan na -20 °C do analize.

U supernatantima kultura ćelija, nivoi IL-13 i IFN- γ su određeni sendvič ELISA kompletom (eBioscience, San Diego, SAD) prema preporuci proizvođača.

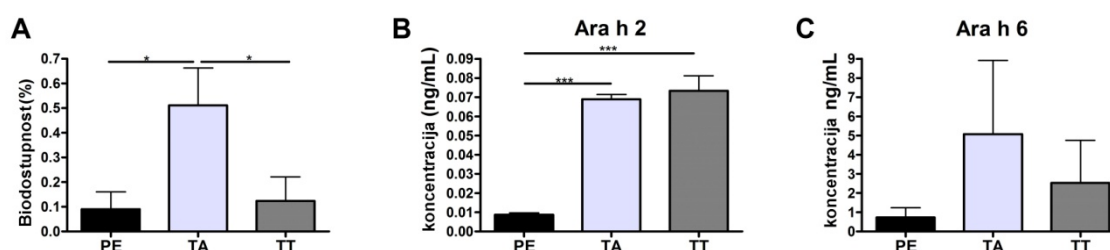
5.1.2.1.12. Statistička analiza

Podaci u grafikonima su prikazani kao srednja vrednost za grupu \pm standardna greška srednje vrednosti. Analiza podataka je izvedena pomoću GraphPad Prism softvera (La Jolla, CA, SAD). Pre statističke analize, svi podaci iz *in vivo* studija su logaritamski transformisani i proverena je normalnost distribucije. Podaci su analizirani jednosmernom ANOVA-om sa Bonferonni kao *post hoc* testom, ukoliko nije drugačije navedeno. Razlike su smatrane značajnim kada su p-vrednosti < 0.05.

5.1.3. Rezultati

5.1.3.1. *In vitro* biodostupnost proteina umreženih tirozinazama

Humane epitelne ćelije creva (Caco-2) se koriste kao model za preuzimanje molekula u crevima i transport alergeni proteina. U ovom modelu smo i određivali odnos transportnih efikasnosti nativnih i modifikovanih alergena.



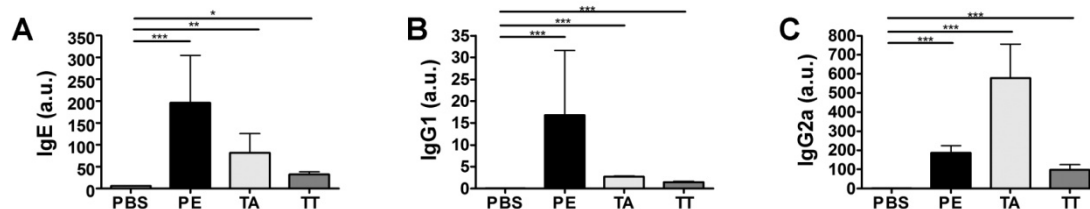
Slika 10: Biodostupnost PE i umreženih materijala PE u Caco-2 ćelijskoj liniji: A) ukupna biodostupnost; B) biodostupnost Ara h 2; C) biodostupnost Ara h 6. * $p < 0.05$, * $p < 0.001$ prema t-testu, rađeno u triplikatu. Prikazane su srednje vrednosti \pm standardna greška aritmetičke sredine.**

Merenje biodostupnoosti umreženog materijala je pokazalo da se TA transportuje kroz epitel više nego TT i PE (Slika 10A). Transport proteina kikirikija ogleda se u relativno niskoj biodostupnosti glavnih alergena kikirikija Ara h 2 i 6. Međutim, koncentracija Ara h 2 transportovanih primenom TA i TT uzoraka na Caco-2 ćelijski monosloj bila je znatno veća u odnosu na netretirani PE (Slika 10B). Nasuprot tome, količina Ara h 6 (Slika 10C) u bazolateralnom kompartmentu se nije značajno razlikovala među uzorcima.

5.1.3.2. Alergijske reakcije na hranu nakon intragastričnog izlaganja proteinima kikirikija umreženim tirozinazama

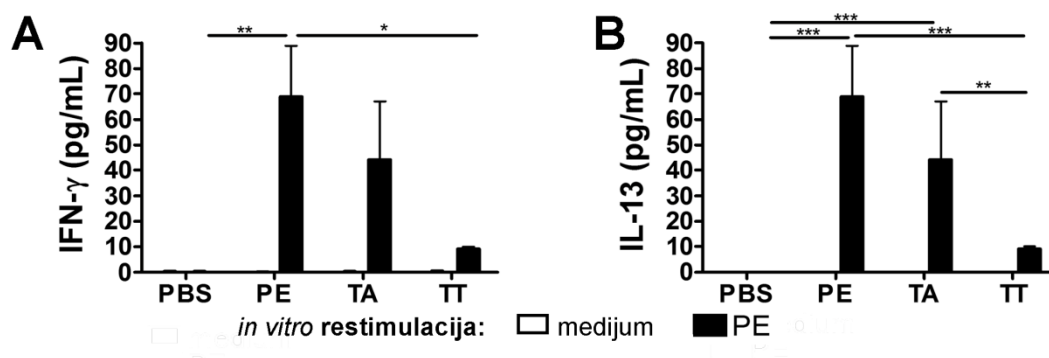
Senzitišući i alergijski potencijal alergena obično se testira u različitim životinjskim modelima alergije na hranu (Ahuja, V., Quatchadze, M. et al. 2010; Bol-Schoenmakers, M., Bleumink, R. et al. 2011). Stoga je oralni životinjski model alergije na kikiriki korišćen je za testiranje alergenosti umreženih proteina kikirikija *in vivo*. Izlaganje miševa nemodifikovanim proteinima

kikirikija ili umreženim proteinima kikirikija dovelo je do sličnog povećanja nivoa IgE, IgG1 i IgG2a specifičnih za kikiriki u serumu (Slika 11).



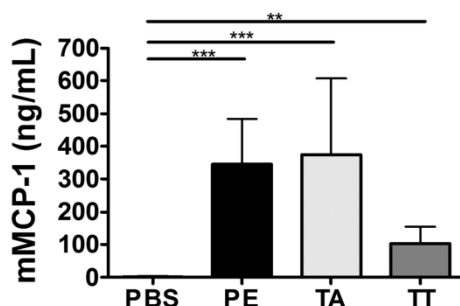
Slika 11: Senzitivacija proteinima kikirikija ili umreženim proteinima: A) IgE; B) IgG1 i C) IgG2a u serumima 29. dana eksperimenta. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, * $p < 0.001$. Prikazane su srednje vrednosti \pm standardna greška aritmetičke sredine.**

Nivoi IFN- γ i IL-13 nakon restimulacije ekstraktom kikirikija su povećani u svim tretiranim grupama. Međutim, nivo ovih citokina bio je značajno niži kod miševa tretiranih TT materijalom u poređenju sa miševima koji su bili tretirani nemodifikovanim proteinima kikirikija. (Slika 12)



Slika 12: Senzitivacija proteinima kikirikija ili umreženim proteinima: nivoi A) IFN- γ ; B) IL-13 u kulturi splenocita. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, * $p < 0.001$. Prikazane su srednje vrednosti \pm standardna greška aritmetičke sredine**

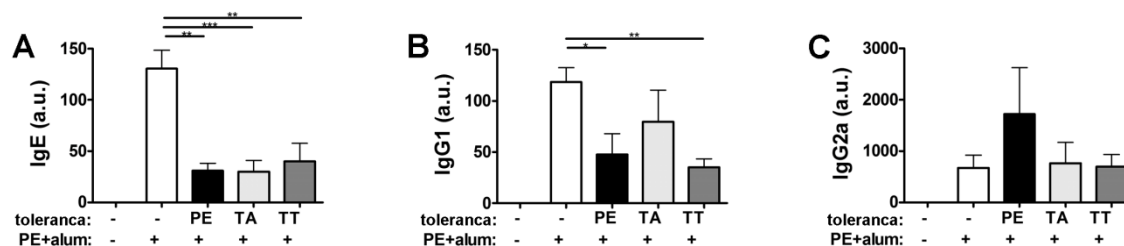
Degranulacija mukoznih mast ćelija je procenjena merenjem mMCP-1 u serumu uzetom 30 minuta posle intragastričnog izlaganja proteinima kikirikija. Senzitivizacija pomoću PE, TT i TA izaziva podjednako povećanje mMCP-1 (Slika 13).



Slika 13: Senzitivizacija proteinima kikirikija ili umreženim proteinima: nivo mMCP-1 u serumu nakon provokacije. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$. Prikazane su srednje vrednosti \pm standardna greška aritmetičke sredine

5.1.3.3. Indukcija oralne tolerancije proteinima kikirikija umreženim tirozinazama

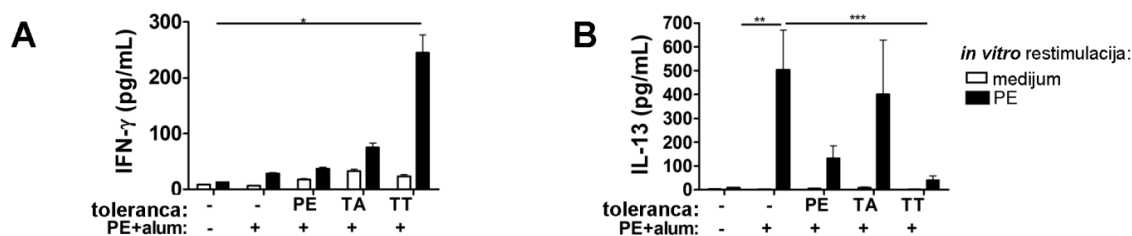
Sposobnost umreženog materijala da indukuje sistemsku tolerancu ispitivana je u mišjem modelu oralne tolerancije. Miševi koji intragastrično primili PE pre sistemske senzitivizacije sa PE pokazali su smanjenje nivoa IgE, IgG1, ali ne IgG2a antitela (Slika 14).



Slika 14: Indukcija tolerancije proteinima kikirikija ili umreženim proteinima: A) IgE; B) IgG1 i C) IgG2a u serumima 29. dana eksperimenta. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$. Prikazane su srednje vrednosti \pm standardna greška aritmetičke sredine.

Tretman sa TA-om doveo je do smanjenja samo u nivou IgE antitela, dok TT smanjuje kako sintezu IgE, tako i sintezu IgG1. Nijedan od tretmana nije uticao na proizvodnju IgG2a.

Na nivou T-ćelija, nivoi IFN- γ i IL-13 su mereni u kulturama ćelija slezine (Slika 15).



Slika 15: Indukcija tolerancije proteinima kikirikija ili umreženim proteinima: nivoi A) IFN- γ ; B) IL-13 u kulturi splenocita. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, * $p < 0.001$. Prikazane su srednje vrednosti \pm standardna greška aritmetičke sredine**

Tretman PE-om nije uticao na proizvodnju ovih citokina, kao ni indukcija tolerancije TA-om. Tretman TT-om, međutim, povećao je sintezu IFN- γ i smanjio proizvodnju IL-13.

5.1.4. Diskusija

Ovi eksperimenti pokazuju da proteini kikirikija umreženi tirozinazama poseduju alergena i imunološka svojstva slična polaznom materijalu. Umrežavanje utiče tako što umereno menja biodostupnost glavnih alergena preko monosloja Caco-2, ali na kraju ne utiče na indukciju alergije na hranu, niti na oralni razvoj tolerancije kod miševa.

Postoji nekoliko mehanizama preuzimanja kojim intaktni solubilni alergeni i njihovi peptidi mogu proći epitelnu barijeru i doći do imunskog sistema, i na kraju indukovati alergijske reakcije kod osetljivih osoba. Transcelularni transport omogućava velikim antigenim molekulima da prođu u subepitelni deo i interaguju sa lokalnim ćelijama imunskog sistema (Perrier, C. and Corthesy, B. 2011; Berin, M. C. and Sampson, H. A. 2013). U ovom radu pokazali smo da nativni PE ima veoma nisku biodostupnost u ćelijskom modelu epitelne transcitoze. To ukazuje da alergeni kikirikija, poput drugih proteina hrane sklonih agregaciji, takođe mogu koristiti i druge oblike transporta osim transcitoze kroz enterocite (tj. preko M ćelija povezanih sa Pejerovim pločama) (Untersmayr, E., Diesner, S. C. et al. 2010; Berin, M. C. and Sampson, H. A.

2013). Umrežavanje i agregacija glavnih alergena kikirikija nisu još više smanjili transepitelni prolaz kako bi se očekivalo. Nasuprot tome, proteini kikirikija su pokazali povećanu biodostupnost nakon umreženosti, naročito posle tretmana tirozinazom iz *A. bisporus* (Lange) Imbach. Takođe smo kvantifikovali Ara h 2 i Ara h 6 kompetitivnom inhibitornom ELISA-om u Caco-2 ćelijskim efluentima. Specifično dejstvo obe tirozinaze olakšava transport Ara h 2 kroz Caco-2 monosloj, u poređenju sa nativnim PE, ali ne utiče na transport Ara h 6. Među glavnim alergenima kikirikija, Ara h 2 i Ara h 6 su bili najjači alergeni kikirikija *in vivo* i glavni izazivači anafilakse koja je odgovarala većini efektorske aktivnosti u sirovom ekstraktu kikirikija kada je testiran sa RBL SX-38 ćelijama koje su senzibilisane IgE antitelima izolovanim iz seruma alergičnih ljudi (Blanc, F., Adel-Patient, K. et al. 2009). Prethodna transportna studija strukturno sličnih alergena, 2S albumina brazilskog oraha i susama (Ber e 1 i Ses i 1), otkrila je da se ovi proteini transportuju preko intaktnog monosloja Caco-2 (Moreno, F. J., Rubio, L. A. et al. 2006). Tako, kapacitet umreženih alergena kikirikija za dalje izazivnje alergijske senzitivacije može biti povezan sa zadržanim (pa čak i olakšanim) transportom glavnih alergena kikirikija. Slično, pokazano je da zagrevanje prečišćenog Ara h 2 dovodi do agregacije ovog proteina i povećava njegovu adsorpciju preko enterocita (Starkl, P., Krishnamurthy, D. et al. 2011).

Nedavna studija je pokazala da ekstrakt kikirikija koji je bogat proteinima može smanjiti biodostupnost drugih alergena. Autori su pokazali da proteini kikirikija inhibiraju apsorpciju proteina Bos d 5, Mal d 1 i Cor a 8 u Caco-2 ćelijskom modelu (Schulten, V., Lauer, I. et al. 2011). Neki aromatični etil estri i peptidi mogu da inhibiraju Caco-2 ćelijsku apsorpciju različitih alergena (Kobayashi, S. and Watanabe, J. 2003). Ovo upućuje da epitelni transport glavnih alergena kikirikija može biti inhibiran matriksom kikirikija i ostalim nealergenim proteinima kikirikija, peptidima i jedinjenjima male molekulske mase, odnosno polifenolima, prisutnim u ekstraktu (Schulten, V., Lauer, I. et al. 2011) na koje se utiče tretmanom tirozinazama.

Prema našim rezultatima, agregacija proteina kikirikija umrežavanjem ne menja imunološka svojstva ekstrakta kikirikija i ne menja indukciju alergijske reakcije

na hranu kod životinja. Pokazano je da je zagrevanje prečišćenog Ara h 2 dovelo do agregacije proteina i do povećane alergenosti *in vivo* (Starkl, P., Krishnamurthy, D. et al. 2011). Suprotno ovim istraživanjima, naši rezultati su pokazali da proteini kikirikija tretirani tirozinazama ne povećavaju sposobnost da senzitišu miševе u poređenju sa netretiranim proteinima kikirikija. Stoga, stabilno kovalentno umrežavanje i agregacija proteina sklonih formiranju agregata u fiziološkim tečnostima, ne mogu dalje pojačavati alergijsku senzitivizaciju. Pejerove ploče su makroskopsko limfoidno tkivo GIT-a, specijalizovano za preuzimanje agregiranih proteina i čestica (npr. kazeina, nepatogenih bakterija), dok rastvorljivi proteini (npr. β -laktoglobulin i α -laktalbumin) prolaze crevni epitel transcitozom kroz enterocite (Roth-Walter, F., Berin, M. C. et al. 2008). Pokazano je da je, nakon agregacije solubilnih proteina usled pasterizacije, put prolaska globularnih proteina promenjen na Pejerove ploče i doveo je do povećanja alergijske senzitivizacije *in vivo* (Roth-Walter, F., Berin, M. C. et al. 2008). Nasuprot tome, proteini inače skloni agregaciji, tj. kazeini (Roth-Walter, F., Berin, M. C. et al. 2008 ; van Esch, B. C., Gros-van Hest, M. et al. 2013) i, prema našem istraživanju, proteini kikirikija, ne menjaju imunološka svojstva *in vivo* posle tretmana koji podstiču agregaciju proteina.

Nemogućnost indukovanja oralne tolerancije kod miševa antigenima hrane može odražavati njihov kapacitet za senzitivizaciju (Bowman, C. C. and Selgrade, M. K. 2008). Ova studija pokazuje da i za TA i TT umrežene proteine, sposobnost da se indukuje oralna toleranca nije bila ugrožena. To dalje podržava naše rezultate koji pokazuju da je imunološki odgovor na umrežene alergene kikirikija sličan onome koji se razvija kao odgovor na netretirani kikiriki. Umreženi PE je transportovan preko epitelnog monosloja efikasno, ili čak više nego nemodifikovani proteini kikirikija, što je osobina neophodna za indukciju oralne tolerance (Pabst, O. and Mowat, A. M. 2012). Tako je, u saglasnosti sa *in vitro* podacima koji pokazuju očuvan transport agregiranih proteina kikirikija preko epitelne barijere, oralna tolerancija indukovana u svim tretiranim grupama životinja.

U ovim eksperimentima pokazano je da umrežavanje proteina kikirikija tirozinazama ne smanjuje transepitelni transport alergena *in vitro*, ne pojačava alergijsku reakciju *in vivo*, niti narušava kapacitet proteina kikirikija da indukuju toleranciju kod miševa.

5.2. Alergenost proteina kikirikija modifikovanih lakazom

5.2.1. Uvod

Primena enzima za poboljšanje svojstava hrane posebno su ispitivane poslednjih godina. U mnogim studijama ispitivan je efekat enzima koji mogu da umreže proteine na poboljšanje fizičko-hemijskih osobina hrane. Studije u kojima su ispitivana IgE-vezujuća svojstva umreženih proteina pokazala su kontradiktorne rezultate (Chung, S. Y., Maleki, S. J. et al. 2004; Clare, D. A., Gharst, G. et al. 2006; Clare, D. A., Gharst, G. et al. 2008).

Kao što je pokazano u Poglavlju 3.2, enzimske modifikacije mogu da promene kapacitet za vezivanje IgE antitela (čak donekle da ga smanje), ali da fiziološki relevantniji efekat, aktivacija bazofila ne bude značajno promenjen.

Takođe, eksperimenti iz Poglavlja 4.1. pokazuju da čak iako su proteini umreženi istim tipom enzima, dobijeni proizvodi mogu imati različita svojstva. Stoga je veoma važno da se prilikom predviđanja alergnog potencijala materijala dobijenog umrežavanjem obrati pažnja ne samo na vrstu enzima koja je korišćena za umrežavanje, već i izvor iz kog je enzim dobijen. Takođe, u nekim slučajevima primećeni su i neočekivani efekti nakon tretmana enzimima za umrežavanje, tj. da dolazi do hidrolize proteina, koji mogu da doprinesu promeni alergnog potencijala (Lantto, R., Puolanne, E. et al. 2005). Ukoliko su proteini umreženi oksidativnim enzimima u prisustvu medijatora, neophodno je uzeti u obzir i sporedne reakcije medijatora, čiji proizvodi zaostaju u reakcionoj smeši.

Rezultati iz Poglavlja 4.1. ukazuju na neophodnost provere alergnog potencijala modifikovanih proteina ne samo u *in vitro* nego i u različitim postavkama *in vivo* eksperimenata da bi se u potpunosti sagledao alergni potencijal novodobijenog materijala.

U ovom poglavlju biće prikazani rezultati koji su dobijeni u *in vivo* studiji sa proteinima kikirikija umreženim lakazom.

5.2.2. Materijal i metode

5.2.2.1.1. Hemikalije i standardi

Ukoliko nije drugačije navedeno, sve hemikalije je proizvela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD) i bile su analitičke čistoće ili bolje.

5.2.2.1.2. Priprema ekstrakta kikirikija

Proteini kikirikija su ekstrahovani prema Radosavljević et al. (Radosavljevic, J., Dobrijevic, D. et al. 2010) sa modifikacijama: pre ekstrahovanja, sirovi kikiriki je odmašćen petroletrom i 50 mM amonijum bikarbonat je korišćen za ekstrakciju

5.2.2.1.3. Umrežavanje proteina

Za umrežavanje ekstrakta kikirikija korišćena je lakaza iz *Trametes hirsuta* (Wulfen) Pilát (dajući umreženi ekstrakt kikirikija označen kao LC). Enzim je prečišćen, okarakterisan i određena mu je aktivnost prema prethodno publikovanom protokolu (Rittstieg, K., Suurnakki, A. et al. 2002; Selinheimo, E., Saloheimo, M. et al. 2006).

Eksperimentalni uslovi koji se koriste za umrežavanje PE su preliminarno testirani u cilju obezbeđivanja najvećeg stepena umreženosti. Liofilizat ekstrakta kikirikija je rastvoren u 100 mM fosfatnom puferu pH 6.0 i koncentracija proteina kikirikija je podešena na 5 mg/mL. Korišćeno je 1000 nkat enzima po 1 g proteina. Reakcija je trajala 24 h na 37 °C uz mešanje, nakon čega je dobijeni materijal je ekstenzivno dijalizovan naspram amonijum-bikarbonatnog pufera (50 mM i pH 8.0) i liofilizovan.

5.2.2.1.4. Miševi

Ženke C3H/HeOJ soja miševa (4 nedelje starosti), su nabavljene od Charles River (Lion, France). Miševi su gajeni u kavezima sa piljevinom, na srednjoj temperaturi od 23 ± 2 °C, relativnoj vlažnosti od 50-55%, i pri dvanaestočasovnom ciklusu svetlo/mrak. Pijaća voda i standardna

laboratorijska hrana su obezbeđene *ad libitum*. Proteini kikirikija nisu bili prisutni u ishrani. Eksperimenti su odobreni od strane Komiteta za eksperimente na životinjama Univerziteta u Utrehtu, u Holandiji.

5.2.2.1.5. Oralna senzitivizacija na kikiriki

Pojedinačna doza kojoj su miševi izloženi sadržavala je 6 mg PE (n=8) ili umreženih PE (n=5) sa 15 µg toksina kolere (List Biological Laboratories, Inc, Campbell, CA, SAD). Životinje su podvrgnute intragastričnoj gavaži tokom 3 uzastopna dana i zatim svake nedelje tokom 4 nedelje. Kontrolna grupa (n=5) je primila fosfatom puferisan fiziološki rastvor (PBS) sa toksinom kolere (CT). Svi miševi su izazvani sa 12 mg PE intragastrično na dan 28, i bili su žrtvovani 1 dan kasnije. Za merenje nivoa specifičnih antitela, krv je sakupljena u 22 i 29 dana, punkcijom obraza. Uzorci krvi za merenje nivoa mMCP-1 su sakupljeni 30 min posle provokacije 28. dana (Shema 1).

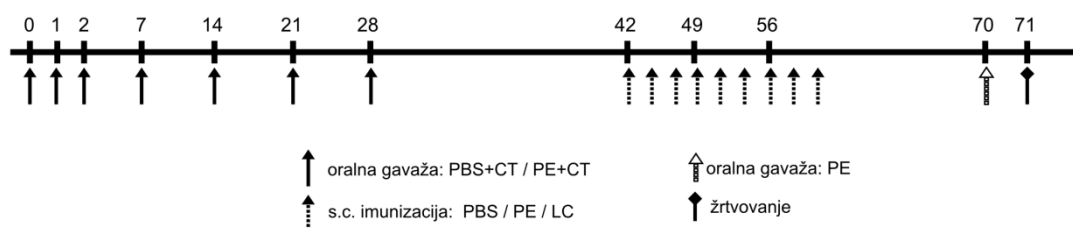
5.2.2.1.6. Indukcija oralne tolerancije na kikiriki

Miševi (n=8) su dobili 1 mg PE ili umreženi materijal ili PBS intragastričnom gavažom tokom 3 uzastopna dana. Ovo je bilo praćeno intraperitonealnom (i.p.) imunizacijom sa 100 µg PE sa alumom (Imject, Thermo Scientific, Rockford, IL, SAD) 14. i 21. dana posle poslednjeg izlaganja. Krv je uzeta 34. dana i životinje su žrtvovane. Negativna kontrolna grupa je primila PBS i injektovana je PBS-om sa alumom (Shema 2).

5.2.2.1.7. Imunoterapijski protokol

Miševi su izloženi 6 mg PE ili PBS-u sa 15 µg toksina kolere (List Biological Laboratories, Inc, Campbell, CA, SAD) intragastričnom gavažom tokom 3 uzastopna dana i ova doza je ponavljana svake sedmično tokom 3 nedelje. Kontrolna grupa (n=6) je primila fosfatom puferisan fiziološki rastvor (PBS) sa toksinom kolere. Nakon toga miševi su izloženi subkutanoj imunoterapiji PE-om ili umreženim PE-om tokom 3 nedelje, 3 puta nedeljno (Shema 3). Početna doza je bila 1 mg po mišu, ali zbog anafilaktičkih reakcija koje su dovele do smrti životinja, doza je smanjena na 0.25 mg po mišu. Sedamdesetog dana miševi su

podvrgnuti gavaži sa 12 mg PE i sutradan žrtvovani. Finalno, u grupi koja je primila PE kao terapiju preživelo je 7 miševa, tok je u grupi koja je tretirana LC-om preživelo 5 životinja.



Shema 3: Protokol za imunoterapiju

5.2.2.1.8. Merenje IgE, IgG1 i IgG2a antitela na kikiriki i proteaze mišjih mast ćelija-1 (MMCP-1)

Nivoi IgE, IgG1, i IgG2a antitela u serumu specifičnih za kikiriki su detektovani kao što je ranije opisano (van Wijk, F., Nierkens, S. et al. 2007; Bol-Schoenmakers, M., Bleumink, R. et al. 2011; Smit, J. J., Bol-Schoenmakers, M. et al. 2011) i izraženi su u arbitrarnim jedinicama (AU). MMCP-1 je određena korišćenjem komercijalnog ELISA kompleta (Moredun Scientific Ltd, Midlothian, Škotska) i urađena je prema uputstvima proizvođača.

5.2.2.1.9. Ćelijske kulture i merenja citokina

Suspenzije pojedinačnih ćelija slezine (3.75×10^5 ćelija u 200 μ L kompletnog RPMI 1640 medijuma) su inkubirane sa PE (100 μ g/mL) ili samo sa medijumom na ploči sa 96 bunara tokom 96 h na 37 °C, 5% CO₂ (van Wijk, F., Nierkens, S. et al. 2007; Bol-Schoenmakers, M., Bleumink, R. et al. 2011). Posle centrifugiranja tokom 10 min na 150 \times g, supernatant je sakupljen i čuvan na -20 °C do analize.

U supernatantima kultura ćelija, nivoi IL-13 i IFN- γ su određeni sendvič ELISA kompletom (eBioscience, San Diego, SAD) prema preporuci proizvođača.

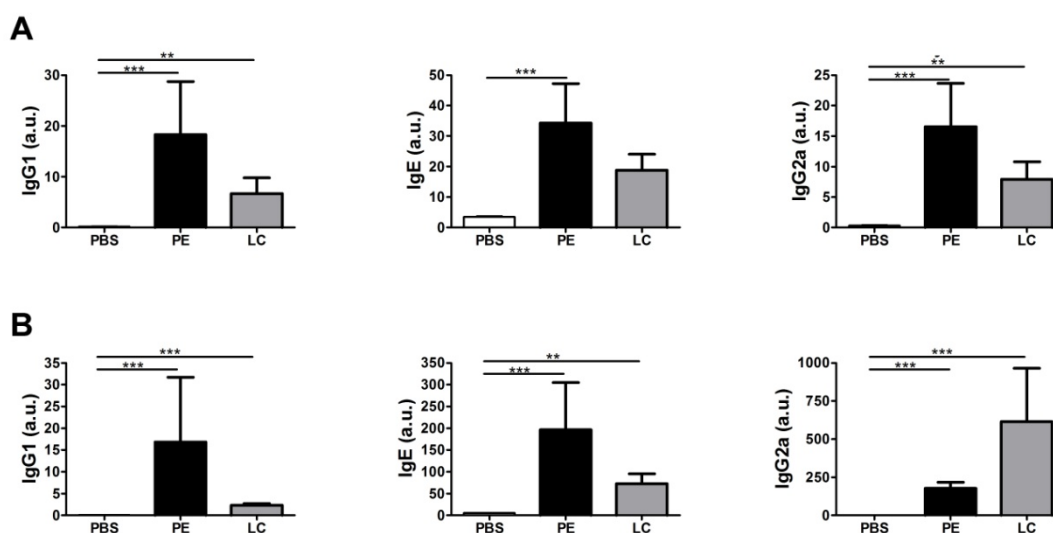
5.2.2.1.10. Statistička analiza

Podaci u grafikonima su prikazani kao srednja vrednost za grupu \pm standardna greška srednje vrednosti. Analiza podataka je izvedena pomoću GraphPad Prism softvera (La Jolla, CA, SAD). Pre statističke analize, svi podaci iz *in vivo* studija su logaritamski transformisani i proverena je normalnost distribucije. Podaci su analizirani jednosmernom ANOVA-om sa Bonferonni kao *post hoc* testom, ukoliko nije drugačije navedeno. Razlike su smatrane značajnim kada su p-vrednosti < 0.05 .

5.2.3. Rezultati

5.2.3.1. Alergijske reakcije na hranu nakon intragastričnog izlaganja proteinima kikirikija umreženim lakazom

Senzitizacija životinja ekstraktom kikirikija već nakon 22 dana proizvodi visoke nivoe svih antitela u odnosu na kontrolnu grupu. Međutim, tretman LC umreženim materijalom izaziva proizvodnju antitela IgG1 i IgG2a, ali ne i IgE u odnosu na kontrolnu grupu nakon dvadesetodnevnog tretmana (Slika 16).

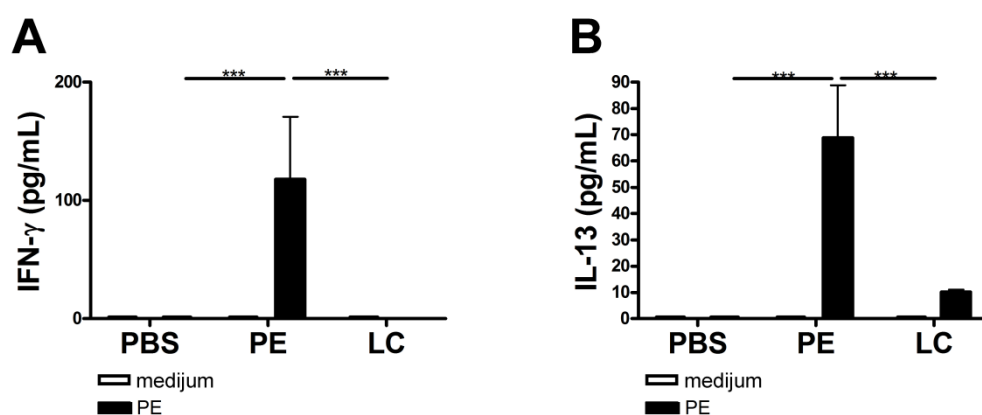


Slika 16: Senzitizacija proteinima kikirikija ili umreženim proteinima i izmereni nivoi antitela u serumu nakon: A) 22 i B) 29 dana od početka izlaganja. * p < 0.05, ** p < 0.005, * p < 0.001. Prikazane su srednje vrednosti ± standardna greška aritmetičke sredine.**

Međutima, nakon 29 dana, nivoi svih antitela proizvedenih nakon senzitizacije PE-om ili LC-om se u oba slučaja značajno razlikuju od nivoa antitela u serumima kontrolne grupe.

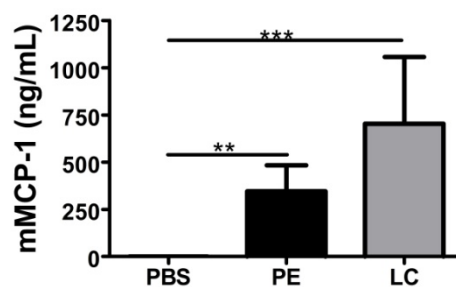
Drugo, nivo IFN- γ nakon restimulacije ekstraktom kikirikija je povećan u grupi senzitisanoj PE, dok u grupi životinja koje su tretirane LC nije došlo do značajne produkcije ovog citokina. Takođe, i nivo IL-13 citokina je značajno veći jedino u

grupi tretiranoj PE u poređenju sa kontrolnom grupom (Slika 17).



Slika 17: Senzitivizacija proteinima kikirikija ili umreženim proteinima: nivoi A) IFN- γ ; B) IL-13 u kulturi splenocita. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$. Prikazane su srednje vrednosti \pm standardna greška aritmetičke sredine

Merenje mMCP-1 u serumu uzetom 30 minuta posle intragastričnog izlaganja proteinima kikirikija pokazalo je da nakon senzitivizacije PE-om ili LC-om, miševi imaju povišene nivoe mMCP-1 u serumu, ali da nema statistički značajne razlike između ove dve grupe (Slika 18).

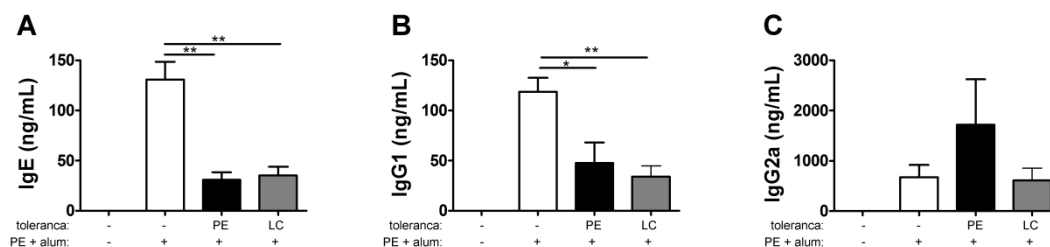


Slika 18: Senzitivizacija proteinima kikirikija ili umreženim proteinima: nivo mMCP-1 u serumu nakon provokacije. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$. Prikazane su srednje vrednosti \pm standardna greška aritmetičke sredine

5.2.3.2. Indukcija oralne tolerancije proteinima kikirikija umreženim lakazom

Sposobnost umreženog materijala da indukuje sistemsku toleranciju ispitivana je u mišjem modelu oralne tolerance. Miševi koji su intragastrično primili PE

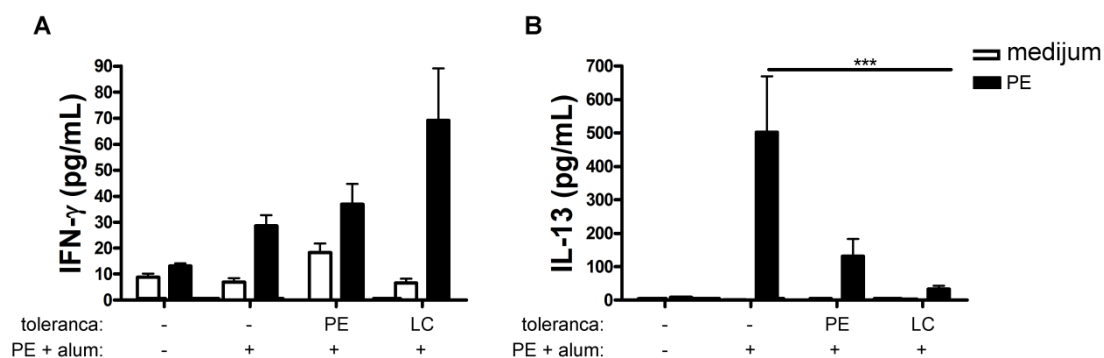
pre sistemske senzitivacije sa PE pokazali su smanjenje nivoa IgE, IgG1, ali ne IgG2a antitela (Slika 19).



Slika 19: Indukcija tolerancije proteinima kikirikija ili umreženim proteinima: A) IgE; B) IgG1 i C) IgG2a u serumima 29. dana eksperimenta. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, * $p < 0.001$. Prikazane su srednje vrednosti \pm standardna greška aritmetičke sredine.**

Takođe, LC umreženi materijal je pokazao sposobnost da indukuje smanjenje produkcije IgE i IgG1 antitela u istoj meri kao i PE.

Na nivou T-ćelija, nivoi IFN- γ i IL-13 su mereni u kulturama ćelija slezine (Slika 20).



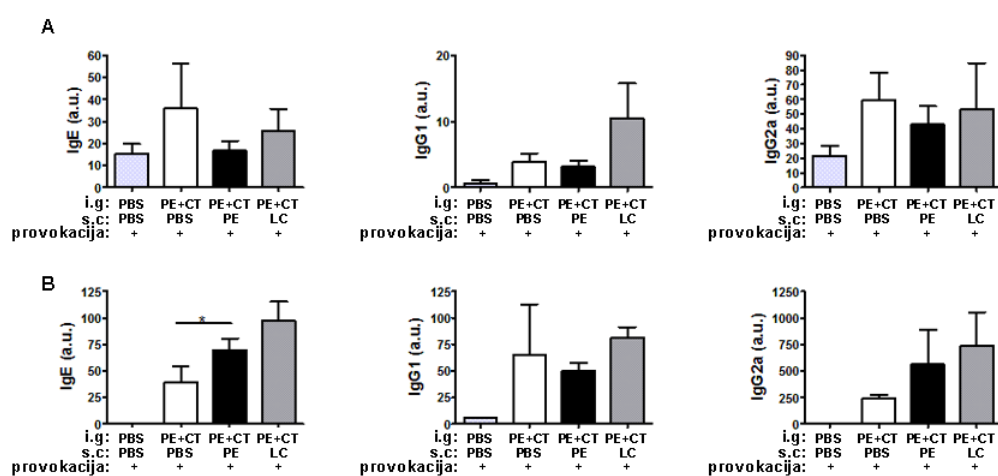
Slika 20: Indukcija tolerancije proteinima kikirikija ili umreženim proteinima: nivoi A) IFN- γ ; B) IL-13 u kulturi splenocita. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, * $p < 0.001$. Prikazane su srednje vrednosti \pm standardna greška aritmetičke sredine**

Tretman PE-om nije uticao na proizvodnju ovih citokina, dok je indukcija tolerancije LC-om značajno smanjila proizvodnju IL-13.

5.2.3.3. Imunoterapija proteinima kikirikija umreženim lakazom

Iako je imunoterapijski protokol morao da se malo prolagođava zbog anafilaktičkih reakcija (verovatno zbog visoke doze koja je primenjena), dovoljno životinja je preživelo da bi rezultati mogli da se statistički analiziraju.

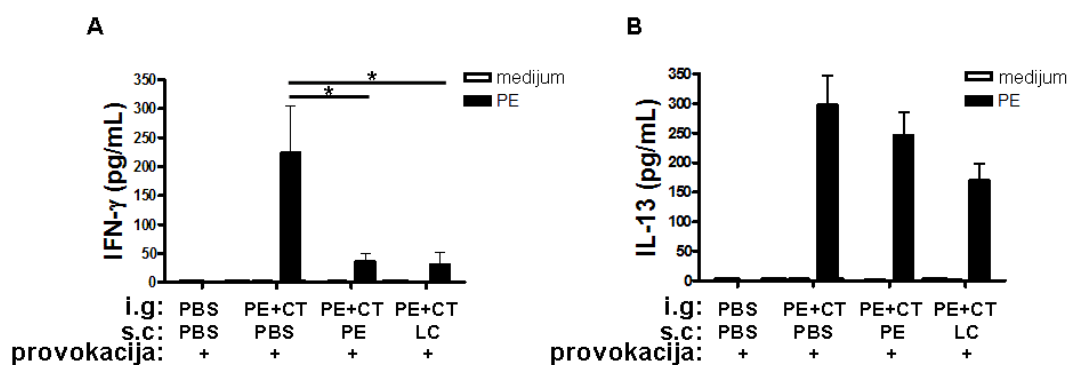
Senzitizacija životinja ekstraktom kikirikija nakon 22 dana dovodi do manje-više ujednačene produkcije antitela (Slika 21).



Slika 21: Imunoterapija proteinima kikirikija ili umreženim proteinima i izmereni nivoi antitela u serumu A) pre i B) posle imunoterapije. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, * $p < 0.001$ prema t-testu. Prikazane su srednje vrednosti \pm standardna greška aritmetičke sredine.**

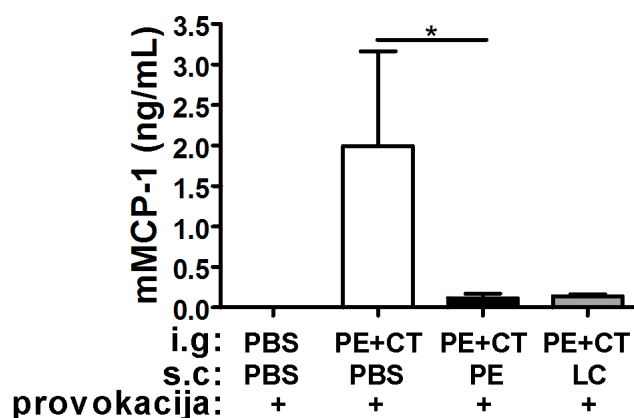
Međutim, nakon imunoterapije proteinima kikirikija nivo IgE i IgG1 antitela bio je povećan u odnosu na kontrolnu grupu, dok u slučaju tretmana sa LC životinje nisu imale više nivoe antitela.

IFN- γ nakon restimulacije ekstraktom kikirikija je smanjen u obe grupe tretirane PE-om i LC-om, dok nivoi IL-13 citokina nisu promenjeni nakon imunoterapije u odnosu na kontrolnu grupu bez ovog tretmana (Slika 22).



Slika 22: Imunoterapija proteinima kikirikija ili umreženim proteinima: nivoi A) IFN- γ ; B) IL-13 u kulturi splenocita. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, * $p < 0.001$ prema t-testu. Prikazane su srednje vrednosti \pm standardna greška aritmetičke sredine**

Merenje mMCP-1 u serumu uzetom 30 minuta posle intragastričnog izlaganja proteinima kikirikija pokazalo je da nakon imunoterapije PE-om i LC-om dolazi do smanjenja nivoa ovog markera u serumima (Slika 23).



Slika 23: Imunoterapija proteinima kikirikija ili umreženim proteinima: nivo mMCP-1 u serumu nakon provokacije. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, * $p < 0.001$. prema t-testu. Prikazane su srednje vrednosti \pm standardna greška aritmetičke sredine**

5.2.4. Diskusija

Rezultati ove studije prikazani su sumarno u Tabeli 2.

	PE	LC
Senzitizacija		
IgE	↑	↑
IgG1	↑	↑, ali kasnije
IgG2a	↑	↑
citokini	IFN- γ ↑, IL-13 ↑	-
mMCP-1	↑	↑
Toleranca		
IgE, IgG1	↓	↓
IgG2a	-	-
citokini	-	IFN- γ kao i kontrola IL-13 ↓
Imunoterapija		
IgE	↑	-
IgG1 i IgG2a	-	-
citokini	IL-13 kao kontrola IFN- γ ↓	IL-13 kao kontrola IFN- γ ↓
mMCP-1	↓	↓

Tabela 2: Pregled *in vivo* alergenosti nemodifikovanog i ekstrakta kikirikija umreženog lakazom. – nema promene u odnosu na kontrolnu grupu

Umrežavanje proteina kikirikija lakazom ne menja kapacitet ovih proteina da senzitišu. Sa jedne strane, IgG1 antitela koja su marker T_H2 imunskog odgovora kod miševa, produkuju se kasnije u odnosu na senzitizaciju nemodifikovanim ekstraktom kikirikija. Takođe, produkcija i IFN – γ i IL-13 nakon senzitizacije je smanjena. Međutim, senzitizacija ovim materijalom i dalje je dovoljno snažna da izazove oslobađanje mMCP-1 nakon provokacije sa proteinima kikirikija.

Rezultati eksperimenata pokazuju da proteini modifikovani lakazom unekoliko bolje indukuju tolerancu nego sam netretirani ekstrakt kikirikija. Ovo se ogleda u značajnom smanjenju nivoa IL-13 citokina kod životinja koje su tretirane ovim materijalom. Takođe, ovi rezultati su u saglasnosti sa dobijenim rezultatima iz eksperimenata senzitizacije, u kome umreženi materijal slabije senzitiše životinje nego nemodifikovani.

Primena lakazom modifikovanih proteina kikirikija za imunoterapiju bi mogla biti dalje ispitivana. Rezultati dobijeni u ovoj studiji pokazuju da terapija proteinima kikirikija povećava nivo IgE antitela u serumu, što nije slučaj sa proteinima modifikovanim lakazom. Prilikom tretmana sa ovim materijalima dolazi do smanjenja mMCP-1, što ukazuje na moguću uspešnost u primeni za imunoterapiju. Međutim, nivo antitela IgG2a, IgG1 i, u slučaju tretmana LC-om, IgE antitela nakon tronedeljne imunoterapije nije povišen.

Da zaključimo: umrežavanje proteina kikirikija lakazom može biti pogodno za proizvodnju terapeutika za imunoterapiju. Takođe, ovako umreženi proteini imaju smanjeni kapacitet za senzitivaciju i bolje indukuju toleranciju nego nemodifikovani proteini kikirikija.

6. Uticaj proteolitičkog procesovanja Araha 2 proteina na njegovu alergenost

6.1. Uvod

Različita hrana je opisana kao mogući izazivač alergijskih reakcija kod ljudi. Biljni alergeni hrane pripadaju različitim proteinskim familijama, uključujući prolaminsku superfamiliju, kupinsku superfamiliju, familiju cistein-proteaza, familiju α -amilaza ili tripsin inhibitora, itd. (Bannon, G. A. 2004; Breiteneder, H. and Clare Mills, E. N. 2005; Koppelman, S. J., de Jong, G. A. et al. 2005) Alergeni biljni proteini imaju različite funkcije: rezervni su proteini semena, imaju proteolitičku funkciju ili su inhibitori različitih proteaza, i na taj način štite biljke od patogenih mikroorganizama, dok za određen broj biljnih alergena još uvek nije poznata funkcija. Biohemijska karakterizacija biljnih alergena pokazala je da su glavni alergeni hrane najčešće glikoproteini molekulske mase od 10 do 70 kDa i da poseduju mnoštvo IgE vezujućih epitopa (Breiteneder, H. and Clare Mills, E. N. 2005). Ovi glikoproteini indukuju alergijske reakcije povezivanjem IgE molekula ukotvljenih na receptorima na površini efektorskih ćelija mastocita i bazofila. Štaviše, proteini koji mogu da indukuju alergijsku senzitivaciju su apsorbavani kroz crevnu epitelnu barijeru u imunološki očuvanoj formi (Taylor, S. L., Lemanske, R. F., Jr. et al. 1987), ili poseduju zajednička strukturna svojstva (tzv. epitopi ukrštene reaktivnosti) sa uobičajenim respiratornim alergenima (Breiteneder, H. and Clare Mills, E. N. 2005).

Alergija na kikiriki je najčešća alergija na hranu koja može dovesti do ozbiljnih zdravstvenih ishoda. Oko 1% populacije Sjedinjenih Američkih Država ima alergiju na kikiriki i njena prevalenca raste i dalje (Sicherer, S. H., Munoz-Furlong, A. et al. 2003). Alergijske reakcije koje se javljaju nakon unosa čak i malih količina kikirikija često su veoma ozbiljne, jer mogu dovesti do anafilakse

i, ponekad, do fatalnog ishoda (Sicherer, S. H., Munoz-Furlong, A. et al. 2003). Intenzivna istraživanja na karakterizaciji strukture proteina kikirikija i identifikaciji alergena kikirikija su do sada sprovedena i za desetak proteina kikirikija je potvrđena alergenost. Eksperimenti sa imuno-blotom su pokazali da su glavni alergeni koji bivaju prepoznati od strane IgE antitela iz seruma osoba alergičnih na kikiriki Ara h 1, Ara h 2 i, u nešto manjem broju slučajeva, Ara h 3 (Burks, A. W., Williams, L. W. et al. 1991; Burks, A. W., Williams, L. W. et al. 1992; Bock, S. A., Munoz-Furlong, A. et al. 2001; Burks, A. W. 2008).

U poslednje vreme više pažnje je posvećeno karakterizaciji 2S albumina iz kikirikija, tj. Ara h 2 i Ara h 6. Familija 2S albumina obuhvata proteine male molekulske mase, i za većinu pripadnika ove familije potvrđeno je da su biljni alergeni. Karakteristično svojstvo ovih proteina je visoko konzervisana 3D struktura koja podrazumeva barem četiri α -heliksa sa visoko konzervisanim cisteinskim ostacima koji su organizovani na specifičan način (Lehmann, K., Schweimer, K. et al. 2006). Do sada su identifikovane dve izoforme Ara h 2 koje se eksprimiraju sa različitih gena, Ara h 2.01 i Ara h 2.02 (Chatel, J. M., Bernard, H. et al. 2003). Pokazano je i da je Ara h 6 veoma potentan alergen, koji ima zajedničke epitope sa Ara h 2, i da se imunološka ukrštena reaktivnost između Ara h 2 i Ara h 6 zasniva na njihovoj biohemijskoj sličnosti (Koppelman, S. J., de Jong, G. A. et al. 2005). Pokazano je da Ara h 6 podleže proteolitičkom procesovanju kojim se uklanja dipeptid Ile-Arg (IR). Obe izoforme Ara h 6, procesovana i neprocesovana, prisutne su u kikirikiju i pretpostavljeno je da ovakav vid proteolitičkog procesovanja neophodan za maturaciju Ara h 6 alergena (Bernard, H., Mondoulet, L. et al. 2007).

U našem istraživanju izolovan je Ara h 2 iz ekstrakta kikirikija pod različitim uslovima. Primećeno je da obe izoforme, i Ara h 2.01 i Ara h 2.02, podležu proteolitičkom procesovanju. Takođe, ove proteolitički procesovane izoforme, zajedno sa neprocesovanim, doprinose vezivanju IgE antitela iz seruma osoba alergičnih na kikiriki.

6.2. Materijal i metode

6.2.1.1.1. Ekstrakcija proteina

Sirovi kikiriki je ohlađen preko noći na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ u zamrzivaču, samleven sutradan i odmašćen ekstrakcijom dietil-etrom. Dobijeni prah je ostavljen da se suši preko noći na sobnoj temperaturi. Proteini su ekstrahovani resuspendovanjem 10g dobijenog praha u 100 mL pufera tokom 2 h na sobnoj temperaturi uz mešanje na magnetnoj mešalici. Kao ekstrakcioni pufer za uslove koji ne inhibiraju proteaze korišćen je 50 mM Tris-HCl, 0.2 M NaCl, pH 8.5, a za uslove koji inhibiraju proteaze korišćen je pufer koji je sadržao inhibitore proteaza: 50 mM Tris-HCl, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 8.5. Ekstrakt je izbistren centrifugiranjem na 13 400 rpm 15 min. Preostali lipidi su uklonjeni ekstrakcijom ugljen-tetrahloridom i centrifugiranjem na 13 400 rpm. Bistri ekstrakti su alikvotirani i čuvani na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ do dalje upotrebe.

6.2.1.1.2. Gel hromatografija

Proteini ekstrahovani iz kikirikija u prisustvu ili odsustvu inhibitora proteaza su razdvojeni na Superdex 200 XK 16/100 koloni hromatografijom na ÄKTA purifier 10 HPLC sistemu (Amersham Biosciences, Upsala, Švedska) i eluirani korišćenjem pufera za ekstrakciju (za uslove koji ne inhibiraju proteaze: 50 mM Tris-HCl, 0.2 M NaCl, pH 8.5, a za uslove koji inhibiraju proteaze: 50 mM Tris-HCl, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 8.5). Dobijene frakcije su analizirane pomoću SDS-PAGE i frakcije sa sličnim proteinskim profilima su spojene i koncentrovane ultrafiltracijom.

6.2.1.1.3. Reverzno-fazna hromatografija

Frakcije koje sadrže proteine kikirikija u opsegu molekulskih masa od 14 kDa do 20 kDa su podvrgnute razdvajanju reverzno-faznom hromatografijom na Discovery BIO Wide Pore C5 (10 cm \times 4.6 cm) koloni (Supelco, Sigma-Aldrich) (C5 RPC). Za eluiranje su korišćeni kao eluent A 0.1% TFA (trifluorosirćetna kiselina), a kao eluent B 0.1% TFA u 90% acetonitrilu. Eluiranje je rađeno pri

protoku od 0.75 mL min⁻¹ linearnim gradijentom, sa postepenim povećanjem od 0 do 100% eluenta B tokom 10 zapremina kolone. Elucija je praćena merenjem apsorbanca na 280 i 215 nm.

6.2.1.1.4. ESI-MS

Frakcije dobijene razdvajanjem na C5 RPC koloni su pripremljene za dalju analizu masenom spektrometrijom. Eluent je uklonjen vakuum centrifugiranjem na sobnoj temperaturi u Eppendorf isparivaču (Hamburg, Nemačka), a suvi ostaci su rastvoreni u 0.1% mravljoj kiselini u 50% acetonitrilu pri finalnoj koncentraciji proteina od 0.6 mg/mL. Merenja mase proteina su izvedena na MS sistemu koji se sastoji od of 6210 Time-of-Flight LC/MS (G1969A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States) i uzorci rastvoreni u mobilnoj fazi su uvedeni preko 1200 Series HPLC system (Agilent Technologies, SAD). Agilent MassHunter Workstation Software (Agilent Technologies) je korišćen za prikupljanje podataka, a Agilent MassHunter Workstation Software i Analyst QS (Agilent Technologies) su korišćeni za analizu podataka.

6.2.1.1.5. SDS-PAGE

SDS-PAGE je rađena na Hoeffer SCI aparaturi (Amersham Biosciences) sa diskontinualnim sistemom pufera. Uzorci proteina su pomešani sa puferom za uzorke i kuvani tokom 5 min na 95 °C. Komponente su razdvojene na 14% poliakrilamidnim gelovima pod neredukujućim uslovima zajedno sa standardnom smešom proteina kao referencom za molekulske mase (Fermentas, Vilnius, Litvanija). Gelovi su obojeni bojom Coomassie Brilliant Blue R-250 radi vizualizacije razdvojenih proteina.

6.2.1.1.6. 2D-PAGE

U prvoj dimenziji proteini su razdvojeni izoelektrofokusiranjem (5% poliakrilamidni gel, gradijent amfolita pH 3.5-10 (Pharmacia, Upsala, Švedska) na Multiphor II sistemu (Pharmacia LKB, Upsala, Švedska). Posle 30 min inkubacije u ekvibracionom puferu (62.5 mM Tris-Cl pH 6.8, 5% (v/v) β-

merkaptoetanol, 2.3% SDS (v/v) i 10% (v/v) glicerol), druga dimenzija je izvedena na 14%-nom poliakrilamidnom gelu.

6.2.1.1.7. 2D imunoblot

Nakon 2D elektroforetskog razdvajanja, proteini su prebačeni na nitroceluloznu membranu koristeći sistem za elektrotransfer (Serva, Heidelberg, Nemačka). Efikasan prenos na membranu potvrđen je bojenjem rastvorom 0.5% Ponceau S boje tokom 15 min. Nitrocelulozna membrana je obezbojena ispiranjem TTBS-om (30 mM Tris pH 7.4 koji sadrži 0.9% NaCl i 0.1% Tween 20). Nitrocelulozna membrana je blokirana 1%-nim rastvorom humanog serum albumina (HSA) (Octopharma AB, Švedska) u TTBS-u pre inkubiranja sa razblaženim serumima. Serumi pet osoba pozitivnih na kikiriki u kožnim probama (SPT) i sa IgE nivoima na proteine kikirikija većim od 0.5 kU/L su sakupljeni i korišćeni za razvijanje blota. Membrane su testirane sa smešom seruma razblaženom 3 puta u TTBS-u radi ispitivanja vezivanja IgE antitela iz smeše seruma alergičnih osoba. Vezani IgE je detektovan korišćenjem anti-humanog IgE antitela (Sigma-Aldrich) obeleženog alkalnim fosfatom, razblaženim u 0.1% HSA u TTBS-u u razblaženju preporučenom od strane proizvođača. Obrasci vezivanja vizualizuju se rastvorom supstrata koji se sastoji od 1.5 mg BCIP (5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat) i 3 mg NBT (nitro blue tetrazolium) u 10 mL 100 mM Tris pufere koji sadrži 150 mM NaCl i 5 mM MgCl₂, pH 9.6.

6.2.1.1.8. Genetski materijal i priprema cDNA

Genomska DNA je ekstrahovana iz kikirikija pomoću Dneasy Plant Mini kit-a (Qiagen, Valencia, CA, Sjedinjene Američke Države). RNA je ekstrahovana iz kikirikija koristeći RNeasy Plant kit (Qiagen). Ekstrahovana RNA je korišćena kao templat za sintezu cDNA pomoću oligo-dT prajmera i RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas).

6.2.1.1.9. PCR amplifikacija gena koji kodiraju Ara h 2 i Ara h 6

Specifični prajmeri za amplifikaciju gena koji kodiraju Ara h 2 h 6 i Ara su kreirani prema sekvencama dostupnim u GenBank bazi sa pristupnim

brojevima AY117434 i EF609643, redom. Pfu polimeraza (Fermentas) je korišćena sa genomskom DNA ili cDNA kao templatom za amplifikaciju Ara h 2 gena, u 25 µL reakcione zapremine pri sledećim uslovima: 95 °C 3 min; 30 ciklusa na 95 °C 1 min, 56.5 °C 75 sec, 74 °C 2 minuta, 72 °C 10 min (1 ciklus) sa finalnim zadržavanjem na 4° C. Gen koji kodira Ara h 6 je umnožen pomoću TrueStart Taq Polymerase (Fermentas) i sa genomskom DNA i cDNA korišćenim kao templat u 25 µL-oj reakcionoj zapremini pri sledećim uslovima: 95 °C 1 min, 55.5 °C 75 sec, 74 °C 2 min; 72 °C 10 min (1 ciklus) i finalno zadržavanje na 4 °C.

6.2.1.1.10. Analiza Ara h 2 i Ara h 6 gena

PCR proizvodi dobijeni umnožavanjem genomske DNA su ligirani u pET28b vektor. Hemijski kompetentne ćelije *E. coli* soj DH5α su transformisane vektorom koji nosi željeni gen i gajene na agar pločama sa selekcionim antibiotikom. Kontrolna transformacija je uporedo izvedena. Kolonije rezistentne na antibiotik su analizirane na prisustvo kopija Ara h 2 ili Ara h 6 gena PCR reakcijom na pojedinačne kolonije. Kolonije pozitivne na Ara h 2 i Ara h 6 korišćene za sekvenciranje su nasumično odabrane i gajene u kulturi preko noći. Geni su sekvencirani koristeći specifične prajmere za T7 promotor i T7 terminator na 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, Sjedinjene Američke Države).

6.2.1.1.11. Molekulsko modelovanje Ara h 2 izoformi

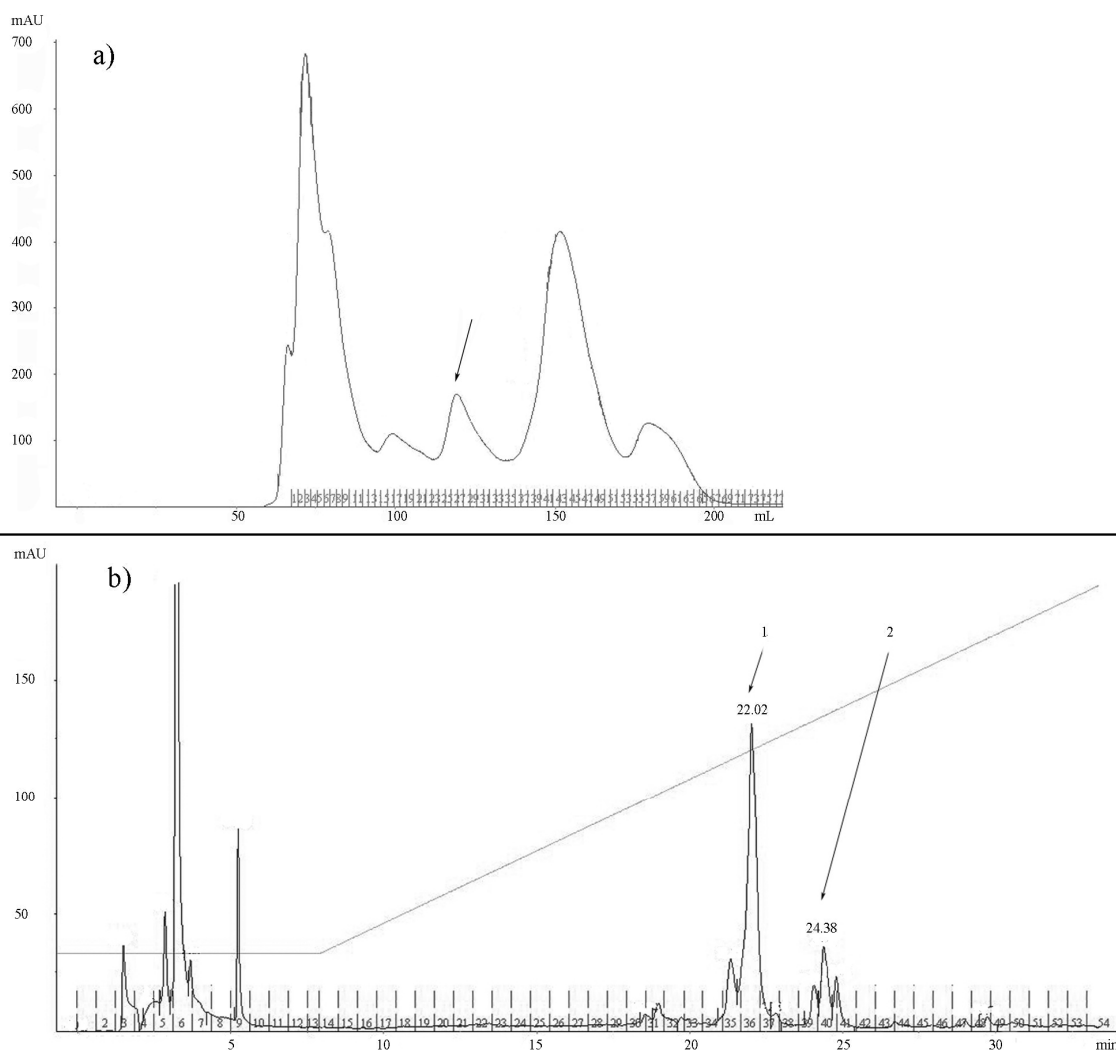
Blast pretraživanjem (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) utvrđeno je da sekvenca koja ima najviši stepen homologije sa Ara h 2 je Ara h 6. Prijavljena 3D struktura Ara h 6 je korišćena kao templat za modeliranje Ara h 2 višestrukom metodom mapiranja (Multiple Mapping Method) (Rai, B. K. and Fiser, A. 2006). Provera minimalizacije energija modelovanih struktura urađeno je GROMOS 96 implementacijom u Swiss-Pdb Viewer-u (Guex, N. and Peitsch, M. C. 1997). Strukture procesovane i neprocesovane Ara h 2 izoforme su pregledane i upoređene u programu Swiss-Pdb Viewer 4.01 (<http://www.expasy.org/spdbv/>). Analiza Ramačandranovih dijagrama obeju

struktura nije pokazala aminokiselinske ostatke u nedozvoljenim delovima dijagrama.

6.3. Rezultati

6.3.1.1. Izolovanje Ara h 2 i Ara h 6 iz sirovog ekstrakta kikirikija

Ara h 2 i Ara h 6 izolovani su iz sirovog kikirikija u prisustvu ili u odsustvu inhibicije proteaza, kao što je navedeno u odeljku Materijal i metode. Posle frakcionisanja gel filtracijom na Superdex 75 koloni, pik koji je sadržavao i Ara h 2 i Ara h 6 je detektovan u elucionom profilu ekstrakta kikirikija pripremljenog pod uslovima koji ne inhibiraju aktivnost proteaze (Slika 24A). Identičan hromatografski profil je dobijen kada je ekstrakt kikirikija pripremljen pod uslovima u kojima su proteaze inhibirane (podaci nisu prikazani). Sakupljene frakcije koje sadrže Ara h 2 i Ara h 6 i Ara su zatim razdvojene na C5 RPC koloni i pikovi koji potiču od Ara h 2 i Ara h 6 su detektovani na reverzno-faznom hromatografskom profilu (Slika 24B). Slično, u uslovima u kojima su proteaze inhibirane tokom izolovanja, Ara h 2 i Ara h 6 eluirani su sa istim retencionim vremenom (podaci nisu prikazani). Ponovljena priprema i frakcionisanje ekstrakta kikirikija u prisustvu ili odsustvu inhibicije proteaza dala je konzistentne rezultate sa identičnim hromatografskim elucionim profilima.

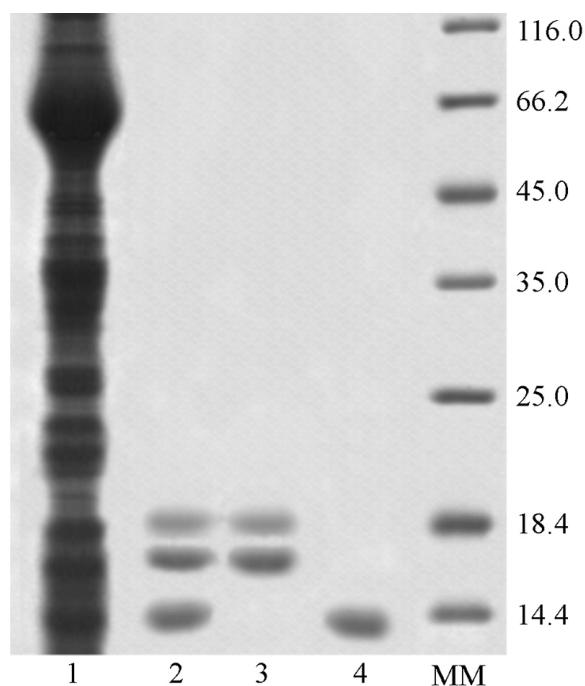


Slika 24: Izolovanje Ara h 2 i Ara h 6 u odsustvu inhibicije proteaza: a) elucioni profil ekstrakta kikirikija razdvojenog na na Superdex 200 koloni: strelica pokazuje pik koji sadrži i Ara h 2 i Ara h 6; b) elucioni profil spojenih frakcija koje sadrže Ara h 2 i Ara h 6 na C5 RPC koloni : 1 - Ara h 2, 2 - Ara h 6

6.3.1.2. SDS-PAGE analiza Ara h 2 i Ara h 6

Frakcije iz postupka izolovanja pri uslovima u kojima su inhibirane proteaze dalje su analizirane pomoću SDS-PAGE i bojenjem CBB-om. Frakcije spojene nakon gel hromatografije, kao i frakcije koje su sadržavale prečišćeni Ara h 2 ili Ara h 6 pokazale su očekivane elektroforetske pokretljivosti za Ara h 2 i Ara h 6 (Slika 25). Nakon bojenja, Ara h 2 je identifikovan na gelu kao dublet, sa dve trake koje predstavljaju dve poznate izoforme, Ara h 2.01 i Ara h 2.02, sa približnim molekulskim masama od 16 i 18 kDa, dok je Ara h 6 identifikovan kao jedna traka sa približnom molekulskom masom od 15 kDa. Elektroforetski

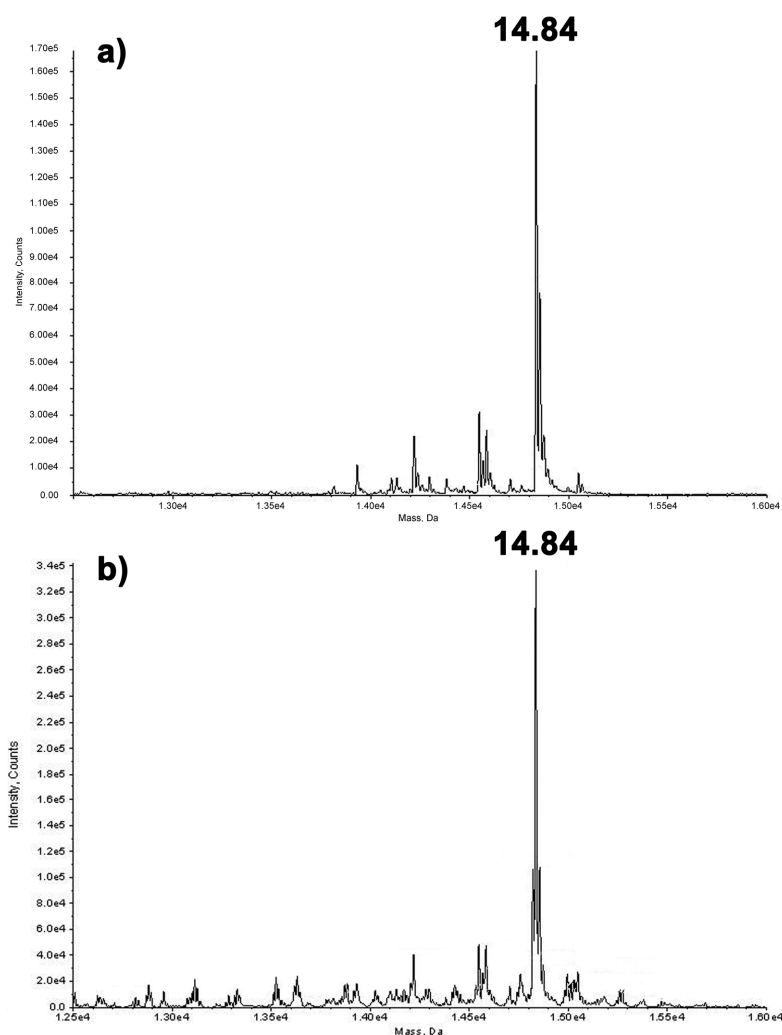
profil prečišćenog Ara h 2 proteina ostao je nepromenjen bez obzira da li su redukujući ili neredukujući uslovi korišćeni za pripremu uzorka.



Slika 25: SDS-PAGE prečišćavanja Ara h 2 i Ara h 6 : 1 – ekstrakt kikirikija, 2 – spojene frakcije posle gel hromatografije koje sadrže Ara h 2 i Ara h 6, 3 - prečišćeni Ara h 2, 4 - prečišćeni Ara h 6, MM – molekularni markeri

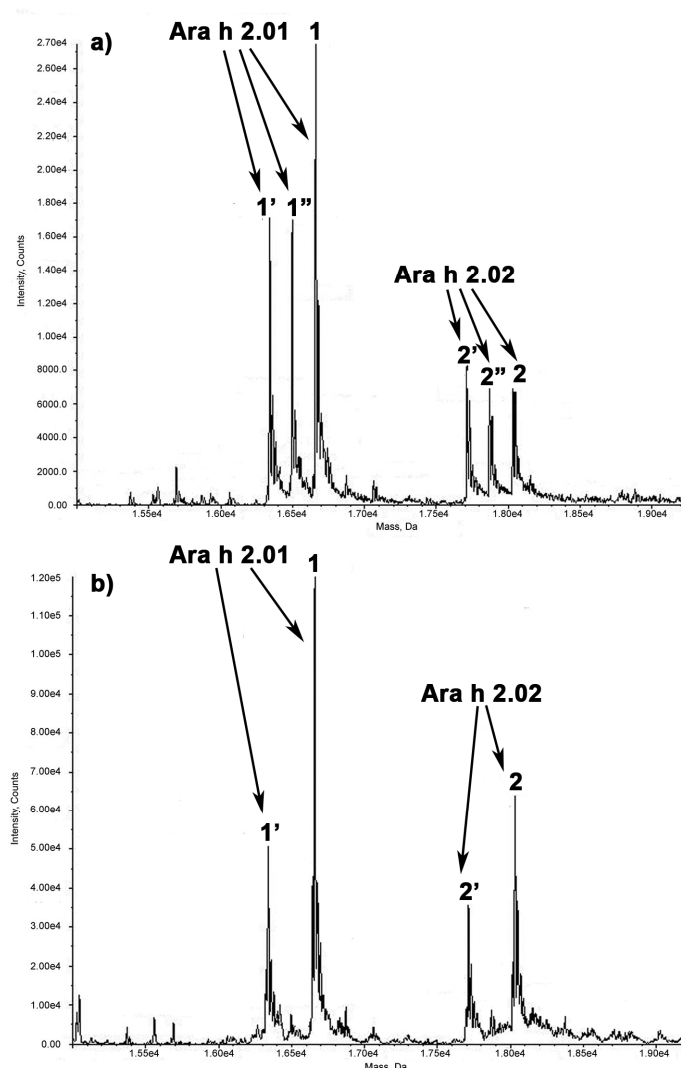
6.3.1.3. Identifikacija izolovanih proteina pomoću ESI-masene spektrometrije

Prečišćeni Ara h 6 i Ara h 2 su zatim podvrgnuti ESI-MS analizi. Maseni spektri Ara h 6 proteina izolovanog pod neinhibitornim (Slika 26a) ili proteazno-inhibitornim (Slika 26b) uslovima nisu pokazali razliku između ova dva pristupa.



Slika 26: ESI maseni spektri izolovanog Ara h 6: a) u odsustvu inhibicije proteaza, b) u prisustvu inhibicije proteaza

Međutim, razlike su uočene za Ara h 2 koji je izolovan pri različitim uslovima (Slika 27). Ara h 2 prečišćen u odsustvu inhibicije proteaza pokazao je prisustvo dodatnih pikova za izoforme Ara h 2.01 i Ara h 2.02 (Slika 27a).



Slika 27: ESI maseni spektri izolovanog Ara h 2: a) u odsustvu inhibicije proteaza, b) u prisustvu inhibicije proteaza. 1, 1', 1'' - Ara h 2.01 izoforme; 2, 2', 2'' - Ara h 2.02 izoforme. ' označava izoforme kojima nedostaje dipeptid RY, '' označava izoforme kojima nedostaje Y.

Ove izoforme su identifikovane kao kraće forme kojima nedostaje jedna C-terminalna aminokiselina tirozin (Y) ili C-terminalni dipeptid (RY) (Tabela 3). Međutim, pod uslovima u kojima su proteaze inhibirane samo jedan dodatni pik je primećen za Ara h 2.01 i Ara h 2.02 izoforme (Slika 27b). Ovaj dodatni pik odgovara skraćenim formama Ara h 2.01 i Ara h 2.02 kojima nedostaje C-terminalni dipeptid (RY) (slika 5). Mase dobijene za neobrađene Ara h 2.01 i Ara h 2.02 izoforme, kao i za Ara h 6 u saglasnosti su sa literaturno dostupnim (Chatel, J. M., Bernard, H. et al. 2003; Bernard, H., Mondoulet, L. et al. 2007).

Pik	Molekulska masa (Da)	Razlika u masi (Da)	Uklonjena aminokiselina	Izoforma
1	16661.1409	-	-	Ara h 2.01
1'	16341.8126	319.3283	RY	Ara h 2.01
1''	16497.9138	163.2271	Y	Ara h 2.01
2	18033.5998	-	-	Ara h 2.02
2'	17714.3235	319.2763	RY	Ara h 2.02
2''	17870.3919	163.2079	Y	Ara h 2.02

Tabela 3: Mase izoformi Ara h 2 dobijene ESI–masenom spektrometrijom: 1, 1', 1'' - Ara h 2.01 izoforme; 2, 2', 2'' - Ara h 2.02 izoforme. ' označava izoforme kojima nedostaje dipeptid RY, '' označava izoforme kojima nedostaje Y

6.3.1.4. Analiza Ara h 2 i Ara h 6 genskih sekvenci

Specifični prajmeri za umnožavanje gena koji kodiraju Ara h 2 i Ara h 6 su napravljeni u skladu sa GenBank sekvencama sa pristupnim brojevima AY117434 i EF609643, redom, i geni koji odgovaraju Ara h 2 i Ara h 6 su umoženi PCR-om i sekvencirani. Upoređivanje BLAST-om identifikovane genske sekvence koja kodira Ara h 6 pokazalo je 100% istovetnosti sa sekvencama već dostupnim pod pristupnim brojevima EF609644.1 i EF609643.1 (Ramos, M. L., Fleming, G. et al. 2006), dok je upoređivanje sekvence koja kodira Ara h 2 pokazalo da klonirani gen ima 100% identičnosti sa sekvencom dostupnom pod pristupnim brojem AI722689.1 (Yan, Y.-S., Lin, X.-D. et al. 2005) i odgovara delimičnoj kodirajućoj sekvenci Ara h 2.

6.3.1.5. Molekulsko modelovanje Ara h 2 izoforme

Predviđanje struktura Ara h 2.01 izoformi korišćenjem Ara h 6 kao modela sa 57% istovetnosti je pokazalo da su 3D strukture Ara h 2.01 i njene kraće forme iste. Model tercijarne strukture Ara h 2.01 pokazuje dominantne α -helikse u sekundarnim strukturama sa svih osam cisteinskih ostataka uključenih u formiranje disulfidnih veza (Slika 28). Struktura se sastoji od jezgra koje čine 4 heliksa sa dva manja heliksa koji su pridruženi i doprinose stabilizaciji jezgra. Superponiranje modelovanih struktura Ara h 2.01 i njegove kraće forme u Swiss-Pdb Viewer-u nije pokazalo primetne razlike u njihovoj 3D strukturi, vidljive na nivou organizovanih sekundarnih struktura. Jedina primećena

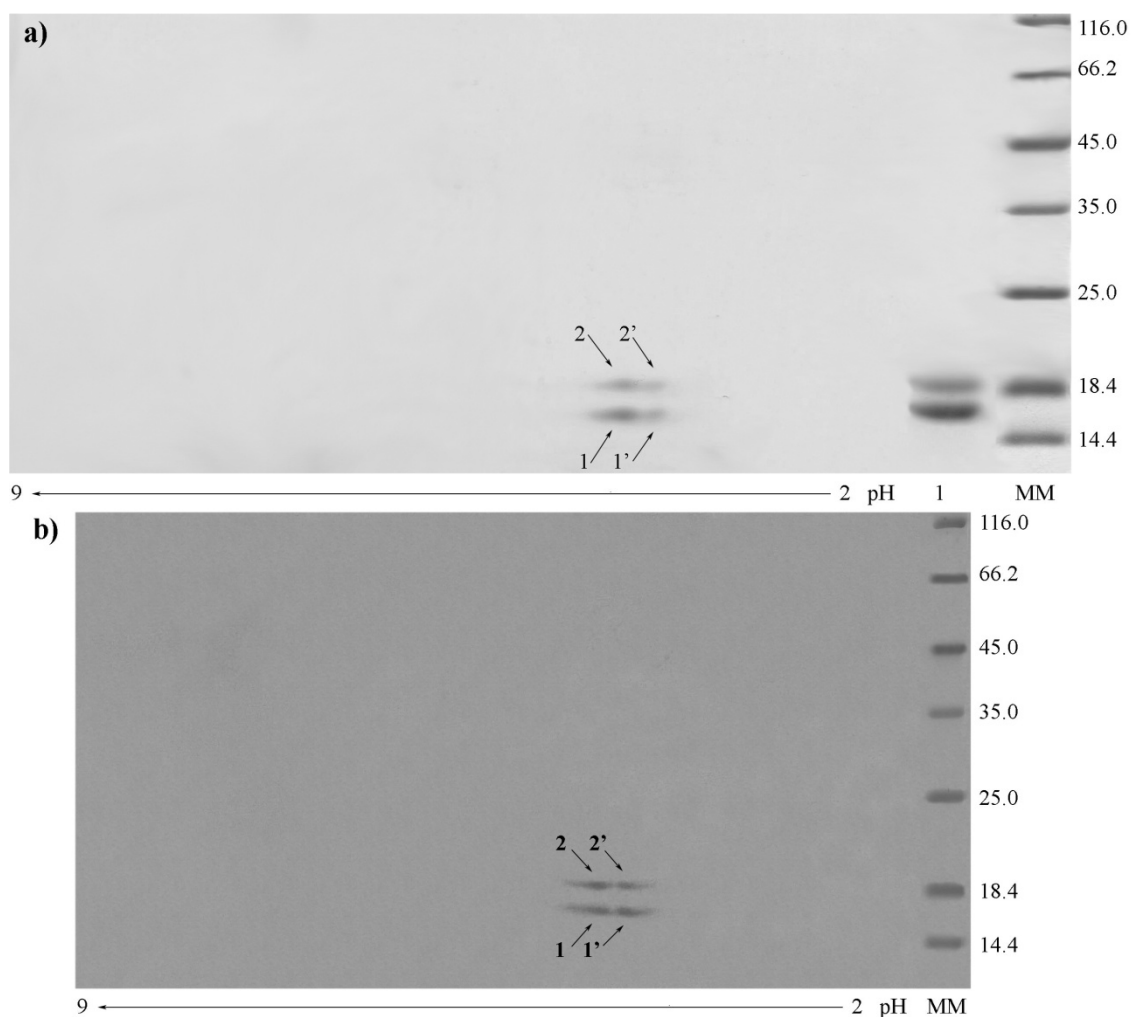
razlika je u regionu u kom polipeptid ima neuređenu strukturu, ali ne i u regionu koji uključuje C-terminus (Slika 28).



Slika 28: Model 3D strukture Ara h 2.01: 1 - C-terminus neprocesovanog Ara h 2.01 (svetlo siva), 2 - C-terminus kraće forme Ara h 2.01 (crna).

6.3.1.6. Vezivanje humanih IgE antitela od strane Ara h 2 izoformi

Da bi se proverio potencijal za vezivanje IgE antitela Ara h 2 i njegove kraće forme, urađen je imunoblot. Ara h 2, koji je izolovan pri uslovima koji inhibiraju proteaze, je analiziran 2D elektroforezom i pokazao je po dve tačke i za Ara h 2.01 i za Ara h 2.02 (Slika 29a), što odgovara pikovima prethodno identifikovanim masenom spektrometrijom (prikazani na slici 4b). 2D imunoblot razvijen sa serumima subjekata alergičnih na kikiriki pokazao je prisustvo istih tačaka za Ara h 2.01 i Ara h 2.02 (Slika 29b) kao i elektroforetski profil.



Slika 29: Analiza Ara h 2 izolovanog pod uslovima koji inhibiraju proteaze: a) 2D elektroforeza, MM - molekularni markeri; b) imunoblot istog uzorka razvijen sa humanim serumima, MM - molekularni markeri. 1, 1' - Ara h 2.01 izoforme; 2, 2' - Ara h 2.02 izoforme.

6.4. Diskusija

Tokom ovih eksperimenata izolovan je Ara h 2 u prisustvu ili odsustvu inhibicije proteaza da bismo ispitali da li dolazi do proteolitičke obrade. Pokazano je da Ara h 2 podleže proteolizi od strane proteaze kikirikija na sličan način kao Ara h 6 i da ova proteolitička obrada podrazumeva uklanjanje dipeptida sa C-terminusa obe Ara h 2 izoforme. Osim toga, ispitivana je i sposobnost ovih procesovanih oblika da vežu humani IgE, i pokazano je da se IgE vezujući kapacitet kraćih formi Ara h 2.01 i Ara h 2.02 ne menja. U uslovima izolovanja

Ara h 2 koji nisu uključivali i inhibiciju proteaza koja se prirodno nalazi u kikirikiju, detektovana je dodatna proteoliza kojom su uklonjeni pojedinačni tirozini sa C-terminusa intaktnih Ara h 2.01 i Ara h 2.02.

Poseban akcenat je stavljen na karakterizaciju 2S albumina kikirikija. Među alergenima kikirikija koji spadaju u familiju 2S albumina, Ara h 2 i Ara h 6 su najviše potentni u indukciji degranulacije u funkcionalnom *in vitro* testovima, kao što je pokazano, na primer, sa ćelijama bazofilne leukemije pacova koje su senzibilisane IgE antitelima izolovanim iz seruma alergičnih pacijenata (Blanc, F., Adel-Patient, K. et al. 2009; Porterfield, H. S., Murray, K. S. et al. 2009). Molekularno-biološka istraživanja Ara h 6 su istakla da različite varijante ovog alergena mogu biti posledica zamene samo jedne aminokiseline (Ramos, M. L., Fleming, G. et al. 2006). Dva izoforme Ara h 6 su intenzivno karakterisali Bernard i sar. (Bernard, H., Mondoulet, L. et al. 2007). Obe izoforme potiču od iste genske varijante koja kodira Ara h 6, ali jedna od njih je proteolitički proizvod translirane sekvence. Dalja obrada u zreli formu nastaje proteolizom na ASA-MR za Ara h 6 i ASA-RQ mestu raskidanja za Ara h 2 (Suhr, M., Wicklein, D. et al. 2004; Ramos, M. L., Fleming, G. et al. 2006). Bernard i sar. (Bernard, H., Mondoulet, L. et al. 2007) su pokazali da se sazrevanje Ara h 6 nastavlja sa uklanjanjem dipeptida IR, što na kraju dovodi do prevođenja Ara h 6 u formu heterodimera. Zreli heterodimer, proizvod proteolitičke obrade, prisutan je kikirikiju zajedno sa neobrađenom formom i ne pokazuje promene u vezivanju IgE antitela (Bernard, H., Mondoulet, L. et al. 2007).

I za Ara h 2 i za Ara h 6, koji su izolovani pod uslovima u kojima su proteaze inhibirane, pokazano je da postoje u ekstraktu kikirikija kao smeša različitih izoformi. Međutim, za Ara h 2.01 i Ara h 2.02 izoforme jedina do sada u literaturi prijavljena proteolitička obrada uključuje uklanjanje signalnih peptida (Viquez, O. M., Summer, C. G. et al. 2001). U ovoj studiji dobili smo slične rezultate onima koje su Bernard i sar. (Bernard, H., Mondoulet, L. et al. 2007). pokazali za Ara h 6: da su proteolitički obrađene izoforme Ara h 2 prisutne u ekstraktima kikirikija. Proteaze uključene u sazrevanje Ara h 2 su verovatno iste proteaze uključene u sazrevanje Ara h 6, jer je u slučajevima oba proteina, uklonjen dipeptid koji sadrži jednu baznu (R) i jednu voluminoznu

aminokiselinu (I ili Y), i uklanjanje ovog dipeptida dešava se na C-terminalnom kraju asparaginske kiseline. Vakuolarni enzimi uključeni u sazrevanje rezervnih proteina semena raskidaju peptidnu vezu na C-terminalnom kraju asparaginske kiseline (Barre, A., Borges, J. P. et al. 2005; Flinterman, A. E., Knol, E. F. et al. 2008) i mogu biti odgovorni za ovu vrstu obrade proteolizom Ara h 2 i Ara h 6. Takođe, ova vrsta proteolitičkog procesovanja ne može biti uočena uobičajenom 1D elektroforezom zbog veoma male promene u molekulskoj masi kraćeg oblika, u poređenju sa neobrađenom sekvencom. Međutim, kako uklanjanje dipeptida dovodi do eliminacije veoma bazne aminokiseline (arginin) i menja izoelektričnu tačku (pI) ka kiselijoj pH vrednosti, promena u pI bila je dovoljna da omogući razdvajanje i vizualizaciju ovih oblika u 2D elektroforezi.

Maseni spektri, koji zavise od uslova izolovanja, su dobijeni za Ara h 2. Pod uslovima u kojima aktivnost proteaza prisutnih u plodovima kikirikija nije inhibirana, uočena je proteoliza na C-terminusu Ara h 2 kojom se uklanja isključivo jedan aminokiselinski ostatak. Ovim kraćim formama Ara h 2.01 i Ara h 2.02 nedostaje jedan aminokiselinski ostatak, te stoga nisu mogle biti identifikovane 1D ili 2D elektroforezom zbog veoma male promene molekulske mase (163.22 Da). Zato je uklanjanje samo tirozina sa C-terminusa moglo biti detektovano isključivo metodom masene spektrometrije, implicirajući da je C-terminus i da su ove dve Ara h 2 izoforme sklonije proteolizi nego Ara h 6 (kod kog procesovanje sa C-terminusa nije uočeno). Osim toga, slabija podložnost Ara h 6 proteolizi eventualno može objasniti dosadašnje rezultate, koji upućuju da je Ara h 6 potentniji alergen od Ara h 2 (Blanc, F., Adel-Patient, K. et al. 2009).

Genske sekvence Ara h 2 i Ara h 6 umnožene PCR-om, koje su dobijene u ovoj studiji, su u saglasnosti sa onima koji su već dostupne u GenBank bazi genskih sekvenci i korišćene su za modelovanje tercijarne strukture. Mesta na kojima se odvija proteolitička obrada Ara h 2.01 i Ara h 2.02 nalazi se na C-terminusu i nema dramatičan uticaj na strukturu proteina, jer u ovom regionu nema izračunatih i definisanih sekundarnih struktura. 3D model tercijarne strukture Ara h 2 sastoji se od kompaktnog jezgra na kom se nalaze svi IgE-vezujući epitopi i do sada nisu identifikovani IgE-vezujući epitopi na C-terminusu

(Stanley, J. S., King, N. et al. 1997; Barre, A., Borges, J. P. et al. 2005; Flinterman, A. E., Knol, E. F. et al. 2008). Dakle, može se pretpostaviti da ovakav vid proteolitičke obrade ne utiče na vezivanje IgE antitela za Ara h 2. Zaista, C-terminalna proteolitička obrada Ara h 2.01 i Ara h 2.02 izoformi ne menja IgE-vezujući potencijal kraćih formi, kao što je pokazano 2D imunoblotom (Slika 29), i ovi rezultati su u saglasnosti sa predviđenim svojstvima Ara h 2. Stoga, kraće forme Ara h 2.01 i Ara h 2.02 mogu podjednako izazvati imunski odgovor kod osoba osjetljivih na kikiriki kao i njihove duže forme.

Za proteolitičko procesovanje C-terminusa Ara h 2 proteina kikirikija možemo da zaključimo da dovodi do proizvodnje dva izoalergena molekulske mase 16.34 i 17.71 kDa, koje su prisutne u kikirikiju zajedno sa neprocesovanim formama (molekulskih masa 16.66 i 18.03). Ova proteoliza nije dovela do promena u vezivanju IgE antitela, što pokazuje da alergenosti 2S albumina kikirikija doprinose sve prisutne izoforme, uključujući i proteolitički procesovane forme.

7. Uticaj proteolize u digestivnom traktu na alergenost proteina mleka

7.1. Uvod

Alergija na hranu je čest zdravstveni problem koji proizilazi iz narušene prirodne imunološke tolerance na komponente hrane.

Proteini hrane se mogu svrstati u dve grupe: proteine otporne na digestiju – klasa 1 (pravi alergeni koji mogu da izazovu direktnu oralnu senzitivaciju), ili labilne alergene klase 2 (nesenzitišući izazivači takozvanog oralnog alergijskog sindroma) (Cirkovic Velickovic, T., Radosavljevic, J. et al. 2009). Oralni alergijski sindrom predstavlja alergijsku reakciju lokalizovanu na usnu duplju usled senzitivacije proteinima polena ili lateksa, a kontakt sa ukrešteno reaktivnim nekompletnim alergenom pokreće lokalnu alergijsku reakciju. Stoga, senzitišući potencijal hrane očigledno odražava stanje želudačne proteolize.

Glavna proteaza digestivnog sistema ljudi je pepsin, aspartat proteaza koji ima pH optimum oko 2. Povećanje pH ka 7 dovodi do značajnog smanjenja katalitičke aktivnosti pepsina, ali takođe može da utiče na jonizaciona svojstva supstrata, ili „džepa“ za vezivanje supstrata na samom enzimu. Takve promene mogu izmeniti supstratnu specifičnost pepsina, što dovodi do stvaranja različitih peptida poreklom iz supstrata. Varenje u želucu značajno smanjuje potencijal proteina hrane da vežu IgE, što povećava minimalnu dozu alergena potrebnu da izazove simptome kod pacijenata sa alergijom na hranu. Za neke alergene koji su manje podložni digestiji pepsinom, ovakav tretman generiše veće peptide, koji ostaju dalje nedigestovani i sposobni da indukuju senzitivaciju (Bogh, K. L., Kroghsbo, S. et al. 2009).

Testovi digestije u simuliranom želudačnom fluidu, uvedeni su za *in vitro* karakterizaciju proteina hrane da bi se oponašao efekat proteolize u želucu

proteina hrane, kao i novih proteina (Ladics, G. S. 2008; Ladics, G. S. and Selgrade, M. K. 2008; Thomas, K., Herouet-Guicheney, C. et al. 2008; Wickham, M., Faulks, R. et al. 2009).

pH vrednost u želucu tokom varenja može varirati u zavisnosti od starosti, korišćenja medikamenata, dodataka ishrani i aditiva, ili jednostavno zbog puferskih svojstva hrane, u slučaju preopterećenja hranom.

Promene u želudačnoj sredini su česte u toku života ili fiziološki, posebno u toku ranog životnog doba ili kao rezultat gastrointestinalnih patologija. Pored toga, antacidi se često koriste za lečenje poremećaja varenja. Povećanjem želudačne pH vrednosti, oni značajno interferiraju sa digestivnom funkcijom želuca, što dovodi do preživljavanja, inače pepsinolizi podložnog, proteina tokom želudačne faze varenja. Zaista, i mišje i ljudske studije pokazuju da antiulcerski lekovi povećavaju rizik od indukcije alergija na hranu (Untersmayr, E. and Jensen-Jarolim, E. 2008).

pH utiče ne samo na aktivnost pepsina, već i na rastvorljivost i agregaciono ponašanje mnogih proteina hrane. Nije iznenađujuće što su mnoge studije na miševima pokazale uticaj promene pH želuca i na senzitivaciju i na indukciju oralne tolerancije na proteine hrane (Pali-Scholl, I., Yildirim, A. O. et al. 2008; Riemer, A. B., Gruber, S. et al. 2010).

U nedavnoj studiji na miševima, pokazano je da antacidi i dodaci ishrani koji utiču na pH vrednost u želucu povećavaju rizik za senzitivaciju na alergene proteine hrane (Pali-Schöll, I., Herzog, R. et al. 2010). Pretpostavljeno je da osobe sa oralnim alergijskim sindromom (OAS) reaguju na alergene podložne pepsinolizi, dok pacijenti koji imaju sistemske reakcije reaguju na proteine otporne na digestiju pepsinom. U studiji koja je procenjivala digestibilnost proteina kivijsa u simuliranom želudačnom fluidu (SGF), efekat pH na digestiju proteina kivijsa je takođe ispitana. Povećanje pH od 1.5 do 2.5 značajno smanjuje degradaciju alergena kivijsa u prisustvu pepsina. Digestija proteina kivijsa pepsinom je narušena u uslovima u kojima je povećana pH vrednost, i upućuje da pacijenti sa hipoaciditetom želuca imaju povećan rizik za sistemske apsorpciju alergena (Bublin, M., Radauer, C. et al. 2008). Nedavna studija je

dopunila ova tvrđenja pokazujući da *in vivo* digestija homogenata pektinom bogatog voća, kivija, takođe dovodi do smanjenja aciditeta (Polovic, N., Obradovic, A. et al. 2010).

S druge strane, pH rastvora ima direktan uticaj na jonizacione osobine aminokiselinskih ostataka na površini proteina. Te interakcije najčešće stabilizuju specifične konformacije kompaktnih proteina. Glavni alergen surutke BLG ima kompaktnu globularnu strukturu, čija konformacija, pa čak i stepen agregacije, zavisi od pH rastvora. Promena sekundarnih struktura može se takođe uočiti na ovom kompaktnom proteinu pri promeni pH. S ozirom da je stabilizovan sa nekoliko disulfidnih veza, struktura BLG je toliko kompaktna, da je ovaj protein poznat kao jedan od najotpornijih proteina hrane na varenje pepsinom. Pošto ovaj protein nije lako podložan digestiji pepsinom, na pH vrednosti koja je u crevima dolazi do digestije proteazama izlaganjem mesta podložnih proteolizi (Partanen, R., Torkkeli, M. et al. 2011; Yan, Y., Seeman, D. et al. 2013).

Sa druge strane, kazeini su najzastupljeniji su proteini mleka, i njihova karakteristika je da poseduju fleksibilnu trodimenzionalnu strukturu i (Nieuwenhuizen, W. F., Dekker, H. L. et al. 2003). Sposobnost kazeina da formiraju micle nakon zakišeljavanja (Dalglish, D. G. and Corredig, M. 2012) može uticati na proces digestije ovih proteina. Takođe, u složenom matriksu kakav je mleko, može se očekivati da je pepsinoliza donekle usporena ne samo zbog prisustva velike količine proteina, već i zbog velike količine lipida. U eksperimentalnim uslovima pokazano je da prisustvo fosfolipida usporava digestiju ALA (Moreno, F. J., Mackie, A. R. et al. 2005), što bi moglo uputiti na izmenjenu digestiju u uslovima koji vladaju *in vivo*.

7.2. Materijal i metode

7.2.1.1.1. Hemikalije i standardi

Ukoliko nije drugačije navedeno, sve hemikalije je proizvela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD) i bile su analitičke čistoće ili bolje. Sveže kravlje mleko (fizički i hemijski netretirano) je nabavljeno od lokalnog proizvođača.

7.2.1.1.2. Prečišćavanje BLG i ALA

Sirovo mleko je centrifugirano na $4000 \times g$ tokom 30 min na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon mehaničkog uklanjanja lipidnog čepa kazein je taložen na pH 4.6 korišćenjem 50% sirćetne kiseline. Posle centrifugiranja na $4000 \times g$ za 30 min supernatant, surutka, je sakupljen i dodatno odmašćen ekstrakcijom sa ugljen tetrahloridom (CCl_4). Surutka i CCl_4 su pomešani u odnosu 3 : 1 (v/v) i centrifugirani na $12000 \times g$ tokom 15 min. Dobijena surutka je sakupljena i dijalizovana naspram 20 mM Tris pufera (pH 7.5) na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ tokom 48 h.

7.2.1.1.3. Anjonska jonoizmenjivačka hromatografija

DEAE-Sephadex-G50 je aktiviran za anjonsku jonoizmenjivačku hromatografiju u skladu sa uputstvima proizvođača. Aktiviran matriks je ekvilibrisan u 20 mM Tris puferu (pH 7.5). Staklena kolona $2.5 \times 20\text{ cm}$ je napakovana sa 70 mL dobijenog gela. Dijalizovana surutka (130 mL, koja sadrži 6 mg/mL proteina) je naneta na kolonu pri protoku 1 mL/min. Nevezani proteini su isprani sa 100 mL pufera za ekvibraciju. Vezani proteini su isprani sa kolone koristeći step eluciju, sa po 100 mL pufera za ekvibraciju koji sadrži NaCl (40-280 mM), pri brzini protoka od 2 mL/min. Frakcije od 20 mL su sakupljene i analizirane SDS-PAGE-om.

7.2.1.1.4. Dobijanje antitela na proteine surutke

Antiserum na proteine surutke dobijen je imunizacijom zeca koji je gajen u vivarijumu Instituta za imunologiju, vakcine i serume – Torlak, Beograd, a prema Harboe i Ingild proceduri (Harboe, N. and Ingild, A. 1973). Za

imunizaciju je korišćena frakcija dobijena jonoizmenjivačkom hromatografijom proteina surutke, koja je sadržavala ~30% BLG i ~70% ALA (prema SDS-PAGE). Emulzija kojom je imunizovan zec prilikom prve imunizacije je pripremljena dodatkom jednake količine Freund-ovog kompletnog adjuvansa rastvoru antigena, dok je za svaku sledeću imunizaciju korišćen nekompletni Freund-ov adjuvans. Zec je imunizovan subkutano u predelu leđnog regiona sa po 0.1 mL emulzije na četiri mesta. Imunizacija je izvršena 0, 7, 14, 21, i 28. dana, a posle na svakih 14 dana (ukupno 8 imunizacija). Trideset petog dana i svake druge nedelje od tada zečevi su krvareni iz ušne vene. Iz dobijene zečje krvi odvajan je serum koji je prečišćen taloženjem sa amonijum sulfatom (50% finalna koncentracija). Talog antitela je dijalizovan naspram PBS-a tokom 3 dana i zatim odmašćen centrifugiranjem sa CCl_4 . Antitela su zatim pomešana sa glicerolom do finalne koncentracije od 50% i čuvana na $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

7.2.1.1.5. Digestija ALA i BLG pepsinom na različitim pH vrednostima

Digestija proteina pepsinom je izvedena u 0.1 M HCl sa 2 g/L natrijum hlorida, na pH 1.2, sa finalnom koncentracijom proteina od 0.25 mg/mL (određeno spektrofotometrijski) i aktivnošću pepsina 2300 U/mL (1 mg/mL) (Thomas, K., Aalbers, M. et al. 2004). Alikvoti su uzeti u 1, 5, 10, 15, 30, 45, i 60 min, a reakcije su zaustavljene dodavanjem 0.2 M natrijum karbonata. pH posle dodavanja 2 M natrijum karbonata je 8.1. Za pH=2.5 korišćen je 0.4 M glicinski pufer, a za pH=4.0 0.4 M acetatni pufer. Pepsinolički profili su analizirani na 14% SDS-PAGE pod redukujućim uslovima prema referenci (Laemmli, U. K. 1970).

7.2.1.1.6. ESI-MS analiza BLG nakon digestije pepsinom

Za analizu masenom spektrometrijom pripremljene su reakcione smeše zapremine 1 mL i nakon 45 min reakcija je zaustavljena. Uzorci su podvrgnuti razdvajanju reverzno-faznom hromatografijom na Discovery BIO Wide Pore C5 (10 cm × 4.6 cm) koloni (Supelco, Sigma-Aldrich). Za eluiranje korišćeni su sledeći rastvori: kao eluent A 0.1% TFA (trifluorosirćetna kiselina), a kao eluent

B 0.1% TFA u 90% acetonitrilu. Elucija je rađena pri protoku od 0.75 mL min⁻¹ linearnim gradijentom, sa postepenim povećanjem od 0 do 100% tokom elucije B tokom 10 zapremina kolone. Elucija je praćena merenjem apsorbanca na 280 i 215 nm. Frakcije dobijene razdvajanjem na C5 RPC koloni su uparene do suva vakuum centrifugiranjem na sobnoj temperaturi u vakuum isparivaču (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i rastvorene su u 0.1% mravljoj kiselini u 50% acetonitrilu pri finalnoj koncentraciji od 0.6 mg/mL. Merenja mase proteina su izvedena na MS sistemu koji se sastoji od of 6210 Time-of-Flight LC/MS (G1969A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States) i uzorci rastvoreni u mobilnoj fazi su uvedeni preko 1200 Series HPLC system (Agilent Technologies). Agilent MassHunter Workstation Software (Agilent Technologies) je korišćen za prikupljanje podataka, a Agilent MassHunter Workstation Software i Analyst QS su korišćeni za analizu podataka.

7.2.1.1.7. Životinje

Sve procedure koje su uključivale životinje i njihovu brigu su odobrene od strane Etičkog odbora Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ , Beograd, Srbija.

Mušjaci Wistar pacova stari 8 nedelja su dobijeni sa farme Vojnomedicinske akademije (Beograd, Srbija). Tokom petodnevnog perioda aklimatizacije po 3-4 pacova je smešteno u standardne kaveze sa slobodnim pristupom hrani i vodi u prostoriji u kojoj su održavani temperatura (22 ± 2 °C) i dvanaestočasovni ciklus svetlo/mrak.

7.2.1.1.8. Protokol gavaže i priprema sadržaja želuca za biohemijske analize

Dvanaest pacova je nasumično raspoređeno u dve grupe, od kojih je svaka imala po 6 životinja. Tokom 24 h nisu unosili hranu, ali su imali slobodan pristup vodi. Na dan eksperimenta svesne životinje su podvrgnute gavaži (110 mm iglom sa zaobljenim šupljim vrhom) sa 1 mL sirovog mleka, odnosno sa 1 mL česemske vode (kontrolna grupa).

Pacovi su žrtvovani 1 h posle gavaže intraperitonealnom injekcijom natrijum pentobarbitala (Nembutal, Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA), doze od 150 mg/kg. Centralni rez je napravljen u trbušnom zidu i sadržaj organa je zatim potpuno ispražnjen i prebačen u prethodno izmerenu plastičnu vaju, ponovo izmeren i čuvan na -80 °C do određivanja različitih parametara.

7.2.1.1.9. Ekstrakcija proteina iz sadržaja odeljaka gastrointestinalnog trakta pacova

Uzorci želuca su resuspendovani u 1 mL 200 mM Tris pH 8.0, uz dodatak 200 µL 1.5 M Tris pH 8.8, sonifikovani 5 min i centrifugirani. Dobijeni supernatanti su ekstrahovani dva puta ugljen tetrahloridom (u odnosu 3 : 1), centrifugirani 10 min na 13400 rpm i čuvani na -80 °C.

7.2.1.1.10. SDS-PAGE

Pojedinačni uzorci želudaca su pomešani sa puferom za uzorke (u odnosu 4:1) i kuvani tokom 5 min na 95 °C. Komponente su razdvojene na 16% poliakrilamidnim gelovima pod redukujućim uslovima zajedno sa standardnom smešom proteina kao referencom za molekulske mase (Fermentas, Vilnius, Litvanija). Gelovi su obojeni bojom Coomassie Brilliant Blue R-250 radi vizualizacije razdvojenih proteina. U svaki bunar je naneto po 40 µL pripremljenog uzorka.

7.2.1.1.11. Detekcija ALA i BLG imunoblotom

Nakon elektroforetskog razdvajanja, uzorci želudaca su prebačeni na nitroceluloznu membranu koristeći sistem za elektrotransfer (Serva, Heidelberg, Nemačka). Efikasan prenos na membranu potvrđen je bojenjem rastvorom 0.5% Ponceau S boje tokom 15 min. Nitrocelulozna membrana je obezbojena ispiranjem TTBS-om (30 mM Tris pH 7.4 koji sadrži 0.9% NaCl i 0.1% Tween 20). Membrana je blokirana 4%-nim rastvorom želatina u TTBS-u preko noći. Zatim je inkubirana sa poliklonskim antitelima na proteine surutke razblaženim 1:10000 u 1% želatinu u TTBS-u radi ispitivanja vezivanja antitela za proteine prisutne u želudačnom sadržaju. Vezana IgG antitela detektovana su

korišćenjem anti-zečjeg antitela kuplovanog sa alkalnom fosfatazom (ABD Serotec, Oksford, Ujedinjeno Kraljevstvo), razblaženim u 1% želatinu u TTBS-u u razblaženju preporučenom od strane proizvođača. Obrasci vezivanja vizualizovani su rastvorom supstrata koji se sastoji od 1.5 mg BCIP (5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat) i 3 mg NBT (nitro blue tetrazolium) u 10 mL 100 mM Tris puferu koji sadrži 150 mM NaCl i 5 mM MgCl₂, pH 9.6.

7.2.1.1.12. Određivanje pH vrednosti u sadržajima želuca

Alikvoti od po ~0.2g sadržaja želuca inkubirani su sa po 1 mL 10 mM KCl na sobnoj temperaturi uz mešanje u termošejkeru (500 rpm). Posle 10 min, uzorci su centrifugirani na 10000 g u trajanju od 5 min. U supernatantima je izmerena pH vrednost na digitalnom pH metru sa staklenom elektrodom.

7.2.1.1.13. Određivanje aktivnosti pepsina u sadržajima želuca

Određivanje aktivnosti pepsina u sadržajima želuca urađena je standardnim hemoglobinskim testom. Princip testa se zasniva na merenju solubinih peptida nastalih dejstvom pepsina na hemoglobin, posle precipitacije proteina sa TCA i centrifugiranja. Jedinica enzimske aktivnosti (U) pepsina definisana je kao $\Delta A_{280} \text{ nm} = 0.001$ po 1 min u kiveti širine 1 cm na 37 °C koja potiče od produkata solubilnih u TCA uz hemoglobin kao supstrat.

Ukratko, 100 μL želudačnih sadržaja resuspendovanih u 10 mM KCl i 100 μL 10 mM HCl je dodato u tubu. Tube su dopunjene sa 400 μL 2,5% goveđeg hemoglobina (Sigma Aldrich) u dejonizovanoj vodi za određivanje aktivnosti pepsina. Reakcija je zaustavljena tačno nakon 10 min dodavanjem 1 mL 5% TCA u dejonizovanoj vodi. Posle centrifugiranja na 10000 x g tokom 20 min, apsorbanca na 280 nm je izmerena u supernatantima. Slepa proba je pripremljena na identičan način, samo što je želudačni sadržaj dodat posle rastvora TCA.

7.2.1.1.14. Statistička analiza

Podaci u grafikonima su prikazani kao srednja vrednost za grupu \pm standardna greška srednje vrednosti. Analiza podataka je izvedena pomoću GraphPad Prism softvera (La Jolla, CA, SAD). Pre statističke analize, vrednost iz *in vivo* studija su provereni Grubbs-ovim testom za odstupanje. Podaci su analizirani dvostranim t-testom. Razlike su smatrane značajnim kada su p-vrednosti < 0.05

7.2.1.1.15. Analiza peptida mleka nakon digestije u želucima pacova masenom spektrometrijom

Ekstrakti želudaca pacova su prečišćeni na Supel-Tips C18 Pipette Tips (Supelco, Sigma-Aldrich) prema uputstvu proizvođača. Zatim su upareni do suva vakuum centrifugiranjem na sobnoj temperaturi u isparivaču (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i rastvoreni u 0.1% mravljoj kiselini u 5 puta manjoj zapremini.

Uzorci su analizirani na Easy nanoLC II povezanim sa LTQ Orbitrap XL. Hromatografija je izvedena na C18 nanokoloni (Thermo scientific, Bremen, Germany; I.D. 75 μm , dužina 100 mm, veličina čestica 2.2 μm) sa linearnim gradijentom rastvarača (5-70% B tokom 60 minuta, A - 0.1% mravlje kiseline, B - 0.1% mravlje kiseline u 2% acetonitrilu). Napon spreja je podešen na 1.8kV, sa emiterom od nerđajućeg čelika. Temperatura kapilare je podešena na 275 ° C. FTMS rezolucija je postavljena na 30 000, sa zavisnim prikupljanjem podataka prvih 5 pikova, za m/z opseg 300-4000. Omogućena je dinamička ekskluzija, sa vremenskim prozorom od 90 sec i tačnošću mase od 10 ppm. Podaci su obrađeni Proteome Discoverer 1.3 softverom (Thermo Finnigan LLC), koristeći Sequest pretragu baze podataka spram prilagođene FASTA baze podataka svih sekvenci proteina mleka sa UniProt-a. Preciznost mase je bila postavljena na 10 ppm za FTMS i 0.8 Da za jonsku zamku.

7.2.1.1.16. Digestija svežeg mleka u uslovima koji oponašaju digestiju in vivo uslova

Digestija svežeg mleka pepsinom je izvedena na sledeći način: alikvotu mleka je podešena pH vrednost dodatkom 3 M HCl na 3.6 ± 0.1 i dodat je pesin u finalnoj koncentraciji od 2320 U/mL, tako da je finalna zapremina mleka povećana 10%. Reakcija je zaustavljena dodatkom 2 M natrijum karbonata nakon 1, 5, 10, 30, 45, 60, 90, 120, 180 i 240 min. Uzorci su odmašćeni ekstrakcijom dva puta ugljen tetrahloridom, centrifugirani 10 min na 13400 rpm i čuvani na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pepsinolitički profili su analizirani na SDS-PAGE i imunoblotom kao i uzorci ekstrakata želudačnih sadržaja. Kontrolni uzorak je sadržavao istu količinu 3 M HCl i pepsina u vodi, a pH vrednost je podešena da bude 3.6 ± 0.1 dodavanjem 6 M NaOH.

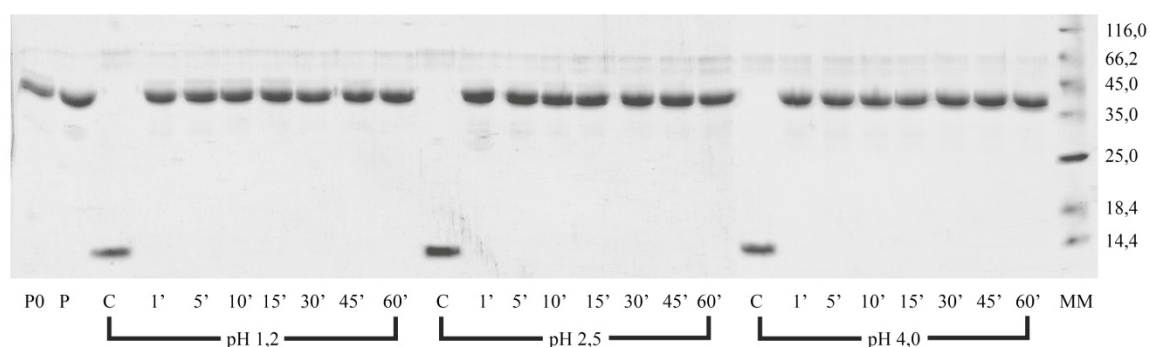
7.2.1.1.17. Vezivanje peptida dobijenih digestijom za humani IgE

Sveže mleko je digestovano pepsinom tokom 1 sata u uslovima koji odgovaraju *in vivo*, a zatim zamrznuto. Nakon odmašćivanja, peptidna frakcija, koja je sadržavala peptide manje od 3 kDa je dobijena centrifugalnom filtracijom kroz membranu sa limitom od 3 kDa. Kontrolni uzorak je sadržavao peptide dobijene autoproteolizom pepsina i pripremljen je na isti način kao i peptidi mleka. Dobijene frakcije su liofilizovane, rastvorene u 5 puta manjoj zapremini vode i inkubirane sa smešom humanih seruma pacijenata alergičnih ($\sim 25\text{ kU/L}$ IgE) na mleko preko noći na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, u odnosu 1:1. Nivoi IgE antitela specifičnih za mleko, kazein, ALA i BLG, nakon inkubacije sa peptidima su mereni na ImmunoCAP[®] 100 sistemu (Pharmacia Diagnostics, Upsala, Švedska) koristeći kodove f2, f78, f76 i f77, redom.

7.3. Rezultati

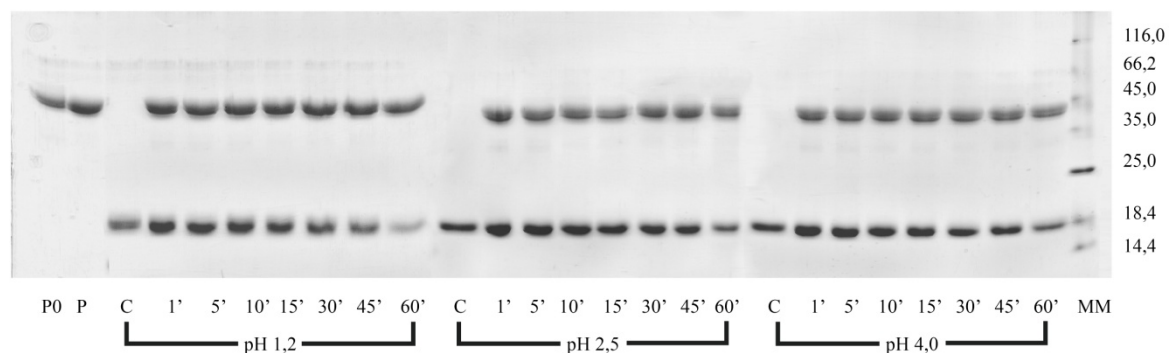
7.3.1.1. Uticaj pH vrednosti SGF na digestiju BLG i ALA

Iako je čest alergen mleka, α -laktalbumin u simuliranim uslovima želudačne digestije biva degradovan od strane pepsina vrlo brzo; već u prvim minutima. Naši rezultati pokazuju da prečišćeni ALA u simuliranim uslovima želudačne digestije, nevezano od pH vrednosti na kojoj je digestija rađena, ima podjednaku podložnost hidrolizi (Slika 30). Naime, i na pH 1,2, pH 2,5 i pH 4 ovaj protein biva potpuno degradovan od strane pepsina.

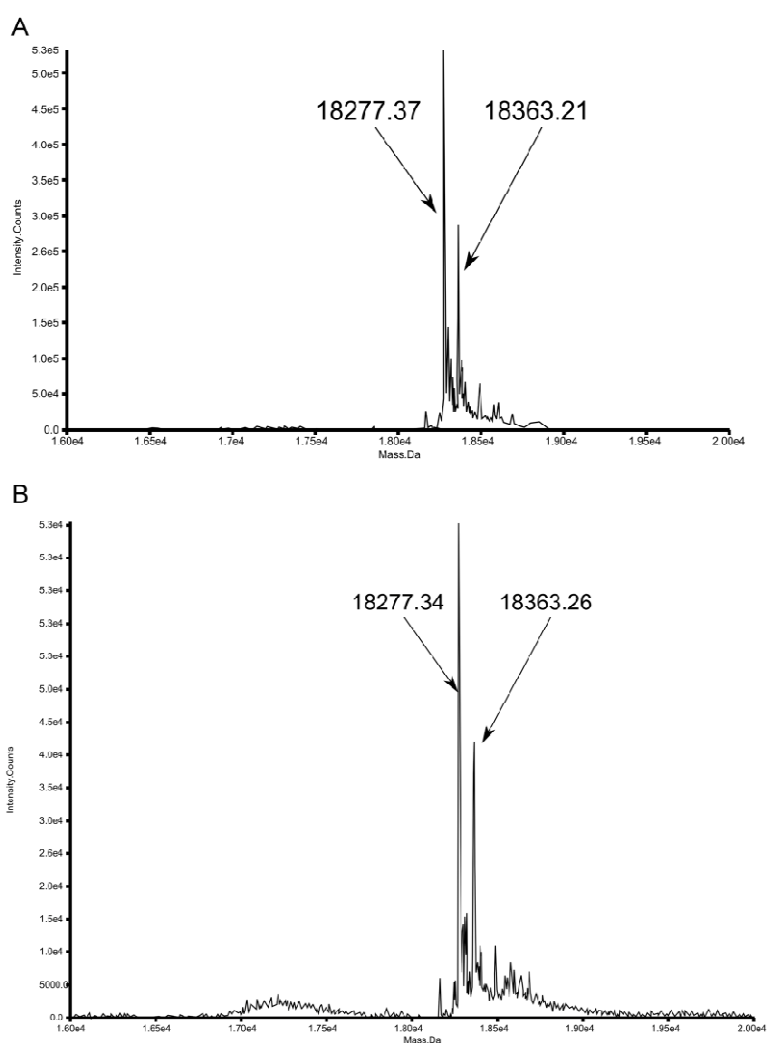


Slika 30: Digestija ALA pepsinom na različitim pH vrednostima. C-kontrola proteina, Po - pepsin u trenutku t=0 min, P – pepsin u 60 min, MM – molekularni markeri.

β -laktoglobulin je protein za koji je karakteristična izuzetna stabilnost u pogledu digestije pepsinom, i ovaj protein zadržava ovo svojstvo u svim ispitivanim uslovima. Iako u primenjenom opsegu pH BLG podleže strukturnim promenama, one ne dovode do značajnih promena u podložnosti pepsinolizi. U slučaju digestije pepsinom, BLG preživljava sat vremena nezavisno od pH, ali sa porastom pH, digestija se blago usporava što se može zaključiti na osnovu analize elektroforetskog profila (Slika 31).



Slika 31: Digestija BLG pepsinom na različitim pH vrednostima. C-kontrola proteina, P0 - pepsin u trenutku $t=0$ min, P – pepsin u 60 min, MM – molekularni markeri



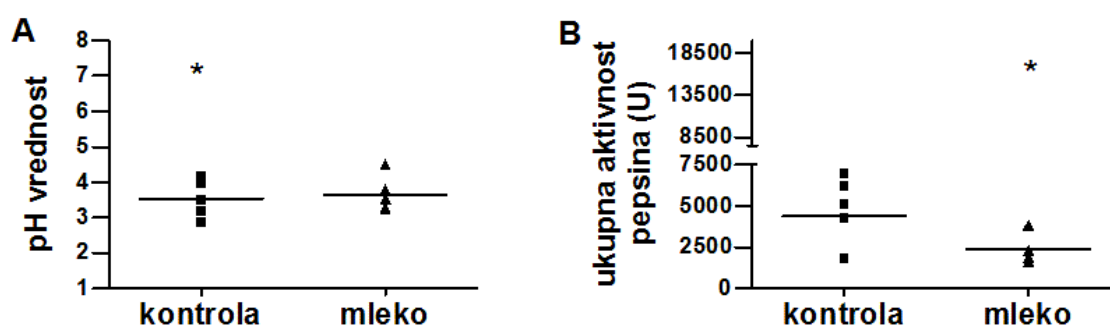
Slika 32: Maseni spektri A) BLG-a digestovanog pepsinom na pH=1.2 i B) kontrolnog uzorka BLG-a. Spektri dobijeni analizom BLG-a digestovanog na pH 2.3 i 4 su bili isti kao i spektar kontrolnog uzorka (nije prikazano).

Da bismo proverili da li je u ovim uslovima BLG zaista intaktan ili dolazi do uklanjanja malog broja aminokiselina i do promene u masi koja ne može da se detektuje SDS-PAGE-om, ponovljene su digestije i analizirane masenom spektrometrijom (Slika 32). Iako je pokazano da N-terminalni kraj BLG podložan hidrolizi od strane proteaza koje se nalaze kao kontaminacije u preparatima oksidativnih enzima mikrobiološkog porekla (Stanic, D., Radosavljevic, J. et al. 2009), kada je u pitanju pepsinoliza, do ovakvog procesovanja ne dolazi i BLG ostaje nepromenjene mase. Bez obzira na kojoj pH vrednosti je rađena digestija, do promene u masi BLG tokom pepsinolize ne dolazi.

7.3.1.2. Pepsinoliza svežeg mleka u želucima pacova *in vivo*

Nakon gavaže svežim mlekom ili vodom, izmerene su pH vrednosti u želucima i dobijene su sledeće vrednosti: za kontrolnu grupu srednja pH vrednost je iznosila 3.5 ± 0.7 (pH vrednost izmerena za jednu životinju je odbačena iz statističke analize zbog velikog odstupanja – iznosila je 7.1), dok je u grupi životinja koje su tretirane mlekom srednja vrednost pH iznosila 3.6 ± 0.8 .

Za kontrolnu grupu životinja određena aktivnost pepsina u želudačnom ekstraktu iznosila je 4011 ± 2961 U, dok je kod životinja koje su tretirane mlekom ona iznosila 2375 ± 1472 (enzimska aktivnost izmerena za jednu životinju je odbačena iz statističke analize zbog velikog odstupanja – iznosila je 17155)

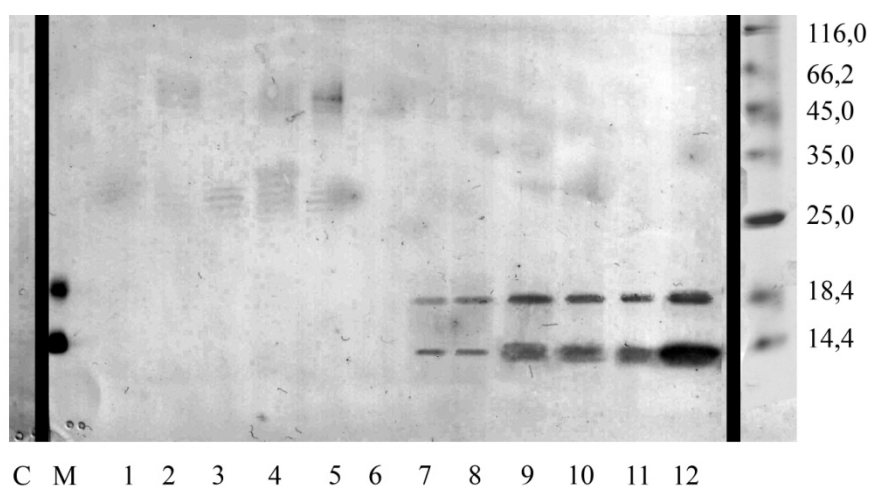


Slika 33: A) izmerene pH vrednosti u želucima kontrolne i grupe tretirane mlekom; B) izmerena ukupna aktivnost pepsina u želucima kontrolne i grupe tretirane mlekom. * označava vrednost koja mnogo odstupa i nije uzeta u obzir prilikom statističke analize. Među grupama nema statistički značajne razlike prema dvostranom t-testu.

Izmerene pH vrednosti i aktivnosti pepsina su prikazane grafički (Slika 33) i analiza dvostranim t-testom nije pokazala značajne razlike u izmerenim vrednostima između kontrolne i grupe životinja tretirane mlekom.

7.3.1.3. Analiza proteina mleka koji preživaljavaju digestiju u želucu pacova

Da bi se utvrdilo koji proteini preživljavaju digestiju u želucima pacova, urađena je SDS-PAGE analiza uzoraka. Međutim, zbog niskog prisustva proteina u ekstraktima, dobijene trake su jako slabo bile vizualizovane, pa je zato prisustvo proteina surutke potvrđeno imunoblotom sa poliklonskim serumom na proteine surutke (Slika 34)



Slika 34: Imunoblot pojedinačnih ekstrakata želudaca: C- kontrola primarnog antitela, M- uzorak mleka, 1-6 ekstrakti želudaca kontrolne grupe životinja, 7-12 ekstrakti želudaca grupe tretirane mlekom

Poliklonska antitela prepoznala su u želucima životinja tretiranih mlekom trake koje odgovaraju ALA i BLG, što je u skladu sa dostupnim podacima. Naime, iako je ALA podložan proteolizi, u mleku zbog prisustva drugih proteina, kao i lipidnog matriksa u kom se nalazi, digestija pepsinom ovog proteina je otežana i on uspeva da opstane duže vreme u želudačnom soku.

7.3.1.4. Analiza peptida dobijenih ekstrakcijom želudačnog sadržaja

Da bismo utvrdili koji peptidi preživljavaju uslove želudačne digestije, želudačni ekstrakt je analiziran masenom spektrometrijom. Peptidi visoke pouzdanosti su prikazani na mapama na kojima su obeleženi potvrđeni IgE-vezujući epitopi (Chatchatee, P., Jarvinen, K. M. et al. 2001; Chatchatee, P., Jarvinen, K. M. et al. 2001; Jarvinen, K. M., Chatchatee, P. et al. 2001; Jarvinen, K. M., Beyer, K. et al. 2002; Cerecedo, I., Zamora, J. et al. 2008).

U želudačnom soku nije identifikovano mnogo peptida izvedenih iz ALA i BLG (Slike 35 i 36). Peptidi koji su identifikovani uglavnom odgovaraju IgE vezujućim epitopima. Mali broj identifikovanih peptida je u saglasnosti sa činjenicom da su ALA i BLG detektovani mahom kao intaktni proteini u ekstraktima želudačnih sadržaja.

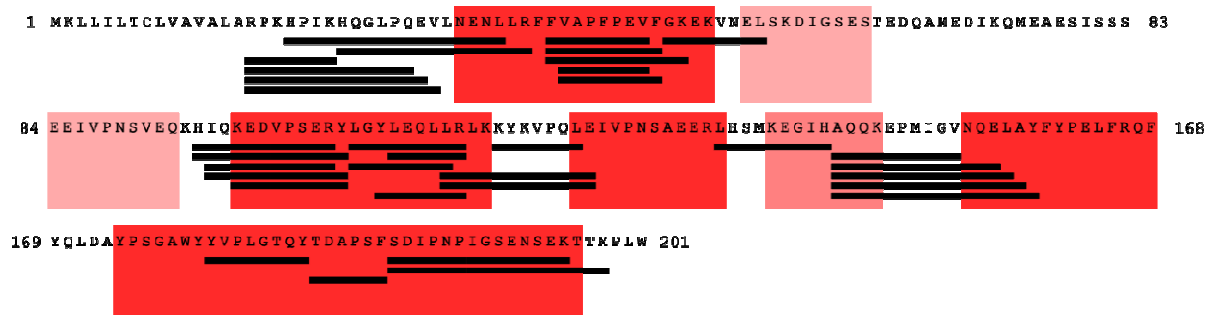
```
1  MMSFVSLLLVGLFPHATQAEQLTKCEVFRRELKDLKGYGGVSLPEWVCTTF 50
51  HTSGYDTQAI VQNNDS TEYGLFQINNKIWCKDDQNP HSSNICNISCDKFL 100
101 DDDLTD DIMCVKKILDKVG INYWL AHKALCSEKLDQWLCEKL 142
```

Slika 35: Peptidi izvedeni iz ALA identifikovani u ekstraktima želudaca. Crvenom bojom su markirani IgE-vezujući epitopi



Slika 36: Peptidi izvedeni iz BLG identifikovani u ekstraktima želudaca. Crvenom bojom su markirani IgE-vezujući epitopi

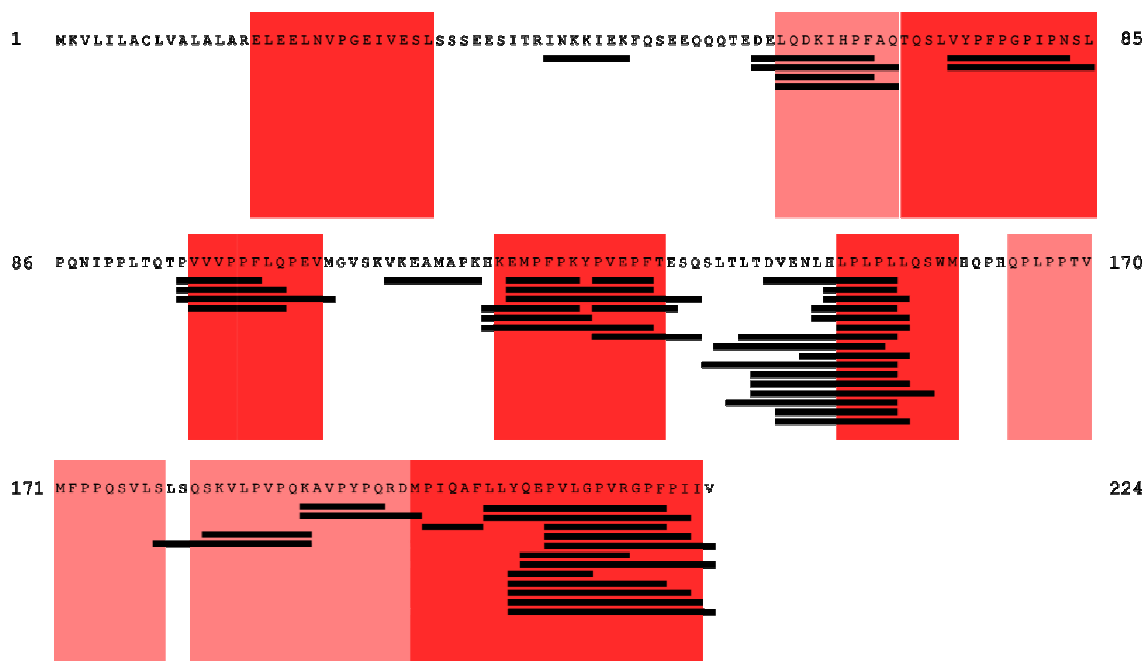
Mnoštvo peptida poreklom iz α s1-, α s2- i β -kazeina je identifikovano u želučnom ekstraktu, i nešto manji broj peptida poreklom iz κ -kazeina (Slike 37, 38, 39 i 40).



Slika 37: Peptidi izvedeni iz α s1-kazeina identifikovani u ekstraktima želudaca. Crvenom bojom su markirani glavni IgE-vezujući epitopi, a roze bojom sporedni IgE-vezujući epitopi



Slika 38: Peptidi izvedeni iz α₂-kazeina identifikovani u ekstraktima želudaca. Crvenom bojom su markirani glavni IgE-vezujući epitopi, a roze bojom sporedni IgE-vezujući epitopi



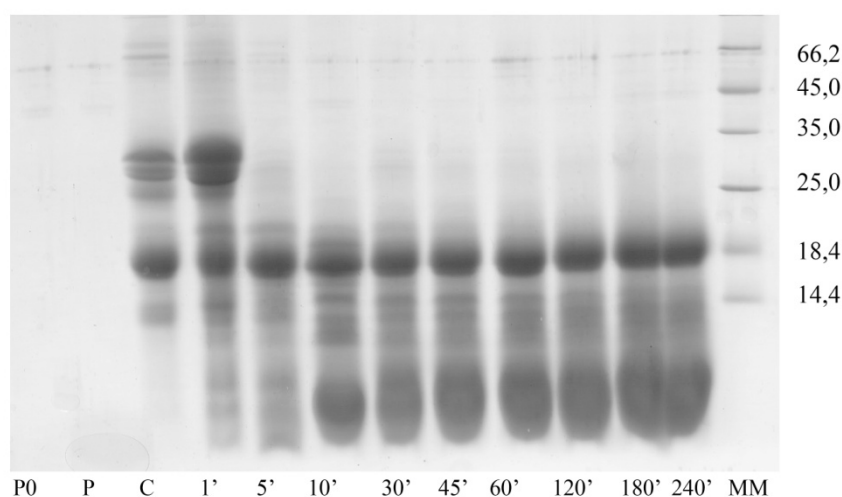
Slika 39: Peptidi izvedeni iz β-kazeina identifikovani u ekstraktima želudaca. Crvenom bojom su markirani glavni IgE-vezujući epitopi, a roze bojom sporedni IgE-vezujući epitopi



Slika 40: Peptidi izvedeni iz κ -kazeina identifikovani u ekstraktima želudaca. Crvenom bojom su markirani glavni IgE-vezujući epitopi

S obzirom da su kazeini podložni hidrolizi pepsinom, nije iznenađujuće da je detektovan veliki broj ovih peptida. Kako većina njih odgovara IgE vezujućim epitopima, može se očekivati da bi ovi peptidi mogli da ispolje svoja imunološka svojstva.

7.3.1.5. Digestija mleka u uslovima koji oponašaju *in vivo* uslove

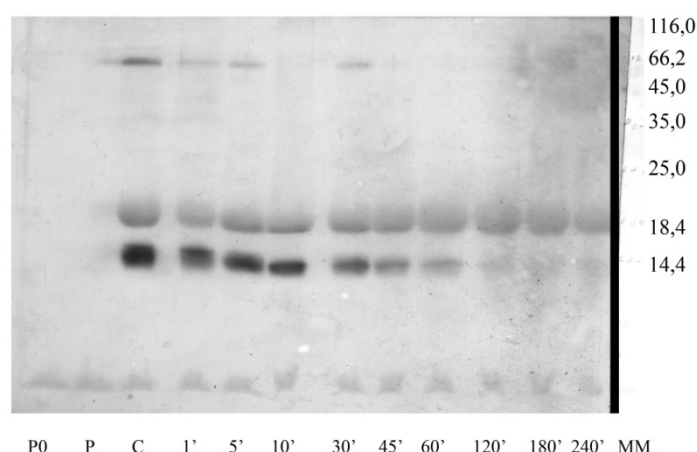


Slika 41: Digestija svežeg mleka u uslovima koji oponašaju *in vivo* uslove: C-kontrola proteina, P0 - pepsin u trenutku t=0 min, P – pepsin u 240 min, MM – molekularni markeri

Proteinski profil je pokazao da do hidrolize kazeina dolazi veoma brzo, a da proteini u opsegu od 14-18 kDa preživljavaju pepsinolizu. Takođe, sa vremenom

se povećava količina prisutnih peptida koji se na 16% gelu opažaju kao jako razvučene trake na dnu gela, ispod nivoa markera (Slika 41).

Da bimo potvrdili da i BLG i ALA preživljavaju uslove protelize, tj. dokazali da uslovi *in vitro* protelize dobro odslikavaju stanje koje se dečava *in vivo*, urađen je imunoblot za različite vremenske trenutke digestije u *in vitro* uslovima.

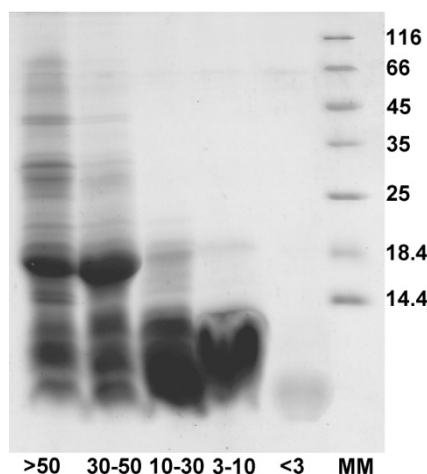


Slika 42: Imunoblot digestije svežeg mleka u uslovima koji oponašaju *in vivo* uslove: C- kontrola proteina, P0 - pepsin u trenutku t=0 min, P – pepsin u 240 min, MM – molekularni markeri

Digestija *in vitro* dobro oponaša uslove digestije u želucima pacova, jer su i BLG i ALA prepoznati od strane antitela. Takođe, nakon sat vremena od početka digestije prisutna je još uvek velika količina ALA u digestu, što pokazuje da ovaj protokol može da posluži za *in vitro* proizvodnju peptida koji odgovaraju digestiji u želudačnim uslovima (Slika 42).

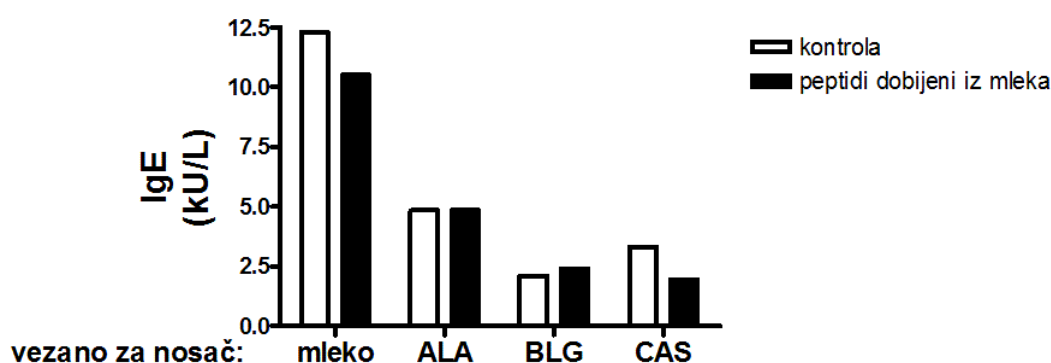
7.3.1.6. Vezivanje peptida dobijenih digestijom svežeg mleka za IgE

Nakon digestije veće količine svežeg mleka, centrifugalnim filtriranjem, redom, na membranama koje propuštaju proteine od 50, 30, 10 i 3 kDa izolovani su peptidi koji su korišćeni za ispitivanje vezivanja IgE antitela (Slika 43).



Slika 43: Elektroforetska analiza frakcija dobijenih centrifugalnim filtriranjem nakon digestije mleka. Na slici je označen opseg masa proteina/peptida u frakcijama

Frakcija koja je sadržavala fragmente manje od 3 kDa je analizirana masenom spektrometrijom i pokazala je sličan profil peptida kao i uzorci ekstrakata želuca. Na kraju je ova frakcija korišćena za ispitivanje vezivanja IgE antitela iz smeše seruma osoba alergičnih na mleko.



Slika 44: Smanjenje vezivanja IgE antitela za čvrstu fazu za koju su vezani proteini mleka i pojedinačni glavni alergeni mleka u prisustvu peptida dobijenih digestijom mleka

Merenje vezivanja IgE antitela za čvrstu fazu za koju su vezani proteini mleka pokazalo je da u prisustvu proteina mleka dolazi do smanjenja vezivanja, tj. da su dobijeni peptidi funkcionalni i da u značajnoj meri mogu da se vežu za IgE antitela (Slika 44). S obzirom da u ovoj frakciji ima jako malo peptida izvedenih iz ALA ili BLG, smanjenje vezivanja IgE antitela, ukoliko su ovi proteini vezani za čvrstu fazu, nije očekivano. Značajno smanjenje vezivanja je očekivano u slučaju kazeina vezanog za čvrsti nosač, s obzirom na prisustvo mnogobrojnih peptida koji odgovaraju glavnim IgE vezujućim epitopima kazeina.

7.4. Diskusija

In vitro digestija prečišćenog BLG pokazala je da BLG, nezavisno od pH na kom se radi digestija opstaje više od jedan sat. S obzirom da je N-terminalni kraj BLG podložan proteolizi (Stanic, D., Radosavljevic, J. et al. 2009), moglo bi se očekivati da u slučaju BLG dolazi do proteolize koja za rezultat ima neznatnu promenu u masi. Međutim, u ovom slučaju, nativni BLG opstaje apsolutno intaktan u prisustvu pepsina, nezavisno od pH vrednosti. Digestija ALA pokazuje da protein nestaje već u toku prvog minuta, na sve tri ispitivane pH vrednosti. Ovo može biti uslovljeno činjenicom da je za nativnu strukturu ALA neophodan kalcijum, koji disosuje u kiselim uslovima i na taj način ALA gubi terciarnu strukturu (Dolgikh, D. A., Abaturon, L. V. et al. 1985) što, najverovatnije, olakšava proteolizu.

Određivanje pepsinske aktivnosti i pH vrednosti u želucima pacova pokazalo je da gavaža mlekom ne dovodi do značajne promene u nivou pepsina i pH kod eksperimentalnih životinja. Ovi rezultati donekle su u skladu sa prethodno publikovanim (Polovic, N., Obradovic, A. et al. 2010). Nedostatak promene u pH vrednosti može biti objašnjenjen puferskim kapacitetom mleka, koje je bazno. Očekivano je da u želucu eksperimentalnih životinja, u uslovima koji pokazuju povišenu pH vrednost u odnosu na pH optimum za dejstvo pepsina, digestija mleka bude otežana. Analiza imunoblotom pokazala je da i BLG i ALA preživljavaju uslove želudačne digestije. Opstanak ALA u želudačnoj digestiji pokazan je i u prasećem modelu, gde su životinje primile mlečnu formulu za bebe (Bouzerzour, K., Morgan, F. et al. 2012).

Analiza peptidnih fragmenata nakon digestije *in vivo* pokazala je veliki broj peptida, dominantno poreklom od kazeina. Najveći broj peptida odgovarao je IgE-vezujućim epitopima (Chatchatee, P., Jarvinen, K. M. et al. 2001; Chatchatee, P., Jarvinen, K. M. et al. 2001; Jarvinen, K. M., Chatchatee, P. et al. 2001; Jarvinen, K. M., Beyer, K. et al. 2002; Cerecedo, I., Zamora, J. et al. 2008). U nekoliko studija do sada su identifikovani peptidi koji preživljavaju digestiju pepsinom u *in vitro* i *in vivo* uslovima, ali očigledan šablon peptida

koji preživljavaju digestiju nije bio uočen (Bouzerzour, K., Morgan, F. et al. 2012; Boutrou, R., Gaudichon, C. et al. 2013).

Digestijom svežeg mleka u uslovima koji oponašaju *in vivo* uslove dobija se profil koji odgovara profilu digestije u želucima. Dobijeni peptidi kompetiraju u merljivom stupnju vezivanje IgE antitela za čvrsti nosač na kom su imobilizovani ukupni proteini mleka i kazeinska frakcija, tj. ispoljavaju svoje funkcionalne karakteristike koje su u skladu sa epitopima. Pošto su dobijeni peptidi dominantno izvedeni iz kazeina, ovim bi se mogli objasniti i klinički rezultati u kojima osobe alergične na kazein jako retko reaguju sistemskom anafilaksom. Mehanizam koji može da se pretpostavi je da jedan deo peptida izvedenih iz kazeina, koji odgovaraju IgE vezujućim epitopima, apsorpcijom u crevima prelazi u sistemsku cirkulaciju. S obzirom da se ovi peptidi vezuju za specifična IgE antitela, moguće je da i *in vivo* dolazi do vezivanja za antitela, ali ne i da u značajnoj meri poveže FcεRI receptore i dovede do masovnog oslobađanja medijatora, što je karakteristično za sistemske reakcije.

Da zaključimo: nakon digestije proteina mleka *in vivo* ALA i BLG su očuvani. Kazein je digestovan do peptida koji se u značajnoj meri vezuju za IgE antitela pacijenata sa alergijom na mleko.

8. Zaključci

U ovoj tezi ispitivan je alergeni potencijal proteina mleka i kikirikija nakon procesovanja enzimima.

U studiji koja je ispitivala svojstva alergena nakon umrežavanja enzimima u *in vitro* i *ex vivo* eksperimentima pokazano je da:

- enzimski tretman proteina kikirikija dvema različim tirozinazama proizvodi kovalentno agregirane i umrežene proteine velike molekulske mase. Međutim, ovaj tretman očuvava imunološke karakteristike alergena kikirikija. Takođe, agregacija alergena kikirikija tirozinazama ne smanjuje vezivanje za specifična IgE antitela i aktivaciju bazofila. Rezultati naše studije upućuju da kovalentno umrežavanje proteina, inače podložnih agregiranju, može biti siguran/bezbedan pristup za primenu u industriji hrane, jer proteini umreženi tirozinazama nemaju više izražena IgE-vezujuća svojstva od nemodifikovanih proteina kikirikija.
- tretman kazeina lakazom u prisustvu kafeinske kiseline (LC-CAS) i tirozinazom iz *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach (TA-CAS) smanjuje aktivaciju bazofila. Iako sva tri ispitivana modifikata (LC-CAS, TA-CAS i TT-CAS) imaju slabiju sposobnost inhibiranja vezivanja za IgE antitela nego monomerni kazein, u testu aktivacije bazofila nije došlo do promene u reaktivnosti kod neatopičnih osoba. Na osnovu ovoga možemo zaključiti da prilikom ovakvih modifikacija kazeina ne dolazi do pojačavanja nespecifičnog vezivanja za receptore na bazofilima i/ili formiranja novih epitopa.

In vivo eksperimenti u kojima je ispitivan efekat umrežavanja proteina kikirikija tirozinazama i lakazom pokazali su da:

- enzimski tretman proteina kikirikija dvema različim tirozinazama ne smanjuje transepitelni transport alergena *in vitro*, ne pojačava alergijsku reakciju *in vivo*, niti narušava kapacitet proteina kikirikija da indukuju toleranciju kod miševa. Ovi rezultati ukazuju da kovalentno umrežavanje proteina kikirikija, koji su i inače skloni agregiranju, može biti siguran pristup, pošto senzitivacija i kapacitet da indukuju oralnu tolerance nisu promenjeni modifikacijama.
- umrežavanje proteina kikirikija lakazom može biti poželjno za proizvodnju terapeutika za imunoterapiju, s obzirom da dovodi do smanjenja mMCP-1 nakon tretmana ekperimentalnih životinja, bez povećanja nivoa IgE antitela. Takođe, ovaj pristup može se smatrati bezbednim u tretmanu proteina hrane, jer promena proteina na ovaj način dovodi do smanjenja kapaciteta za senzitivaciju i, istovremeno, bolje indukuje toleranciju nego nemodifikovani proteini.

U budućnosti bilo bi važno da se ispita uticaj umrežavanja alergena kikirikija u realnom i složenom sistemu hrane gde enzimska obrada može agregirati alergene iz različitih izvora.

Proteolitičko procesovanje C-terminusa Ara h 2 proteina kikirikija proteazom prisutnom u kikirikiju dovodi do proizvodnje dva izoalergena molekulske mase 16.34 i 17.71 kDa, redom, koje su prisutne u kikirikiju zajedno sa prethodno prijavljenim izoformama Ara h 2, Ara h 2.01 i Ara h 2.02, molekulskih masa 16.66 kDa i 18.03 kDa. Nepromenjeno vezivanje za IgE antitela ovih proteolitički obrađenih formi ukazuje da sazrevanje Ara h 2 ne menja IgE-vezujuće epitope. Ovi rezultati pružaju dodatni uvid u molekularna svojstva alergena kikirikija nakon proteolize, pokazujući da alergenosti 2S albumina kikirikija doprinose zajedno sve prisutne forme, uključujući i proteolitički procesovane.

Takođe, pokazano je i da se digestija proteina mleka koja se odvija u fiziološki relevantnim uslovima razlikuje od *in vitro* preporučenih testova, ne samo zbog drugačije pH vrednosti, nego, prvenstveno, i zbog kompleksnog matriksa u kom se proteini nalaze. Nakon želudačne digestije tokom sat vremena, ALA i BLG

bivaju i dalje prisutni kao intaktni proteini/veći fragmenti, dok je kazein prisutan uglavnom kao smeša peptida. Peptidi identifikovani u želudačnom sadržaju odgovaraju IgE vezujućim epitopima kazeina i ispoljavaju značajnu inhibiciju vezivanja za kazein i ukupne proteine mleka.

Rezultati ove teze upućuju da prilikom procene alergenosti enzimskih proteina treba uvažiti ne samo rezultate *in vitro* testova, već i rezultata *in vivo* eksperimenata u kojima do izražaja dolaze specifičnosti fiziološki relevantnih uslova.

9. Literatura

1. Aalberse, R. C. (1997). "Food allergens." Environ Toxicol Pharmacol **4**(1-2): 55-60.
2. Aboumahmoud, R. and Savello, P. (1990). "Crosslinking of whey protein by transglutaminase." J Dairy Sci **73**(2): 256-263.
3. Ahuja, V., Quatchadze, M., et al. (2010). "Evaluation of biotechnology-derived novel proteins for the risk of food-allergic potential: advances in the development of animal models and future challenges." Arch Toxicol **84**(12): 909-917.
4. Allez, M., Brimnes, J., et al. (2002). "Expansion of CD8⁺ T cells with regulatory function after interaction with intestinal epithelial cells." Gastroenterology **123**(5): 1516-1526.
5. Astier, C., Morisset, M., et al. (2006). "Predictive value of skin prick tests using recombinant allergens for diagnosis of peanut allergy." J Allergy Clin Immunol **118**(1): 250-256.
6. Bannon, G. A. (2004). "What makes a food protein an allergen?" Curr Allergy Asthma Rep **4**(1): 43-46.
7. Barre, A., Borges, J. P., et al. (2005). "Homology modelling of the major peanut allergen Ara h 2 and surface mapping of IgE-binding epitopes." Immunol Lett **100**(2): 153-158.
8. Barre, A., Sordet, C., et al. (2008). "Vicilin allergens of peanut and tree nuts (walnut, hazelnut and cashew nut) share structurally related IgE-binding epitopes." Mol Immunol **45**(5): 1231-1240.
9. Berin, M. C. and Sampson, H. A. (2013). "Mucosal immunology of food allergy." Curr Biol **23**(9): R389-400.
10. Bernard, H., Mondoulet, L., et al. (2007). "Identification of a new natural Ara h 6 isoform and of its proteolytic product as major allergens in peanut." J Agric Food Chem **55**(23): 9663-9669.
11. Betoret, E., Betoret, N., et al. (2011). "Functional foods development: Trends and technologies." Trends Food Sci Technol **22**(9): 498-508.
12. Beyer, K., Morrow, E., et al. (2001). "Effects of cooking methods on peanut allergenicity." J Allergy Clin Immunol **107**(6): 1077-1081.
13. Bittner, S. (2006). "When quinones meet amino acids: chemical, physical and biological consequences." Amino Acids **30**(3): 205-224.
14. Blanc, F., Adel-Patient, K., et al. (2009). "Capacity of purified peanut allergens to induce degranulation in a functional in vitro assay: Ara h 2 and Ara h 6 are the most efficient elicitors." Clin Exp Allergy **39**(8): 1277-1285.

15. Bock, S. A., Munoz-Furlong, A., et al. (2001). "Fatalities due to anaphylactic reactions to foods." *J Allergy Clin Immunol* **107**(1): 191-193.
16. Bogh, K. L., Kroghsbo, S., et al. (2009). "Digested Ara h 1 has sensitizing capacity in Brown Norway rats." *Clin Exp Allergy* **39**(10): 1611-1621.
17. Bol-Schoenmakers, M., Bleumink, R., et al. (2011). "Diclofenac enhances allergic responses in a mouse peanut allergy model." *Clin Exp Allergy* **41**(3): 424-433.
18. Boutrou, R., Gaudichon, C., et al. (2013). "Sequential release of milk protein-derived bioactive peptides in the jejunum in healthy humans." *Am J Clin Nutr* **97**(6): 1314-1323.
19. Bouzerzour, K., Morgan, F., et al. (2012). "In vivo digestion of infant formula in piglets: protein digestion kinetics and release of bioactive peptides." *Br J Nutr* **108**(12): 2105-2114.
20. Bowman, C. C. and Selgrade, M. K. (2008). "Differences in allergenic potential of food extracts following oral exposure in mice reflect differences in digestibility: potential approaches to safety assessment." *Toxicol Sci* **102**(1): 100-109.
21. Bowman, C. C. and Selgrade, M. K. (2008). "Failure to induce oral tolerance in mice is predictive of dietary allergenic potency among foods with sensitizing capacity." *Toxicol Sci* **106**(2): 435-443.
22. Breiteneder, H. and Clare Mills, E. N. (2005). "Plant food allergens-structural and functional aspects of allergenicity." *Biotechnol Adv* **23**(6): 395-399.
23. Bublin, M., Radauer, C., et al. (2008). "Effects of gastrointestinal digestion and heating on the allergenicity of the kiwi allergens Act d 1, actinidin, and Act d 2, a thaumatin-like protein." *Mol Nutr Food Res* **52**(10): 1130-1139.
24. Buchert, J., Cura, D. E., et al. (2010). Crosslinking Food Proteins for Improved Functionality. *in: Annual Review of Food Science and Technology, Vol 1. 1*: 113-138.
25. Bukantz, S. C. (2002). "Clemens von Pirquet and the concept of allergie." *J Allergy Clin Immunol* **109**(4): 724-726.
26. Burks, A. W. (2008). "Peanut allergy." *Lancet* **371**(9623): 1538-1546.
27. Burks, A. W., Shin, D., et al. (1997). "Mapping and mutational analysis of the IgE-binding epitopes on Ara h 1, a legume vicilin protein and a major allergen in peanut hypersensitivity." *Eur J Biochem* **245**(2): 334-339.
28. Burks, A. W., Williams, L. W., et al. (1992). "Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge." *J Allergy Clin Immunol* **90**(6 Pt 1): 962-969.
29. Burks, A. W., Williams, L. W., et al. (1991). "Identification of a major peanut allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges." *J Allergy Clin Immunol* **88**(2): 172-179.

30. Burzio, L. A. and Waite, J. H. (2000). "Cross-linking in adhesive quinoproteins: studies with model decapeptides." Biochemistry **39**(36): 11147-11153.
31. Canfora, L., Iamarino, G., et al. (2008). "Oxidative transformation of natural and synthetic phenolic mixtures by *Trametes versicolor* laccase." J Agric Food Chem **56**(4): 1398-1407.
32. Cerecedo, I., Zamora, J., et al. (2008). "Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay." J Allergy Clin Immunol **122**(3): 589-594.
33. Chatchatee, P., Jarvinen, K. M., et al. (2001). "Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on alpha(s1)-casein: differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy." J Allergy Clin Immunol **107**(2): 379-383.
34. Chatchatee, P., Jarvinen, K. M., et al. (2001). "Identification of IgE and IgG binding epitopes on beta- and kappa-casein in cow's milk allergic patients." Clin Exp Allergy **31**(8): 1256-1262.
35. Chatel, J. M., Bernard, H., et al. (2003). "Isolation and characterization of two complete Ara h 2 isoforms cDNA." Int Arch Allergy Immunol **131**(1): 14-18.
36. Chehade, M. and Mayer, L. (2005). "Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities." J Allergy Clin Immunol **115**(1): 3-12; quiz 13.
37. Chicon, R., Lopez-Fandino, R., et al. (2008). "Proteolytic pattern, antigenicity, and serum immunoglobulin E binding of beta-lactoglobulin hydrolysates obtained by pepsin and high-pressure treatments." J Dairy Sci **91**(3): 928-938.
38. Chung, S. Y., Kato, Y., et al. (2005). "Polyphenol oxidase/caffeic acid may reduce the allergenic properties of peanut allergens." J Sci Food Agric **85**(15): 2631-2637.
39. Chung, S. Y., Maleki, S. J., et al. (2004). "Allergenic properties of roasted peanut allergens may be reduced by peroxidase." J Agric Food Chem **52**(14): 4541-4545.
40. Cirkovic Velickovic, T., Radosavljevic, J., et al. (2009). "Digestibility of food allergens." CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources **4**(6).
41. Clare, D. A., Gharst, G., et al. (2008). "Effects of transglutaminase catalysis on the functional and immunoglobulin binding properties of peanut flour dispersions containing casein." J Agric Food Chem **56**(22): 10913-10921.
42. Clare, D. A., Gharst, G., et al. (2006). "Transglutaminase polymerization of peanut proteins." J Agric Food Chem **55**(2): 432-438.
43. Dagleish, D. G. and Corredig, M. (2012). "The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing." Annu Rev Food Sci Technol **3**: 449-467.

44. de Leon, M. P., Rolland, J. M., et al. (2007). "The peanut allergy epidemic: allergen molecular characterisation and prospects for specific therapy." Expert Rev Mol Med **9**(1): 1-18.
45. DeSesso, J. M. and Jacobson, C. F. (2001). "Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats." Food Chem Toxicol **39**(3): 209-228.
46. Diplock, A. T., Charleux, J. L., et al. (1998). "Functional food science and defence against reactive oxidative species." Br J Nutr **80 Suppl 1**: S77-112.
47. Docena, G. H., Fernandez, R., et al. (1996). "Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk." Allergy **51**(6): 412-416.
48. Dolgikh, D. A., Abaturov, L. V., et al. (1985). "Compact state of a protein molecule with pronounced small-scale mobility: bovine alpha-lactalbumin." Eur Biophys J **13**(2): 109-121.
49. Faergemand, M., Otte, J., et al. (1998). "Cross-linking of whey proteins by enzymatic oxidation." J Agric Food Chem **46**(4): 1326-1333.
50. Figueroa-Espinoza, M. C. and Rouau, X. (1999). "Effect of cysteinyl caffeic acid, caffeic acid, and L-dopa on the oxidative cross-linking of feruloylated arabinoxylans by a fungal laccase." J Agric Food Chem **47**(2): 497-503.
51. Flinterman, A. E., Knol, E. F., et al. (2008). "Peanut epitopes for IgE and IgG4 in peanut-sensitized children in relation to severity of peanut allergy." J Allergy Clin Immunol **121**(3): 737-743 e710.
52. Flinterman, A. E., van Hoffen, E., et al. (2007). "Children with peanut allergy recognize predominantly Ara h2 and Ara h6, which remains stable over time." Clin Exp Allergy **37**(8): 1221-1228.
53. Fu, T. J., Abbott, U. R., et al. (2002). "Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid-a comparative study." J Agric Food Chem **50**(24): 7154-7160.
54. Giosafatto, C. V. L., Rigby, N. M., et al. (2012). "Microbial transglutaminase-mediated modification of ovalbumin." Food Hydrocolloids **26**(1): 261-267.
55. Grdic, D., Hornquist, E., et al. (1998). "Lack of local suppression in orally tolerant CD8-deficient mice reveals a critical regulatory role of CD8⁺ T cells in the normal gut mucosa." J Immunol **160**(2): 754-762.
56. Guex, N. and Peitsch, M. C. (1997). "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling." Electrophoresis **18**(15): 2714-2723.
57. Guyton, A. C. and Hall, J. E. (1996). *Gastrointestinal physiology. in: Textbook of Medical Physiology*. Philadelphia, PA, USA, W. B. Saunders company: 793-851.
58. Harboe, N. and Ingild, A. (1973). "Immunization, Isolation of Immunoglobulins, Estimation of Antibody Titre." Scand J Immunol **2**: 161-164.

59. Hefle, S. L. (2001). "Hidden food allergens." Curr Opin Allergy Clin Immunol **1**(3): 269-271.
60. Hellman, L. (2007). "Regulation of IgE homeostasis, and the identification of potential targets for therapeutic intervention." Biomed Pharmacother **61**(1): 34-49.
61. Hersey, S. J. and Sachs, G. (1995). "Gastric acid secretion." Physiol Rev **75**(1): 155-189.
62. Hill, D. J. and Hosking, C. S. (1996). "Cow milk allergy in infancy and early childhood." Clin Exp Allergy **26**(3): 243-246.
63. Isolauri, E., Salminen, S., et al. (1999). "New functional foods in the treatment of food allergy." Ann Med **31**(4): 299-302.
64. Ito, S., Kato, T., et al. (1984). "Oxidation of tyrosine residues in proteins by tyrosinase. Formation of protein-bonded 3,4-dihydroxyphenylalanine and 5-S-cysteinyl-3,4-dihydroxyphenylalanine." Biochem J **222**(2): 407-411.
65. Jarvinen, K. M., Beyer, K., et al. (2002). "B-cell epitopes as a screening instrument for persistent cow's milk allergy." J Allergy Clin Immunol **110**(2): 293-297.
66. Jarvinen, K. M., Chatchatee, P., et al. (2001). "IgE and IgG binding epitopes on alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin in cow's milk allergy." Int Arch Allergy Immunol **126**(2): 111-118.
67. Jenneway, C. A., Travers, P., et al. (2001). Immunobiology, 5th edition. New York, Garland Science.
68. Kararli, T. T. (1995). "Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals." Biopharm Drug Dispos **16**(5): 351-380.
69. King, N., Helm, R., et al. (2005). "Allergenic characteristics of a modified peanut allergen." Mol Nutr Food Res **49**(10): 963-971.
70. Kobayashi, S. and Watanabe, J. (2003). "Inhibitory activities of aromatic amino acid esters and peptides against ovalbumin permeation through Caco-2 cell monolayers." Biosci Biotechnol Biochem **67**(11): 2498-2500.
71. Koppelman, S. J., de Jong, G. A., et al. (2005). "Purification and immunoglobulin E-binding properties of peanut allergen Ara h 6: evidence for cross-reactivity with Ara h 2." Clin Exp Allergy **35**(4): 490-497.
72. Koppelman, S. J., Hefle, S. L., et al. (2010). "Digestion of peanut allergens Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, and Ara h 6: a comparative in vitro study and partial characterization of digestion-resistant peptides." Mol Nutr Food Res **54**(12): 1711-1721.
73. Koppelman, S. J., Vlooswijk, R. A., et al. (2001). "Quantification of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2 in the peanut varieties Runner, Spanish, Virginia, and Valencia, bred in different parts of the world." Allergy **56**(2): 132-137.
74. Koppelman, S. J., Wensing, M., et al. (2004). "Relevance of Ara h1, Ara h2 and Ara h3 in peanut-allergic patients, as determined by immunoglobulin E Western blotting, basophil-histamine release and intracutaneous testing: Ara h2 is the most important peanut allergen." Clin Exp Allergy **34**(4): 583-590.

75. Labat, E., Morel, M. H., et al. (2000). "Wheat gluten phenolic acids: occurrence and fate upon mixing." J Agric Food Chem **48**(12): 6280-6283.
76. Ladics, G. S. (2008). "Current codex guidelines for assessment of potential protein allergenicity." Food Chem Toxicol **46 Suppl 10**: S20-23.
77. Ladics, G. S. and Selgrade, M. K. (2008). "Identifying food proteins with allergenic potential: Evolution of approaches to safety assessment and research to provide additional tools." Regul Toxicol Pharmacol.
78. Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
79. Lam, H. Y., van Hoffen, E., et al. (2008). "Cow's milk allergy in adults is rare but severe: both casein and whey proteins are involved." Clin Exp Allergy **38**(6): 995-1002.
80. Lantto, R., Puolanne, E., et al. (2005). "Enzyme-aided modification of chicken-breast myofibril proteins: effect of laccase and transglutaminase on gelation and thermal stability." J Agric Food Chem **53**(23): 9231-9237.
81. Larche, M., Akdis, C. A., et al. (2006). "Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy." Nat Rev Immunol **6**(10): 761-771.
82. Lehmann, K., Schweimer, K., et al. (2006). "Structure and stability of 2S albumin-type peanut allergens: implications for the severity of peanut allergic reactions." Biochem J **395**(3): 463-472.
83. Lerch, K. (1983). "Neurospora tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties." Mol Cell Biochem **52**(2): 125-138.
84. Lorenzen, P. C., Schlimme, E., et al. (1998). "Crosslinking of sodium caseinate by a microbial transglutaminase." Nahrung **42**(3-4): 151-154.
85. Luz Sanz, M., Corzo-Martinez, M., et al. (2007). "Characterization and in vitro digestibility of bovine beta-lactoglobulin glycosylated with galactooligosaccharides." J Agric Food Chem **55**(19): 7916-7925.
86. Maleki, S. J., Viquez, O., et al. (2003). "The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function." J Allergy Clin Immunol **112**(1): 190-195.
87. Martos, G., Lopez-Exposito, I., et al. (2011). "Mechanisms underlying differential food allergy response to heated egg." J Allergy Clin Immunol **127**(4): 990-997 e991-992.
88. Marumo, K. and Waite, J. H. (1986). "Optimization of hydroxylation of tyrosine and tyrosine-containing peptides by mushroom tyrosinase." Biochim Biophys Acta **872**(1-2): 98-103.
89. Mattinen, M.-L., Hellman, M., et al. (2008). "Laccase and tyrosinase catalysed polymerization of proteins and peptides." J Biotechnol **136, Supplement(0)**: S318.
90. Mattinen, M. L., Hellman, M., et al. (2006). "Effect of protein structure on laccase-catalyzed protein oligomerization." J Agric Food Chem **54**(23): 8883-8890.

91. Mattinen, M. L., Kruus, K., et al. (2005). "Laccase-catalyzed polymerization of tyrosine-containing peptides." FEBS J **272**(14): 3640-3650.
92. Mattinen, M. L., Lantto, R., et al. (2008). "Oxidation of peptides and proteins by *Trichoderma reesei* and *Agaricus bisporus* tyrosinases." J Biotechnol **133**(3): 395-402.
93. Mayer, L. and Shao, L. (2004). "Therapeutic potential of oral tolerance." Nat Rev Immunol **4**(6): 407-419.
94. McDermott, R. A., Porterfield, H. S., et al. (2007). "Contribution of Ara h 2 to peanut-specific, immunoglobulin E-mediated, cell activation." Clin Exp Allergy **37**(5): 752-763.
95. Monaci, L., Tregogat, V., et al. (2006). "Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review." Eur Food Res Technol **223**(2): 149-179.
96. Mondoulet, L., Paty, E., et al. (2005). "Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins." J Agric Food Chem **53**(11): 4547-4553.
97. Monogioudi, E., Faccio, G., et al. (2011). "Effect of enzymatic cross-linking of beta-casein on proteolysis by pepsin." Food Hydrocolloids **25**(1): 71-81.
98. Moreno, F. J., Mackie, A. R., et al. (2005). "Phospholipid interactions protect the milk allergen alpha-lactalbumin from proteolysis during in vitro digestion." J Agric Food Chem **53**(25): 9810-9816.
99. Moreno, F. J., Rubio, L. A., et al. (2006). "Uptake of 2S albumin allergens, Ber e 1 and Ses i 1, across human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers." J Agric Food Chem **54**(22): 8631-8639.
100. Mowat, A. M. (2003). "Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens." Nat Rev Immunol **3**(4): 331-341.
101. Nelson, H. S., Lahr, J., et al. (1997). "Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract." J Allergy Clin Immunol **99**(6 Pt 1): 744-751.
102. Niederberger, V., Niggemann, B., et al. (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**(2): 576-584.
103. Nieuwenhuizen, W. F., Dekker, H. L., et al. (2003). "Modification of glutamine and lysine residues in holo and apo alpha-lactalbumin with microbial transglutaminase." J Agric Food Chem **51**(24): 7132-7139.
104. Nowak-Wegrzyn, A. and Fiocchi, A. (2009). "Rare, medium, or well done? The effect of heating and food matrix on food protein allergenicity." Curr Opin Allergy Clin Immunol **9**(3): 234-237.
105. Pabst, O. and Mowat, A. M. (2012). "Oral tolerance to food protein." Mucosal Immunol **5**(3): 232-239.
106. Pali-Schöll, I., Herzog, R., et al. (2010). "Antacids and dietary supplements with an influence on the gastric pH increase the risk for food sensitization." Clin Exp Allergy **40**(7): 1091-1098.

107. Pali-Scholl, I., Yildirim, A. O., et al. (2008). "Anti-acids lead to immunological and morphological changes in the intestine of BALB/c mice similar to human food allergy." Exp Toxicol Pathol **60**(4-5): 337-345.
108. Palmer, G. W., Dibbern, D. A., Jr., et al. (2005). "Comparative potency of Ara h 1 and Ara h 2 in immunochemical and functional assays of allergenicity." Clin Immunol **115**(3): 302-312.
109. Palosuo, K., Varjonen, E., et al. (2003). "Transglutaminase-mediated cross-linking of a peptic fraction of omega-5 gliadin enhances IgE reactivity in wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis." J Allergy Clin Immunol **111**(6): 1386-1392.
110. Partanen, R., Torkkeli, M., et al. (2011). "Loosening of globular structure under alkaline pH affects accessibility of β -lactoglobulin to tyrosinase-induced oxidation and subsequent cross-linking." Enzyme Microb Technol **49**(2): 131-138.
111. Paschke, A. and Besler, M. (2002). "Stability of bovine allergens during food processing." Ann Allergy Asthma Immunol **89**(6 Suppl 1): 16-20.
112. Peeters, K. A., Koppelman, S. J., et al. (2007). "Does skin prick test reactivity to purified allergens correlate with clinical severity of peanut allergy?" Clin Exp Allergy **37**(1): 108-115.
113. Perrier, C. and Corthesy, B. (2011). "Gut permeability and food allergies." Clin Exp Allergy **41**(1): 20-28.
114. Piersma, S. R., Gaspari, M., et al. (2005). "Proteolytic processing of the peanut allergen Ara h 3." Mol Nutr Food Res **49**(8): 744-755.
115. Polovic, N., Blanusa, M., et al. (2007) "A matrix effect in pectin-rich fruits hampers digestion of allergen by pepsin in vivo and in vitro." Clin Exp Allergy **37**(5): 764-771.
116. Polovic, N., Obradovic, A., et al. (2010). "In Vivo Digestion of a Thaumatin-Like Kiwifruit Protein in Rats." Food Digestion **1**(1-2): 5-13.
117. Porterfield, H. S., Murray, K. S., et al. (2009). "Effector activity of peanut allergens: a critical role for Ara h 2, Ara h 6, and their variants." Clin Exp Allergy **39**(7): 1099-1108.
118. Rabjohn, P., Helm, E. M., et al. (1999). "Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3." J Clin Invest **103**(4): 535-542.
119. Radosavljevic, J., Dobrijevic, D., et al. (2010). "Insights into proteolytic processing of the major peanut allergen Ara h 2 by endogenous peanut proteases." J Sci Food Agric **90**(10): 1702-1708.
120. Rai, B. K. and Fiser, A. (2006). "Multiple mapping method: a novel approach to the sequence-to-structure alignment problem in comparative protein structure modeling." Proteins **63**(3): 644-661.
121. Ramos, M. L., Fleming, G., et al. (2006). "Chromosomal and phylogenetic context for conglutin genes in *Arachis* based on genomic sequence." Mol Genet Genomics **275**(6): 578-592.

122. Rescigno, A., Sollai, F., et al. (2002). "Tyrosinase inhibition: general and applied aspects." J Enzyme Inhib Med Chem **17**(4): 207-218.
123. Rescigno, M., Urbano, M., et al. (2001). "Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria." Nat Immunol **2**(4): 361-367.
124. Restani, P., Ballabio, C., et al. (2009). "Molecular aspects of milk allergens and their role in clinical events." Anal Bioanal Chem **395**(1): 47-56.
125. Riemer, A. B., Gruber, S., et al. (2010). "Suppression of gastric acid increases the risk of developing immunoglobulin E-mediated drug hypersensitivity: human diclofenac sensitization and a murine sensitization model." Clin Exp Allergy **40**(3): 486-493.
126. Rimoldi, M. and Rescigno, M. (2005). "Uptake and presentation of orally administered antigens." Vaccine **23**(15): 1793-1796.
127. Rittstieg, K., Suurnakki, A., et al. (2002). "Investigations on the laccase-catalyzed polymerization of lignin model compounds using size-exclusion HPLC." Enzyme Microb Technol **31**(4): 403-410.
128. Riva, S. (2006). "Laccases: blue enzymes for green chemistry." Trends Biotechnol **24**(5): 219-226.
129. Roitt, I., Brostoff, J., et al. (2006). Immunology, C.V. Mosby.
130. Roth-Walter, F., Berin, M. C., et al. (2008). "Pasteurization of milk proteins promotes allergic sensitization by enhancing uptake through Peyer's patches." Allergy **63**(7): 882-890.
131. Salminen, S., Bouley, C., et al. (1998). "Functional food science and gastrointestinal physiology and function." Br J Nutr **80 Suppl 1**: S147-171.
132. Sampson, H. A. (1999). "Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders." J Allergy Clin Immunol **103**(5 Pt 1): 717-728.
133. Sampson, H. A. (2004). "Update on food allergy." J Allergy Clin Immunol **113**(5): 805-819; quiz 820.
134. Sanchez-Ferrer, A., Rodriguez-Lopez, J. N., et al. (1995). "Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism." Biochim Biophys Acta **1247**(1): 1-11.
135. Schmitt, D. A., Cheng, H., et al. (2004). "Competitive inhibition ELISA for quantification of Ara h 1 and Ara h 2, the major allergens of peanuts." J AOAC Int **87**(6): 1492-1497.
136. Schorsch, C., Carrie, H., et al. (2000). "Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase conditions for formation of transglutaminase-induced gels." Int Dairy J **10**(8): 519-528.
137. Schulten, V., Lauer, I., et al. (2011). "A food matrix reduces digestion and absorption of food allergens in vivo." Mol Nutr Food Res **55**(10): 1484-1491.
138. Selinheimo, E., Autio, K., et al. (2007). "Elucidating the mechanism of laccase and tyrosinase in wheat bread making." J Agric Food Chem **55**(15): 6357-6365.

139. Selinheimo, E., Lampila, P., et al. (2008). "Formation of protein-oligosaccharide conjugates by laccase and tyrosinase." J Agric Food Chem **56**(9): 3118-3128.
140. Selinheimo, E., NiEidhin, D., et al. (2007). "Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases." J Biotechnol **130**(4): 471-480.
141. Selinheimo, E., Saloheimo, M., et al. (2006). "Production and characterization of a secreted, C-terminally processed tyrosinase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*." FEBS J **273**(18): 4322-4335.
142. Seo, S. Y., Sharma, V. K., et al. (2003). "Mushroom tyrosinase: recent prospects." J Agric Food Chem **51**(10): 2837-2853.
143. Shek, L. P. C., Bardina, L., et al. (2005). "Humoral and cellular responses to cow milk proteins in patients with milk-induced IgE-mediated and non-IgE-mediated disorders." Allergy **60**(7): 912-919.
144. Shreffler, W. G., Lencer, D. A., et al. (2005). "IgE and IgG4 epitope mapping by microarray immunoassay reveals the diversity of immune response to the peanut allergen, Ara h 2." J Allergy Clin Immunol **116**(4): 893-899.
145. Sicherer, S. H. and Leung, D. Y. (2013). "Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2012." J Allergy Clin Immunol **131**(1): 55-66.
146. Sicherer, S. H., Munoz-Furlong, A., et al. (2003). "Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey: a 5-year follow-up study." J Allergy Clin Immunol **112**(6): 1203-1207.
147. Sicherer, S. H. and Sampson, H. A. (2007). "Peanut allergy: emerging concepts and approaches for an apparent epidemic." J Allergy Clin Immunol **120**(3): 491-503; quiz 504-495.
148. Simecka, J. W. (1998). "Mucosal immunity of the gastrointestinal tract and oral tolerance." Adv Drug Delivery Rev **34**: 235-259.
149. Smit, J. J., Bol-Schoenmakers, M., et al. (2011). "The role of intestinal dendritic cells subsets in the establishment of food allergy." Clin Exp Allergy **41**(6): 890-898.
150. Smith, P. K., Krohn, R. I., et al. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem **150**(1): 76-85.
151. Son, D. Y., Scheurer, S., et al. (1999). "Pollen-related food allergy: cloning and immunological analysis of isoforms and mutants of Mal d 1, the major apple allergen, and Bet v 1, the major birch pollen allergen." Eur J Nutr **38**(4): 201-215.
152. Stanic-Vucinic, D., Stojadinovic, M., et al. (2012). "Structural changes and allergenic properties of beta-lactoglobulin upon exposure to high-intensity ultrasound." Mol Nutr Food Res **56**(12): 1894-1905.
153. Stanic, D., Monogioudi, E., et al. (2010). "Digestibility and allergenicity assessment of enzymatically crosslinked beta-casein." Mol Nutr Food Res **54**(9): 1273-1284.

154. Stanic, D., Radosavljevic, J., et al. (2009). "Removal of N-terminal peptides from β -lactoglobulin by proteolytic contaminants in a commercial phenol oxidase preparation." *Int Dairy J* **19**(12): 746-752.
155. Stanic, D., Radosavljevic, J., et al. (2012). Application of Ion Exchanger in the Separation of Whey Proteins and Lactin from Milk Whey. *in: Ion Exchange Technology II*. D. Inamuddin and M. Luqman, Springer Netherlands: 35-63.
156. Stanley, J. S., King, N., et al. (1997). "Identification and mutational analysis of the immunodominant IgE binding epitopes of the major peanut allergen Ara h 2." *Arch Biochem Biophys* **342**(2): 244-253.
157. Starkl, P., Krishnamurthy, D., et al. (2011). "Heating Affects Structure, Enterocyte Adsorption and Signalling, As Well as Immunogenicity of the Peanut Allergen Ara h 2." *Open Allergy J* **4**: 24-34.
158. Steinman, R. M., Hawiger, D., et al. (2003). "Tolerogenic dendritic cells." *Annu Rev Immunol* **21**: 685-711.
159. 162. Stertman, L., Lundgren, E., et al. (2006). "Starch microparticles as a vaccine adjuvant: only uptake in Peyer's patches decides the profile of the immune response." *Vaccine* **24**(17): 3661-3668.
160. Suhr, M., Wicklein, D., et al. (2004). "Isolation and characterization of natural Ara h 6: evidence for a further peanut allergen with putative clinical relevance based on resistance to pepsin digestion and heat." *Mol Nutr Food Res* **48**(5): 390-399.
161. Suhr, M., Wicklein, D., et al. (2004). "Isolation and characterization of natural Ara h 6: evidence for a further peanut allergen with putative clinical relevance based on resistance to pepsin digestion and heat." *Mol Nutr Food Res* **48**(5): 390-399.
162. Tantoush, Z., Stanic, D., et al. (2011). "Digestibility and allergenicity of β -lactoglobulin following laccase-mediated cross-linking in the presence of sour cherry phenolics." *Food Chem* **125**(1): 84-91.
163. Taylor, S. L. (1987). "Allergic and sensitivity reactions to food components." *Nutritional Toxicology* **2**: 173-198.
164. Taylor, S. L. and Hefle, S. L. (2001). "Food Allergies and Other Food Sensitivities." *Food Technology* **55**(9): 68-82.
165. Taylor, S. L., Lemanske, R. F., Jr., et al. (1987). "Food allergens: structure and immunologic properties." *Ann Allergy* **59**(5 Pt 2): 93-99.
166. Thomas, K., Aalbers, M., et al. (2004). "A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins." *Regul Toxicol Pharmacol* **39**(2): 87-98.
167. Thomas, K., Herouet-Guicheney, C., et al. (2008). "Current and future methods for evaluating the allergenic potential of proteins: international workshop report 23-25 October 2007." *Food Chem Toxicol* **46**(9): 3219-3225.

168. Untersmayr, E., Diesner, S. C., et al. (2010). "Nitration of the egg-allergen ovalbumin enhances protein allergenicity but reduces the risk for oral sensitization in a murine model of food allergy." *PLoS One* **5**(12): e14210.
169. Untersmayr, E. and Jensen-Jarolim, E. (2008). "The role of protein digestibility and antacids on food allergy outcomes." *J Allergy Clin Immunol* **121**(6): 1301-1308; quiz 1309-1310.
170. Untersmayr, E., Scholl, I., et al. (2003). "Antacid medication inhibits digestion of dietary proteins and causes food allergy: a fish allergy model in BALB/c mice." *J Allergy Clin Immunol* **112**(3): 616-623.
171. Valenta, R. (2002). "The future of antigen-specific immunotherapy of allergy." *Nat Rev Immunol* **2**(6): 446-453.
172. van Boxtel, E. L., van Beers, M. M., et al. (2006). "Allergen Ara h 1 occurs in peanuts as a large oligomer rather than as a trimer." *J Agric Food Chem* **54**(19): 7180-7186.
173. van Boxtel, E. L., van den Broek, L. A., et al. (2007). "Peanut allergen Ara h 1 interacts with proanthocyanidins into higher molecular weight complexes." *J Agric Food Chem* **55**(21): 8772-8778.
174. van Esch, B. C., Gros-van Hest, M., et al. (2013). "Sensitizing capacity and allergenicity of enzymatically cross-linked sodium caseinate in comparison to sodium caseinate in a mouse model for cow's milk allergy." *Toxicol Lett* **218**(1): 50-55.
175. van Wijk, F., Nierkens, S., et al. (2007). "The CD28/CTLA-4-B7 signaling pathway is involved in both allergic sensitization and tolerance induction to orally administered peanut proteins." *J Immunol* **178**(11): 6894-6900.
176. Vetander, M., Helander, D., et al. (2012). "Anaphylaxis and reactions to foods in children--a population-based case study of emergency department visits." *Clin Exp Allergy* **42**(4): 568-577.
177. Viquez, O. M., Konan, K. N., et al. (2003). "Structure and organization of the genomic clone of a major peanut allergen gene, Ara h 1." *Mol Immunol* **40**(9): 565-571.
178. Viquez, O. M., Summer, C. G., et al. (2001). "Isolation and molecular characterization of the first genomic clone of a major peanut allergen, Ara h 2." *J Allergy Clin Immunol* **107**(4): 713-717.
179. Warren, C. M., Krzesinski, P. R., et al. (2003). "Vertical agarose gel electrophoresis and electroblotting of high-molecular-weight proteins." *Electrophoresis* **24**(11): 1695-1702.
180. Watanabe, M., Watanabe, J., et al. (2000). "Novel method for producing hypoallergenic wheat flour by enzymatic fragmentation of the constituent allergens and its application to food processing." *Biosci, Biotechnol, Biochem* **64**(12): 2663-2667.
181. Wichers, H. J., De Beijer, T., et al. (2004). "The major peanut allergen Ara h 1 and its cleaved-off N-terminal peptide; possible implications for peanut allergen detection." *J Agric Food Chem* **52**(15): 4903-4907.

182. Wickham, M., Faulks, R., et al. (2009). "In vitro digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown." Mol Nutr Food Res **53**(8): 952-958.
183. Yan, Y.-S., Lin, X.-D., et al. (2005). "Isolation of peanut genes encoding arachins and conglutins by expressed sequence tags." Plant Sci (Amsterdam, Neth) **169**(2): 439-445.
184. Yan, Y., Seeman, D., et al. (2013). "pH-Dependent aggregation and disaggregation of native beta-lactoglobulin in low salt." Langmuir **29**(14): 4584-4593.

10. Biografija autora

Jelena Radosavljević rođena je 05.12.1983. godine u Požarevcu. Hemijski fakultet, smer Biohemija, Univerziteta u Beogradu, upisala je 2002. godine, a diplomirala februara 2008. godine sa prosečnom ocenom 9.79. Tokom osnovnih studija, provela je tri meseca u laboratoriji pod rukovodstvom prof. Ignacio Sanz-a, na University of Rochester, USA, kao dobitnik stipendije Američke Fondacije za lupus-odsek Genessee Valley.

Doktorske studije na Katedri za biohemiju Hemijskog fakulteta upisala je 2008. godine.

Od decembra 2008. godine zaposlena je pri Katedri za biohemiju, kao saradnik u nastavi. Juna 2011. 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 i Evropskog biotehnološkog društva.

Govori, čita i piše engleski jezik.

Tokom 2009. godine boravi tri meseca na Institute for Risk Assessment Sciences, Utrecht University, u Holandiji, kao dobitnik stipendije EAACI Clinical Fellowship Award. Od jula do oktobra 2011. bila je na istraživačkom boravku na Department of Plant Physiology and Molecular Biology, Biološkom fakultetu, Univerziteta u Plovdivu, Bugarska. Početkom 2013. boravi dva meseca na Medicinskom fakultetu, Karolinska institutu u Stokholmu, Švedska.

Jelena Radosavljević do sada ima objavljenih 5 naučnih radova u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), 1 poglavlja u monografiji vrhunskog međunarodnog značaja (M13) i 1 kritičku evaluaciju podataka prikazanih na internetu (M86), kao i dve prijavljene genske sekvence (M85). Autor je i brojnih

saopštenja na međunarodnim skupovima štampanih kako u celini tako i u izvodu.

Jelena Radosavljević učestvuje u realizaciji projekta iz osnovnih istraživanja koji finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije Molekularne osobine i modifikacije nekih respiratornih i nutritivnih alergena (OI 172024). Takođe, učestvovala je u realizaciji međunarodnog projekta Jačanje Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu u cilju uspostavljanja Centra izvrsnosti za molekularnu biologiju i istraživanje hrane u regionu Zapadnog Balkana (FCUB-ERA 256716).

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Jelena Radosavljević

broj upisa 40/2008

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Alergenost enzimski procesovanih nutritivnih alergena

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

J. Radosavljević

U Beogradu,

02.12.2013.

Prilog 2.

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije
doktorskog rada**

Ime i prezime autora Jelena Radosavljević

Broj upisa 40/2008

Studijski program doktor biohemijskih nauka

Naslov rada Alergenost enzimski procesovanih nutritivnih
alergena

Mentor dr Tanja Ćirković Veličković, redovni profesor Hemijskog
fakulteta Univerziteta u Beogradu

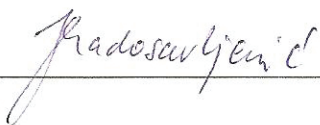
Potpisani Jelena Radosavljević

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda



U Beogradu,
02.12.2013.

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Alergeni potencijal enzimski procesovanih nutritivnih alergena

koja je moje autorsko delo.

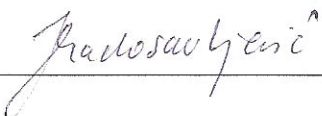
Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda



U Beogradu,
02.12.2013.

Prilog 4.

Spisak radova i saopštenja proisteklih iz teze:

Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21):

1. Stanic, D., Monogioudi, E., Dilek, E., Radosavljevic, J., Atanaskovic-Markovic, M., Vuckovic, O., Lantto, R., Mattinen, M., Buchert, J., Cirkovic Velickovic, T. (2009) Digestibility and allergenicity assessment of enzymatically crosslinked β -casein. *Molecular Nutrition Food and Research*, 54, 1273-1284, IF=4.356
2. Radosavljevic, J., Dobrijevic, D., Jadranin, M., Blanusa, M., Vukmirica, J., Cirkovic Velickovic, T. (2010) Insights into proteolytical processing of the major peanut protein Ara h 2 by endogenous peanut protease, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90 (10), 1702-1708, IF=1.360
3. Radosavljevic, J., Nordlund, E., Mihajlovic, L., Krstic, M., Bohn, T., Buchert, J., Cirkovic Velickovic, T., Smit, J. Sensitizing potential of enzymatically cross-linked peanut proteins in a mouse model of peanut allergy. *Molecular Nutrition Food and Research*, DOI: 10.1002/mnfr.201300403, IF=4.310

Radovi u pripremi:

1. Radosavljevic, J., Nordlund, E., Mihajlovic, L., Smit, J., Buchert, J., Cirkovic Velickovic, T. Allergenicity of laccase cross-linked peanut proteins.
2. Radosavljevic, J., Kataranovski, D., van Haage, M., Cirkovic Velickovic, T. *In vivo* digestion of milk preserves IgE binding of main milk allergens.

Saopštenja na skupovima međunarodnog značaja štampani u izvodu:

1. Radosavljevic, J., Dobrijevic, D., Jadranin, M., Atanaskovic-Markovic, M., Cirkovic Velickovic, T. Novel isoforms of Ara h 2 can bind human IgE. XXVIII Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Warszawa, June 6-10, 2009, Abstract book, Abstract No. 680
2. Radosavljevic, J., Mihajlovic, L., Willemsen, K., Selinheimo, E., Buchert, J., Pieters, R., Smith, J., Cirkovic Velickovic, T. Allergenic potential of cross-linked peanut proteins. XXIX Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, London, June 5-9, 2010, Abstract book, Abstract No. 1070
3. Radosavljevic, J., Stojadinovic, M., Burazer, L., Kataranovski, D., Cirkovic Velickovic, T. Acidity, Pepsin Activity and Proteolysis of Milk Proteins in Rat's Gastric Compartment. 1st International Conference on Food Digestion, Cesena, Italy, 2012.

4. Radosavljević, J., Krstić, M., Apostolović, D., Bohn, T., Čirković Veličković, T. Bioavailability of enzymatically cross-linked peanut proteins in Caco-2 cell monolayer. Belgrade Food International Conference, Belgrade, 2012.
5. Radosavljević, J., Kataranovski, D., Burazer, L., Čirković Veličković, T. Digestion of Milk Proteins in Rat's Gastric Compartment. Belgrade Food International Conference, Belgrade, 2012.

Saopštenja na nacionalnim skupovima štampana u celosti (M63):

1. Radosavljević, J., Stanić, D., Polović, N., Jadranin, M., Jankov, R., Čirković Veličković, T. „Uticaj pH vrednosti na digestibilnost β -laktoglobulina u uslovima simuliranog želudačnog soka“ 47. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Beograd 21. mart 2009, BH09, str. 94
2. Radosavljević, J., Dobrijević, D., Jadranin, M., Jankov, R., Čirković Veličković, T. „Izolovanje i molekularna karakterizacija glavnih alergena kikirikija“ 5. Simpozijum Hemija i zaštita životne sredine, Tara 27-30 maj, 2008, str. 164-165

Genska sekvenca (M85):

1. Arachis hypogaea clone 1.6 Ara h 6 allergen gene, complete cds, GenBank: FJ713111.1
2. Arachis hypogaea clone 4.2 Ara h 2.01 allergen gene, complete cds, GenBank: FJ713110.1