

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET

Danijela Lj. Apostolović

**Imunoproteomika alergena hrane,
modifikovanih derivata alergena i alergeni
peptida rezistentnih na digestiju**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY

Danijela Lj. Apostolović

**Immunoproteomics of food allergens,
modified allergen derivatives and allergenic
digestion resistant peptides**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

KOMISIJA ZA PREGLED, OCENU I ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

Mentor:

dr Tanja Ćirković Veličković, redovni profesor
Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

dr Marija Gavrović-Jankulović, redovni profesor
Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu

dr Dragana Stanić-Vučinić, viši naučni saradnik
Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu

dr Ivanka Karadžić, redovni profesor
Institut za hemiju i medicinu,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: _____

*"I živi! Sasvim živi!
Ne grickaj kao miš dane. Široko žvaći vazduh.
Prestiži vetar i ptice. Jer svaka večnost je kratka."
Miroslav Antić*

Zahvalnica

Ova teza je urađena na Katedri za biohemiju Hemijskog fakulteta u Beogradu pod rukovodstvom prof. dr Tanje Ćirković Veličković. Deo eksperimenta je urađen u laboratorijama na "Karolinska Institutet" u Švedskoj u grupi prof. dr Marianne van Hage.

Ovom prilikom želim da se zahvalim svom mentoru, prof. dr Tanji Ćirković Veličković na ukazanom poverenju, savetima i podršci tokom izrade doktorske disertacije. Hvala Vam što sam bila deo Vaše istraživačke familije, što ste podelili svoj entuzijazam za nauku bez koje ne bi bilo ove teze.

Zahvalnost dugujem i dr Dragani Stanić-Vučinić, na pomoći, savetima, sugestijama tokom izrade doktorske disertacije. Naše duge diskusije svih ovih godina su dale specifičan koloritet ove teze.

Prof. dr Mariji Gavrović-Jančulović i prof. dr Ivanka Karadžić se zahvaljujem na kritičnoj analizi i oceni ove teze.

Posebnu zahvalnost dugujem: prof. dr Marianne van Hage i dr Stef Koppelmanu, zbog pomoći u izradi dela ove teze. Vašom pozitivnošću i posvećenosti svi koraci u mom svetu nauke, iako još mali, prošli su lakše.

Želim da se zahvalim kolegama i prijateljima na podršci. Ova teza je obojena smehom i svim provedenim satima, danima i godinama zajedno. Hvala: Katarina, Miloše, Rado, Jano, Luka, Ivana, Marija P., Milice, Ana, Aleks, Bojana M., Jelena S., Mimi, Milena, Ane Laure, Sara SV, Thi Anh, Ladan, Sang, Maria Jose, Stephanie, Maria E., Jeanette, Neda, Ali, Konrad, Carl, John. Jelena R., hvala na interesantnim razgovorima koji potiču još od mojih studentskih dana. Jelena V., neka putovanja će ostati zapamćena, kao i tvoja pomoć ovom "besnom detetu", hvala. Maja, hvala što si uvek, ma gde god ja bila, uspela da me oraspoložiš i preneseš bar malo južnačkog duha kojeg bih izgubila vremenom da tako nije bilo. Marija S., hvala na zabavnim trenucima kako u laboratoriji i van nje, tako i u sitnim satima na putu od laboratorije ka kućama našim. Nikola, da još uvek radim foreze, tvoja duhovitost u zgradi HF-a i van nje ostaće zapisane ovde i zapamćene zauvek. Milice Vučetić, hvala za iskreno i dugogodišnje prijateljstvo, svi pohodi su bili zajednički i ostvareni. Obećavam biće još trenutaka, pohoda, duha, razgovora i vremena koji će dati kolorit svima nama.

Najveću zahvalnost dugujem majci Mariji i ocu Ljubi. Hvala što ste istrajali u mom obrazovanju, što ste bili beskrajna podrška u svemu i što ste pružali neizmernu ljubav. Svakij moj uspeh je i Vaš, Vi ste moji uzori i moji najmiliji. Puno hvala rođenoj sestri. Milice, odavno si vodila računa o jednom derištu. Hvala i tvojoj divnoj prođici koja mi nikada nije dozvolila da se osećam usamljenom. Hvala Kostu i malom Iliji, mojim sestricima koji su doneli radost našoj porodici.

Naslov: Imunoproteomika alergena hrane, modificovanih derivata alergena i alergeni peptida rezistentnih na digestiju

Rezime

Alergeni hrane predstavljaju jedan od uzroka anafilaksije u svetu, a samim tim i javni zdravstveni problem. U cilju razvoja efikasnije i bezbednije imunoterapije pacijenata alergičnih na hranu, neophodno je da se radi na identifikaciji i karakterizaciji uzročnika. U molekularnoj alergologiji imunoproteomika je pronašla savršenu primenu kako za identifikaciju, tako i za bolje razumevanje alergena, što tradicionalne tehnike nekada nisu bile u mogućnosti.

U ovoj tezi imunoproteomikom su ispitivani alergeni hrane. Kod novog sindroma alergije na hranu, pokazali smo da IgE antitela iz seruma pacijenta alergičnih na crveno meso prepoznaju više proteina iz različito termički obrađenog goveđeg mesa, od kojih su mnogi proteini prepoznati od strane anti- α -Gal antitela. MS/MS analiza proteinskih tačaka koje su vezivale IgE rezultiralo je u identifikaciji 18 proteina. Od ovih 18 proteina identifikovano je sedam novih IgE-vezujućih proteina koji sadrže α -Gal epitop, od kojih je četiri stabilno na termičku obradu. Samim tim, alergnost proteina iz crvenog mesa je očuvana čak i nakon različite termičke obrade. Ovim je pokazano da je α -Gal epitop uobičajeno prisutan u IgE-reaktivnim proteinima iz goveđeg mesa, prepoznatih od strane seruma pacijenata alergičnih na crveno meso.

Alergeni kikirikija predstavljaju najznačajnije uzročnike alergije na hranu, od kojih su konglutini, Ara h 2 i Ara h 6 najrelevantniji. Ovi proteini sadrže visoko-strukturirano jezgro, otporno na digestiju i visoku temperaturu, koje se drži zahvaljujući nekoliko disulfidnih mostova. U cilju razvoja imunoterapije za tretman alergije na kikiriki optimizovana je metoda za proizvodnju alergoida. Redukovanjem disulfidnih mostova, zatim alkilovanjem, pokazali smo da su sve disulfidne veze prekinute. Kao rezultat toga došlo je do promene u sekundarnoj i tercijskoj strukturi proteina, kao i do gotovo gubitka IgE-vezivanja. Međutim, korišćenjem limitiranih uslova modifikacije dolazi do stvaranja intermedijernih produkata u kojima dolazi do izmene disulfida, i koji su

neželjeni u razvoju farmaceutskog produkta. Kompletno modifikovane izoforme konglutina iz kikirikija, Ara h 2 i Ara h 6, pokazuju da je njihova alergena moć smanjena i da ovakav način modifikacije može poboljšati bezbednost imunoterapije.

Alergeni hrane često ne podležu kompletnoj proteolitičkoj obradi prilikom digestije u gastrointestinalnom sistemu što rezultira nastajanjem proteazno-rezistentnih peptida. Identifikovana je smeša heterogenih peptida koji sadrže hidrolizovani kratki segment koji se nalazi u unutrašnjosti strukture čiji su disulfidni mostovi očuvani. Mesta koja su najviše sklona hidrolizi od strane tripsina su N- i C-terminalni peptidi i eventualno limitirani delovi unutar proteina. Proteolitički rezistentni peptidi iz konglutin izoformi imaju struktuirano proteinsko jezgro koje je sposobno da veže IgE, samim tim i da izazove IgE posredovanu alergijsku reakciju. Ukratko, zaključujemo da su digestovani konglutini kikirikija heterogeni po prirodi i mogu da posluže u razvoju analitičkih tehnika za ispitivanje prisustva alergena kikirikija u različitim *in vivo* stadijumima digestije ili preuzimanja od strane ćelija imunog sistema kroz intestinalnu barijeru, što pomaže boljem razumevanju mehanizma alergijske reakcije.

Ključne reči: imunoproteomika / α -Gal epitop / konglutin / alergeni kikirikija / proteazno-rezistentni peptidi / alergija na crveno meso

Naučna oblast: Prirodno-matematičke nauke

Uža naučna oblast: Biohemija

UDK broj: 577.112

INFORMATION ABOUT DOCTORAL DISERTATION

Title: Immunoproteomics of food allergens, modified allergen derivates and allergenic digestion resistant peptides

Summary

Food allergens are the one of the cause for development of anaphylaxis in the world, and therefore the public health problem. For better management of patients it is necessary to work on the identification and characterization of causative agents in order to find an approach that would help in the development of immunotherapy. Immunoproteomics in molecular allergology found the perfect application for identifying and better understanding of allergens, which traditional techniques sometimes were not able to.

In this thesis we examined food allergens by immunoproteomics. In the new syndrome of food allergy, we have shown that IgE antibodies from the sera of the patients allergic to red meat recognize multiple proteins from different thermally processed beef, many of which have been recognized by anti- α -Gal antibodies. MS/MS analysis of protein spots, which were able to bind IgE, resulted in the identification of 18 proteins. Seven novel α -Gal-containing IgE-binding proteins were identified, of which four were stable to heat treatment. Thus, the allergenicity of red meat proteins is preserved even upon different thermal cooking. By this study we demonstrated that the α -Gal epitope is commonly present in IgE-reactive beef proteins recognized by meat-allergic patients.

Peanut allergens are the most important causes of food allergies, where conglutins, Ara h 2 and Ara h 6 are the most relevant allergens. These proteins contain a highly-structured protein core, resistant to digestion and a high temperature, which is held together by several disulfide bridges. In order to develop immunotherapy for peanut allergy we optimized the method for production of allergoids. By conglutin treatment with reduction agent, and subsequently with alkylation agent, we have shown that all disulfide bonds were reduced. Disulfide bond reduction resulted in a change in the protein secondary and tertiary structure, as well as in the loss of IgE-binding. However,

using of a modification at the limited conditions leads to the formation of intermediate products, in which scrambling of disulfide occurs, which are undesirable in the development of pharmaceutical product. Fully modified conglutin isoforms of peanut allergens, Ara h 2 and Ara h 6, show that their allergenic potency decreases, and that this kind of modification can improve security perspective of immunotherapy.

Food allergens are often resistant to complete proteolytic processing during digestion in gastro-intestinal system, resulting in digestion-resistant peptides. We identified the heterogenous mixture of peptides which contains hydrolyzed short segment that is located inside the structure in which the disulphide bonds are preserved. The N-terminal and C-terminal part of the conglutins, as well as a limited internal part was susceptible for proteolysis of the proteins. Digestion-resistant peptides from conglutin isoforms have structured protein core which is able to bind IgE, and therefore to induce IgE-mediated allergic reaction. In summary, we conclude that digested peanut conglutin isoforms are heterogeneous by nature, which can potentially be used for the development of analytical tools to investigate the presence of peanut epitopes at different stages of digestion and intestinal uptake *in vivo*, which will lead for better understanding of mechanism of allergic reaction.

Key words: immunoproteomics / α -Gal epitop / conglutin / peanut allergens / digestion-resistant peptide / red meat allergy

Scientific field: Life sciences

Scientific discipline: Biochemistry

UDK number: 577.112

SPISAK SKRAĆENICA

AA – akrilamid

ABC – amonijum bikarbonatni pufer

ANSCIUIS (*Allergen Nomenclature Sub-committee of the International Union of Immunological Societies*) – Subkomitet nomenklature alergena Internacionalne unije imunoloških društava

AP – alkalna fosfataza

BCA – bicinhoninska kiselina

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

CD – cirkularni dihroizam

DTT – ditiotreitrol

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

ESI – elektrosprej jonizacija

GI – gastrointestinalni

IL-4 – interleukin 4

IL-5 – interleukin 5

IL-13 – interleukin 13

Ig – imunoglobulin

JAM – jodacetamid

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

MS – masena spektrometrija

NSI – Nano electroSpray jonizacije

nsLTP – nespecifični lipid transferni protein

OVA – ovalbumin

PBS – fosfatom puferisan fiziološki rastvor

PBS-T – 0.5% Tween 20 u PBS-u

PVDF – polivinildifluorid

PR proteini – proteini vezani za patogenezu

PRP – protelitički rezistentni peptidi

SCIT – subkutana imunoterapija

SDS-PAGE – natrijum-dodecilsulfat elektroforeza na poliakrilamidnom gelu

TBS – Trisom puferisan fiziološki rastvor

TCR – T ćelijski receptor

TMB – tetrametilbenzidin

TTBS – 0.1% Tween 20 u TBS-u

WHO (*World Health Organization*) – Svetska zdravstvena organizacija

α -Gal – galaktozo- α 1,3-galaktoza

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1. Ciljevi.....	3
1.2. Publikacije proistekle iz teze.....	4
2. Opšti deo.....	5
2.1. Mehanizam nastanka alergijskih reakcija.....	5
2.2. Alergije na hranu.....	7
2.2.1. Alergeni hrane.....	8
2.3. Gastrointestinalni trakta i njegov imunski sistem kod alergije na hranu.....	9
2.3.1. Digestibilnost alergena hrane.....	10
2.4. Alergija na crveno meso.....	12
2.5. Molekulska osnova alergije na kikiriki	14
2.5.1. Konglutinini kikirikija, Ara h 2 i Ara h 6; struktura i funkcija.....	16
2.6. Imunoterapija.....	17
2.6.1. Hemijske modifikacije alergena	19
3. Imunoproteomika proteina crvenog mesa; identifikacija novih α-Gal alergena.....	21
3.1. Uvod	21
3.2. Materijal i metode.....	22
3.2.1. Serumi pacijenata.....	22
3.2.2. Priprema govedeg mesa i ekstrakcija proteina	22
3.2.3. SDS PAGE i imunoblot analiza	23
3.2.4. Enzimaska deglikozilacija	24
3.2.5. 2D elektroforeza visoke rezolucije (2D PAGE) i 2D imunoblot.....	24
3.2.6. Digestija u gelu i LC-ESI MS/MS identifikacija IgE vezujućih proteina mesa.....	25
3.2.7. IgE-vezivanje na čvrstoj fazi.....	25
3.3. Rezultati.....	26
3.3.1. Pacijenti alergični na crveno meso prepoznaju proteine iz termalno obrađenog mesa.....	26
3.3.2. 2D PAGE profili proteina kod termalno obrađenog mesa.....	28
3.3.3. Identifikacija IgE-vezujućih alergena govedeg mesa.....	29

3.3.4. Identifikacija proteina govedeg mesa koji sadrže α -Gal.....	31
3.3.5. Inhibicija α -Gal epitopa.....	33
3.4. Diskusija.....	33
4. Karakterizacija intermedijernih i krajnjih produkata izoformi Ara h 2 i Ara h 6 alergena kikirikija dobijenih redukovanjem i alkilovanjem.....	37
4.1. Uvod.....	37
4.2. Materijal i metode	38
4.2.1. Izolovanje izoformi Ara h 2 i Ara h 6 alergena.....	38
4.2.2. Optimizacija metoda za modifikaciju izoformi Ara h 2 i Ara h 6 alergena.....	39
4.2.3. SDS PAGE analiza prirodnih i redukovano-alkilovanih izoformi Ara h 2 i Ara h 6 alergena.....	39
4.2.4. Masena spektrometrijska analiza intaktnih izoformi Ara h 2 i Ara h 6 alergena.....	40
4.2.5. Spektroskopija cirkularnog dihroizma (CD).....	40
4.2.6. Spektrofluorimetrijska analiza prirodnih i modifikovanih izoformi Ara h 2 i Ara h 6 alergena	41
4.2.7. Peptidno mapiranje (<i>Peptide Mass Fingerprint</i>).....	41
4.2.8. Inhibicija vezivanja IgE antitela u ELISA testu.....	42
4.3. Rezultati	43
4.3.1. Molekulska masa prirodnih i redukovano-alkilovanih izoformi Ara h 2 i Ara h 6 alergena.....	43
4.3.2. Strukturni aspekti Ara h 2 izoformi i Ara h 6, pre i nakon modifikacije.....	45
4.3.3. Kinetika modifikacije - redukovanje i alkilovanje praćeno elektroforetskom mobilnošću.....	47
4.3.4. Kinetika modifikacije - redukovanje i alkilovanje praćeno povećanjem masa....	49
4.3.5. Karakterizacija disulfidnih veza tokom procesa modifikacije.....	52
4.3.6. IgE vezujuće osobine modifikata.....	56
4.4. Diskusija.....	56
5. Karakterizacija alergernih peptida Ara h 2 i Ara h 6 alergena kikirikija dobijenih tripsinskom proteolizom	60
5.1. Uvod.....	60
5.2. Materijal i metode	61
5.2.1. Konglutin izoforme kikirikija i tripsin.....	61

5.2.2. Digestija konglutin izoformi tripisnom.....	61
5.2.3. Spektroskopija cirkularnog dihroizma.....	62
5.2.4. Maseno spektrometrijska analiza.....	62
5.2.5. Identifikacija proteolitičko-rezistentnih peptida Ara h 2 izoformi i Ara h 6.....	63
5.2.6. 2D PAGE i 2D IgE-imunoblot.....	63
5.2.7. Inhibicija vezivanja IgE antitela ELISA testom.....	64
5.3. Rezultati	64
5.3.1. Prolongirana digestija tripisnom daje stabilne peptide iz konglutin izoformi čije strukture nisu promjenjene.....	64
5.3.2. Identifikacija sekvenci peptida dobijenih digestijom.....	66
5.3.3. Proteazno-rezistentni peptidi imaju sposobnost IgE-vezivanja kao i prirodne konglutin izoforme.....	74
5.4. Diskusija	76
6. Zaključci.....	80
7. Literatura.....	82
8. Prilozi.....	95

1. Uvod

Alergije na hranu su postale značajan javni zdravstveni problem koji je u prethodnoj deceniji zahvaćen „drugim talasom“ alergijske epidemije (Prescott, S. and Allen, K. J. 2011). Posledice alergijskih reakcija mogu da budu vrlo ozbiljne, a u retkim slučajevima čak i kobne. Za sad ne postoji lek za alergije na hranu, tako da je pravovremena dijagnostika i striktno izbegavanje alergena hrane za sad jedini način sprečavanja ozbiljnih zdravstvenih posledica (Sampson, H. A. 2004).

Izlaganje epitopa alergena antigen-prezentujućoj ćeliji dovodi to aktivacije T_H2 odgovora, što dalje indukuje produkciju IgE antitela i daljom kaskadnom reakcijom dovodi do reakcije preosetljivosti. Galakotozo- α 1,3-galaktoza (α -Gal) je šećer koji se nalazi na glikoproteinima i glikolipidima svih sisara osim primata (uključujući i ljude) (Thall, A. and Galili, U. 1990). Poznato je da komensalne bakterije u gastrointestinalnom traktu čoveka takođe sadrže ovaj oligosaharid. Izlaganje α -Gal epitopima (npr. konzumiranje goveđeg mesa, kravljeg mleka, itd.) rezultuje razvojem imunske tolerancije generisanjem IgG antitela, koje je jedno od najdominantnijih (oko 1% od ukupnog IgG antitela u ljudskom organizmu). Alergija na crveno meso nije adekvatno istraživana sve dok nije opisan novi sindrom, kojeg karakteriše odložena reakcija na meso sisara, sa IgE antitelima u serumu usmerenim na oligosaharidnu komponentu proteina. Mehanizam razvoja alergijske reakcije i dalje nije u potpunosti istražen. Ova reakcija je praćena urtikarijom, angioedemom i progresivnom sistemskom anafilaskom 3-7 h nakon unosa hrane (Commins, S. P. and Platts-Mills, T. A. 2013).

Alergen-specifična imunoterapija je za sad jedini efikasan pristup za tretiranje alergija. S obzirom da je kod alergije na hranu subkutana imunoterapija sa prirodnim alergenima imala dosta neželjenih efekata, sve više se radi na razvoju novih oblika imunoterapije, koji su dizajnirani da ublaže T_H2 odgovor na alergene i obezbede sigurniju alternativu od subkutane imunoterapije. Alergen-specifična imunoterapija može uključiti davanje standardne terapije, modifikaciju ekstrakta alergena ili promenu načina isporuke alergena (Casale, T. B. and Stokes, J. R. 2011). Hemijske modifikacije

proteina hrane mogu dovesti do promene naelektrisanja i/ili hidrofobnosti proteina, što zauzvrat može umanjiti ili eliminisati alergnost hrane. Ovakav tip modifikacija koristi se u proizvodnji alergioda, koji teoretski redukuju IgE epitope dok čuvaju T-ćelijske epitope (Marsh, D. G., Lichtenstein, L. M. et al. 1970). Glavni cilj modifikacija proteina za alergen-specifičnu imunoterapiju je dobijanje preparata koji će biti efikasan i bezbedan po pacijenta. S druge strane, alergija na kikiriki još uvek predstavlja najznačajniji tip alergije na hranu za koji do danas ne postoji adekvatna imunoterapija. Pacijenti alergični na kikiriki su većinom senzitivisani na Ara h 2 i Ara h 6 proteine, koji se i dan danas izučavaju sa aspekta strukturne stabilnosti i alergnosti (Klemans, R. J., van Os-Medendorp, H. et al. 2014).

Poznato je da alergeni hrane koji ne podležu digestiji gastro-intestinalnim proteazama imaju veći alergni potencijal zbog kompaktne strukture. U odnosu na druge alergene iz kikirikija, konglutinske izoforme su veoma rezistentne na proteolizu u gastro-intestinalnom (GI) traktu, pri čemu nastaju protelitički rezistentni peptidi detektovani u humanim tečnostima (pljuvačka, serum i majčino mleko) (Baumert, J. L., Peeters, K. A. et al. 2006; Baumert, J. L., Bush, R. K. et al. 2009). Za sad postoje samo limitirani podaci o strukturi i alergnosti ovih peptida, tako da je samim tim priroda i način predstavljanja epitopa ovih peptida imunskom sistemu i dalje nerazješnjena.

Imunoproteomika (*enlg. Immunoproteomics*) predstavlja relativno novi koncept u proteomici (*enlg. Proteomics*). Primjenjuje kod definisanja pod-skupa proteina koji indukuju imunski odgovor. U molekularnoj alergologiji imunoproteomika je pronašla primenu u identifikaciji i karakterizaciji alergena, kao i imunomodulatora imunskog odgovora (Nakamura, R. and Teshima, R. 2014). Sa obzirom da se kod alergena hrane ispituje digestibilnost i uticaj matriksa hrane na alergnost, imunoproteomici se mogu pridodati i druge grane proteomike, kao što je *Foodomics* (*enlg.*) ili još bliže, nova podgrana *Digestomics* (*enlg.*) (Picariello, G., Mamone, G. et al. 2013).

1.1. Ciljevi

U okviru ove teze formulirano je nekoliko ciljeva:

- 1) Identifikacija proteina goveđeg mesa koji vezuju IgE antitela iz seruma pacijenata alergičnih na crveno meso. Identifikacija i karakterizacija proteina nosioca α -Gal šećera u proteinskom ekstraktu goveđeg mesa. Ispitivanje IgE prepoznavanja šećerne determinante i alergnosti ekstrakata različito termički obrađenog mesa;
- 2) Optimizacija hemijske modifikacije glavnih alergena kikirikija Ara h 2 i Ara h 6 redukcijom i alkilacijom. Karakterizacija strukture i funkcije intermedijernih i krajnjih produkata redukovanih i alkilovanih Ara h 2 i Ara h 6. Ispitivanje afiniteta za vezivanje IgE antitela, iz seruma pacijenata alergičnih na kikiriki, krajnjih produkata hemijske modifikacije Ara h 2 i Ara h 6 i njihove potentnosti;
- 3) Identifikacija peptida Ara h 2 i Ara h 6 alergena rezistentnih na digestiju. Strukturna karakterizacija peptide Ara h 2 i Ara h 6 rezistentnih na digestiju, kao i ispitivanje alergnosti i njihovog afiniteta vezivanja za IgE antitela iz seruma pacijenata alergičnih na kikiriki.

1.2. Publikacije proistekle iz teze

- 1) **Apostolovic, D.**, Luykx, D., Warmenhoven, H., Verbart, D., Stanic-Vucinic, D., de Jong, G. A. H., Velickovic, T. C., and Koppelman, S. J. 2013. Reduction and Alkylation of Peanut Allergen Isoforms Ara h 2 and Ara h 6; Characterization of Intermediate- and End Products. *Biochimica Et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1834 (12): 2832-2842. (M21, IF₂₀₁₂ 3,73)
- 2) **Apostolovic, D.***, Tran T. A. T. *, Hamsten, C., Starkhammar, M., Cirkovic Velickovic, T., and van Hage, M. 2014. Immunoproteomics of Processed Beef Proteins Reveal Novel Galactose- α -1,3-Galactose-Containing Allergens. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 69 (10): 1308-1315.(M21, IF₂₀₁₃ 5,99) *equally contributing
- 3) **Apostolovic, D.**, de Jongh, H.H.J., Stanic-Vucinic, D., de Jong G. A. H., Vesic, J., Radosavljevic, J., Nordlee, J. A., Baumert, J. L., Taylor, S. L., Clua, N. G., Cirkovic Velickovic, T., and Koppelman, S. J. Characterization of digestion-resistant peptides from peanut conglutins Ara h 2 and Ara h 6. *Manuscript in preparation*

2. Opšti deo

Tokom poslednjih godina XIX veka opisan je novi sistem organizma, čija je funkcija da odbrani telo od napada mikroorganizma, koji je nazvan imunski sistem (Igea, J. M. 2013). U to vreme zbog ubrzane industrijalizacije u Evropi i Severnoj Americi došlo je do razvoja novih bolesti i neobičnih reakcija koji lekari nisu umeli da objasne. Samo neki od njih su posumnjali da su "nove" bolesti povezane sa odgovorom imunskog sistema. Tako je *Clemens von Pirquet* pre skoro 110 godina prvi put opisao pojam *alergija*, kao preosetljivost na inače bezopasne čestice, kao što su polen, prašina ili neke vrste hrane (Bukantz, S. C. 2002).

Sve do šezdesetih godina prošlog veka se polemicalo koji faktor u serumu izaziva alergiju. Otkriće IgE antitela uticalo je na značajno razumevanje alergije i imunologije (Johansson, S. G. 2011). Danas je pojam *alergije* definisan kao poremećaj imunskog sistema, i predstavlja prvi od četiri tipa preosetljivosti, za koje je karakteristična povećana proizvodnja IgE antitela na bezopasne molekule (alergene). Alergeni su molekuli dominantno proteinske ili glikoproteinske strukture, molekulskih masa u rasponu od 5-80 kDa, dok ređe alergeni mogu biti i mali molekuli (Mills, E. N. and Breiteneder, H. 2005).

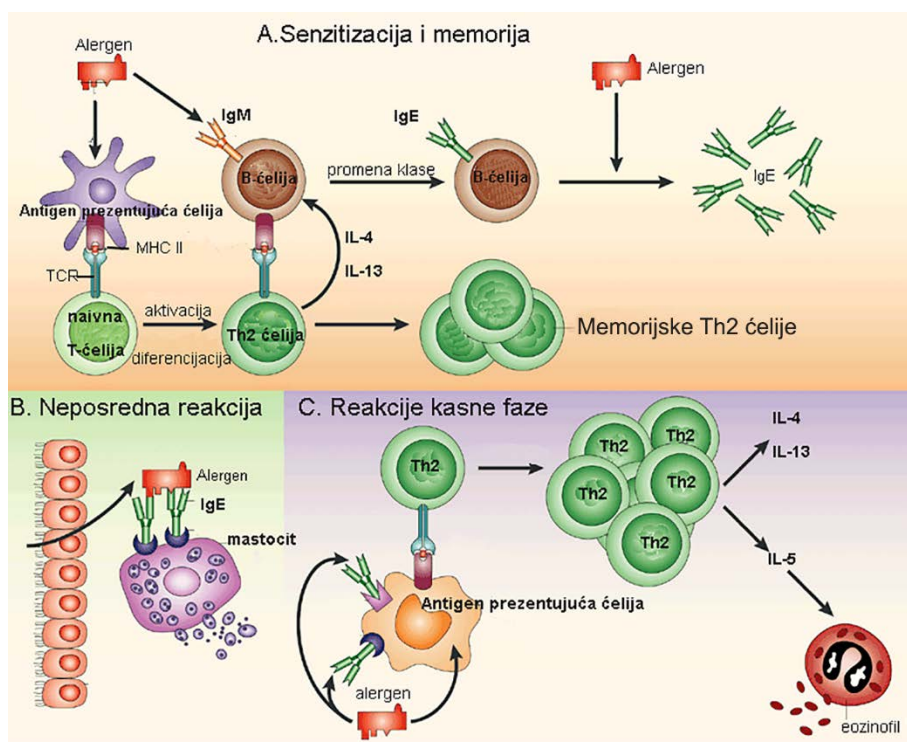
2.1. Mehanizmi alergijske reakcije

Mehanizam alergijskih reakcija se može podeliti na: fazu senzitivacije i indukcije memorije, rane i kasne preosetljivosti (Slika 2.1.) (Valenta, R. 2002)

Faza senzitivacije i indukcije memorije počinje proizvodnjom IgE antitela i to se najčešće dešava prilikom prvog izlaganja alergenu. Antigen-prezentujuće ćelije (dendritične ćelije) fagocituju i procesuju alergen do peptida, koji bivaju zatim prezentovani u sklopu kompleksa sa odgovarajućim MHC molekulima klase II naivnim CD4⁺ T-ćelijama. Prepoznavanje peptid-MHC kompleksa preko T ćelijskog receptora (TCR) za naivne T-ćelije predstavlja signal za diferencijaciju i klonsku ekspanziju naivnih CD4⁺ T ćelija u T pomoćničke ćelije (T_H2) koje proizvode IL-4, IL-5 i IL-13. U

isto vreme susedne naivne B-ćelije pomoću membranski vezanih IgM antitela prepoznaju i preuzimaju antigen i predstavljaju ga T_H2-ćelijama. Dejstvo IL-4 i IL-13 će stimulisati promenu klase antitela u B-ćelijama iz IgM u IgE, koja se dalje sekretuju nakon klonske ekspanzije (Valenta, R. 2002). Sekretovana IgE antitela se vezuju za Fc_εRI receptore koji su locirani na površini mastocita i bazofila.

Pri sledećem susretu sa alergenom dolazi do njegovog vezivanja za IgE što predstavlja ranu fazu preosetljivosti. Multivalentno vezivanje alergena za IgE, koji je pak vezan za Fc_εRI receptore i sledstveno agregiranje Fc_εRI, su okidač za aktivaciju mastocita i bazofila. Aktiviranje signalne kaskade 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.



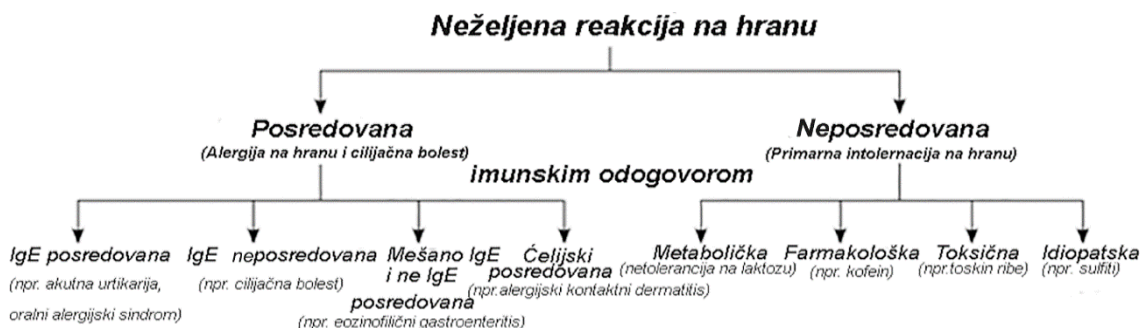
Slika 2.1. Mehanizam alergijskih reakcija se može podeliti na tri faze: fazu senzitivacije i indukcije memorije, rane i kasne faze preosetljivosti. Preuzeto i modifikovano iz (Valenta, R. 2002).

Pored trenutnih simptoma, oslobađanje medijatora od strane bazofila i mastocita, pokreće i dugotrajne inflamatorne procese koji su vezani za privlačenje raznih imunih ćelija na mesta izlaganja alergenu, uključujući T_H2 limfocite, eozinofile, bazofile i monocite. Ovo predstavlja kasnu fazu preosetljivosti za koju su potrebni sati do nekoliko dana.

2.2. Alergije na hranu

Alergija na hranu je definisana kao skup neželjenih efekata po zdravlje koji proizilaze iz specifičnog imunskog odgovora, a koji se javlja ponovnim izlaganjem datoj hrani (Boyce, J. A., Assa'ad, A. et al. 2010; Boyce, J. A., Assa'ad, A. et al. 2010). *Hrana* pak predstavlja bilo koju supstancu – neobrađenu, polu-obrađenu ili obrađenu koja je namenjena ljudskoj primeni, a i uključuje pića, žvakaće gume, prehrambene aditive i dodatke ishrani (Boyce, J. A., Assa'ad, A. et al. 2010). Alergija na hranu je problem koji je godinama opšteprisutan u našem društvu. Predstavlja bolest koja se često javlja kod dece i u poslednjim decenijama javlja se kao "drugi talas" alergijske epidemije (Prescott, S. and Allen, K. J. 2011). Učestalost se procenjuje na 12% kod dece (Boyce, J. A., Assa'ad, A. et al. 2010), odnosno 10 % u populaciji odraslih (Sicherer, S. H. 2011).

Pacijenti često mešaju netoleranciju na hranu i alergiju na hranu, i samim tim postoji verovanje da je alergija na hranu učestalija nego što je zabeleženo. Neželjena alergijska reakcija može biti posredovana imunskim odgovorom ili neposredovana i tad se naziva intolerancija na hranu (Slika 2.2.) (Boyce, J. A., Assa'ad, A. et al. 2010).



Slika 2.2. Neželjene reakcije na hranu. Preuzeto i modifikovano iz (Boyce, J. A., Assa'ad, A. et al. 2010).

Alergija na hranu je deo atopijskog sindroma (povišen nivo IgE antitela u odgovoru na razne antigene), gde zajedno sa atopijskim dermatitisom čini prvu manifestaciju atopije kod male dece. Alergija na hranu može dovesti do blagih, umerenih, ali i do ozbiljnih simptoma kao što je anafilaksa (sistemski oblik rane preosetljivosti) (Kumar, S., Verma, A. K. et al. 2012).

S obzirom da uloga reakcije kasne preosetljivosti još uvek nije jasna, danas se pod terminom alergija na hranu podrazumeva isključivo IgE-om posredovana reakcija. Preosetljivost se javlja kao posledica povećane produkcije IgE u odgovoru na, inače bezopasne, alergene hrane. IgE se vezuje za Fc_εRI receptor visokog afiniteta na površini efektorskih ćelija (bazofili, mastociti) i dolazi do njihove aktivacije, koja ima za posledicu oslobađanje medijatora (histamina, leukotrijena i interleukina) (Taylor, S. L., Lemanske, R. F., Jr. et al. 1987; Simecka, J. W. 1998; Hefle, S. L. 2001).

2.2.1. Alergeni hrane

Glavnih osam uzročnika alergija na hranu su jaja, mleko, morski mekušci, riba, pšenica, kikiriki, soja i orašasto voće. Svi alergeni hrane se zahvaljujući strukturnim i funkcionalnim karakteristikama mogu klasifikovati u familije i super-familije. Mnogi od proteina pripadaju kupinskoj, prolaminskoj super-familiji i familiji proteina povezanih sa patogenezom (*engl. Patogenesis-Related, PR*) ili Bet v 1 familiji. Kupinsku super-familiju čine 7S i 11S proteini skladišteni u semenu i podeljeni su u vicilinske i leguminske familije (soja, kikiriki i orašasto voće). Prolaminska super-familija je podeljena na tri glavne grupe: 2S albumini (orašasto voće), nespecifični lipidni transfer proteini (*engl. non-specific Lipid Transfer Proteins, nsLTP*) (voće i povrće) i α-amilaze/tripsinski inhibitori u ceralijama (Breiteneder, H. and Radauer, C. 2004; Chapman, M. D., Pomes, A. et al. 2007).

Zajednička osobina alergena hrane je da su otporni na visoke temperature, kiseline i digestiju proteazama. Glikozilovanje, vezivanje lipida i masnih kiselina ili formiranje intramolekulskih disulfidnih mostova čini alergene hrane još stabilnijim (Lehrer, S. B., Ayuso, R. et al. 2002; Teuber, S. S. 2002). Ipak nije svaki protein sa ovim karakteristikama alergen.

2.3. Gastrointestinalni trakt i njegov imunski sistem kod alergija na hranu

Ulogu digestije hrane i apsorpcije nutritijenata ima gastrointestinalni trakt (GIT) kojeg čini dugačka cev, sa lokalnim proširenjima i suženjima, i proteže se kroz organizam od usnog do analnog otvora. Usna duplja predstavlja početak GIT-a u kojoj, lučenjem pljuvačke, otpočinje varenje hidrolizom skroba i glikogena. Bolus se zatim transportuje gutanjem kroz ždrelo i jednjak do želuca (Guyton, A. C. and Hall, J. E. 1996). Hrana se meša sa želudačnim sokom uz pomoć pokreta glatke muskulature želuca. Zid želuca čine četiri sloja: mukoza, submukoza, spoljašnji mišićni sloj i seroza. Mukozu sačinjava više tipova epitelnih žlezdanih ćelija, *lamina propria* i tanak sloj glatkih mišićnih ćelija. Submukoza je sloj rastresitog vezivnog tkiva između mukoze i spoljašnjeg mišićnog sloja. Sadrži krvne i limfne sudove, neurone, i brojne ćelije: limfocite, makrofage, mastocite, eozinofile i plazma ćelije. Seroza se nalazi ispod spoljašnjeg mišićnog sloja i sačinjava je vezivno tkivo (Guyton, A. C. and Hall, J. E. 1996).

Proizvodi sekrecije mukoznih egzokrinih žlezda čine želudačni sok. Najbrojnije su fundusne gastrične žlezde koje se sastoje od tri tipa sekretornih ćelija: mukoznih, peptičnih i parijetalnih (Guyton, A. C. and Hall, J. E. 1996). Parijetalne ćelije luče hlorovodoničnu kiselinu i unutrašnji faktor (glikoprotein koji vezuje vitamin B₁₂ i omogućava njegovu apsorpciju u tankom crevu) (Hersey, S. J. and Sachs, G. 1995). Peptične ćelije fundusnih žlezda luče pepsinogen iz zimogenih granula kao odgovor na stimulaciju nerva *vagusa* i prisustvo gastrina. Pepsinogen se u kiseloj sredini, koju obezbeđuje HCl u lumenu želuca, pretvara u pepsin. Pepsin katalizuje uglavnom hidrolizu peptidnih veza u proteinima, iza aromatičnih aminokiselina, ali ne izrazito specifično. Pepsin ima pH optimum između pH vrednosti 1.5 i 2.0, dok se ireverzibilno denaturišu na pH > 5.0. 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).

S obzirom da sve što unesemo u naš organizam se smatra stranim bitno je kako će naš imunski sistem odreagovati. Način na koji će imuni sistem gastrointestinalnog trakta odreagovati na antigen prvenstveno zavisi od puta ulaska antigena iz intestinalnog lumena u organizam i načina njegovog prikazivanja mukoznom imunom sistemu.

Važan put ulaska antigena prisutnih u lumenu creva predstavljaju organizovane strukture limfoidnog tkiva poznate kao Pejerove ploče (*engl. Peyer's Patches, PP*) koje su distribuirane u submukozi intestinalnog zida, ispod M ćelija (mikrofold ćelije). M ćelije su podgrupa ćelija intestinalnog epitela, specijalizovane za preuzimanje čestičnih antigena iz lumena i njihovo prebacivanje (transcitozu) u subepitel creva do antigen-prezentujućih ćelija (dendritične ćelije ili makrofagi). Po preuzimanju i fagocitozi 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. Klasa antitela koja će se proizvoditi zavisi od citokina koji su prisutni u Pejerovim pločama (Rimoldi, M. and Rescigno, M. 2005).

Drugi važan put ulaska u organizam i prikazivanja antigena imunom sistemu je preko sub-epitelnih CD103⁺CCR7⁺ dendritičnih ćelija. Nedavno je pokazano da intestinalne dendritične ćelije eksprimiraju proteine koji učestvuju u formiranju međućelijskih čvrstih veza, te su sposobni da otvore čvrste veze između susednih enterocita, izbace nastavke u lumen creva i preuzmu rastvorne antigene ili bakterije direktno iz lumena (Rescigno, M., Urbano, M. et al. 2001; Rimoldi, M. and Rescigno, M. 2005). Populacija sub-epitelnih dendritičnih ćelija intestinuma dominantno je naivnog karaktera. Pokazano je da naivne dendritične ćelije konstitutivno migriraju u periferne limfne organe izazivajući perifernu toleranciju (Callery, M. P., Kamei, T. et al. 1989). Ukoliko ne dođe do fagocitoze antigena koji su prošli kroz intestinalni epitel od strane prisutnih dendritičnih ćelija, oni preko kapilara submukoze prelaze u portalnu cirkulaciju jetre (Callery, M. P., Kamei, T. et al. 1989).

2.3.1. Digestibilnost alergena hrane

U naučnoj javnosti opšte je prihvaćeno da su alergeni hrane, koji senzibilišu preko GI trakta, proteini koji su stabilni na hidrolizu pepsinom. Pošto se mukozno tkivo imunog sistema u GI traktu nalazi duž intestinuma, a samo proteini ili njihovi veći

fragменти imaju dovoljno strukturnog integriteta da izazovu senzibilizaciju, smatra se da je stabilnost proteina hrane na proteolizu pepsinom preduslov za njihovu alergnost (Astwood, J. D., Leach, J. N. et al. 1996).

Standardizovan esej digestibilnosti genetski modifikovanih biljaka prihvaćen od strane svetske zdravstvene organizacije (*engl. World Health Organisation, WHO*) po svim gore navedenim uslovima nije pouzdan kriterijum za proveru digestibilnosti čistih proteina i za utvrđivanje mogućih posledica koje ovi proteini mogu da izazovu u realnim uslovima. *Astwood i saradnici* (1996) su primetili veću stabilnost proteina hrane koji su alergeni, u poređenju sa nealergenim proteinima, kao i formiranje stabilnih peptidnih fragmenata u standardnom simuliranom želudačnom soku (Astwood, J. D., Leach, J. N. et al. 1996). Najveći broj testiranih alergena bio je kompletno stabilan u simuliranom želudačnom soku tokom 60 minuta, dok se nealergeni degradiraju u roku od 15 sekundi (Astwood, J. D., Leach, J. N. et al. 1996; Schnell, S. and Herman, R. A. 2009; Wickham, M., Faulks, R. et al. 2009). Međutim, uslovi pod kojima različiti autori primenjuju test digestibilnosti se razlikuju, tj. odnos pepsin/protein jako utiče na period stabilnosti proteina, i proteini koji pripadaju istim familijama se slično ponašaju, nezavisno od toga da li su identifikovani kao alergeni ili ne (Fu, T. J. 2002; Thomas, K., Aalbers, M. et al. 2004). Na esej takođe utiču i čistoća preparata pepsina, kao i efekat matriksa hrane u kom se alergen nalazi (Moreno, F. J., Mackie, A. R. et al. 2005; Polovic, N., Blanusa, M. et al. 2007; Wickham, M., Faulks, R. et al. 2009). Da bi se dobila potpuna informacija o alergnom potencijalu hrane *in vitro* analiza mora detektovati nativni protein, peptide nastale digestijom, kao i imunoreaktivnost oba. Pored pepsinske digestije, digestibilnost alergena hrane je ispitivana i sa tripsinom/himotripsinom kao najzastupljenijim proteazama u intestinalnom traktu (Moreno, F. J., Mellon, F. A. et al. 2005).

Nedavno je grupa istraživača objavila standardizovan statični *in vitro* protokol za digestiju hrane koji je fiziološki relevantniji od drugih, koji može da koristi kompleksnije sisteme (matriks hrane i dr.) i koji uključuje oralnu, gastričnu i intestinalnu fazu digestije (Minekus, M., Alvinger, M. et al. 2014).

2.4. Alergija na crveno meso

Među alergijama na hranu alergija na crveno meso je manje učestala (Orhan, F. and Sekerel, B. E. 2003; Jacquenet, S., Moneret-Vautrin, D. A. et al. 2009). Pored toga, ova alergija na hranu nije adekvatno istraživana sve dok nije pokazana ukrštena reaktivnost između govedine, kravljeg mleka i drugih vrsta crvenog mesa (Eigenmann, P. A. 2002; Martelli, A., De Chiara, A. et al. 2002; Restani, P., Beretta, B. et al. 2002; Mamikoglu, B. 2005). Neke od ovih reakcija se odnose na tzv. "svinjsko-mačji sindrom" (*engl. "pork-cat syndrome"*), koji podrazumeva ukrštenu reaktivnost između epitelijalnih alergena iz mačke i svinjskog mesa (Drouet, M., Sabbah, A. et al. 2001; Savi, E., Rossi, A. et al. 2006; Posthumus, J., James, H. R. et al. 2013). Pretpostavljalo se da je reakcija na meso sisara trenutna, zbog IgE usmerene reakcije na specifične alergene kao što je goveđi serum albumin (*engl. Bovine Serum Albumin, BSA*) (Fiocchi, A., Restani, P. et al. 2000; Tanabe, S., Shibata, R. et al. 2004; Fiocchi, A., Restani, P. et al. 2005).

Međutim, istraživači su u prethodnih nekoliko godina opisali novi sindrom, kojeg karakteriše odložena reakcija na meso sisara, sa IgE antitelima usmerenim na oligosaharidnu komponentu (Commins, S. P. and Platts-Mills, T. A. 2009; Commins, S. P., Satinover, S. M. et al. 2009; Gronlund, H., Adedoyin, J. et al. 2009; Commins, S. P. and Platts-Mills, T. A. 2010). IgE antitela su usmerena na galaktozo- α 1,3-galaktozu (α -Gal), oligosaharid prisutan kod ne-primata (Macher, B. A. and Galili, U. 2008). Antitela su prvi put pronađena od strane *Chung i saradnika* (2008), koji su istraživali uzrok alergijske reakcije na monoklonsko antitelo *Cetuximab* kod pacijenata kod kojih je ovim antitelom lečen kancer (Chung, C. H., Mirakhur, B. et al. 2008). Nakon toga pokazana je uloga ovog oligosaharida u produkciji IgE antitela kod pacijenata alergičnih na crveno meso (Commins, S. P., Satinover, S. M. et al. 2009; Nunez, R., Carballada, F. et al. 2011).

Galaktozo- α 1,3-galaktoza je prisutna u govedini, svinjetini, jagnjetini (Macher, B. A. and Galili, U. 2008; Commins, S. P. and Platts-Mills, T. A. 2010) i mačjoj dlaci (Gronlund, H., Adedoyin, J. et al. 2009; Arkestal, K., Sibanda, E. et al. 2011), dok nije prisutna kod ptica, riba i čoveka (Macher, B. A. and Galili, U. 2008). Kod viših primata je tokom evolucije došlo do inaktivacije gena koji eksprimira enzim β -galaktozo- α 1,3-

galaktozil transferazu, a koji je odgovoran za formiranje $\alpha 1 \rightarrow 3$ veze. Kao rezultat, kod imunokompetentnog pojedinca dolazi do produkcije IgG antitela na α -Gal (Macher, B. A. and Galili, U. 2008). Ova antitela doprinose odbacivanju ksenotransplantata, npr. svinjskog organa kod ljudi (primalaca). Sa druge strane, visoka imunogenost mu dozvoljava upotrebu u anti-virusnim vakcinama i vakcinama protiv tumora (Galili, U. 2005; Macher, B. A. and Galili, U. 2008).

Izlaganje hrani bogatoj α -Gal epitopima (npr. goveđe meso) rezultuje generisanjem IgG antitela i razvojem imunske tolerancije. Međutim kod izloženih pojedinaca izlaganje epitopa antigen-prezentujućoj ćeliji dovodi to T_H2 aktivacije, što dalje indukuje produkciju IgE antitela i daljom kaskadnom reakcijom dovodi do reakcije preosetljivosti praćene urtikarijom, angioedemom i progresivnom sistemskom anafilaskom (Kumar, S., Verma, A. K. et al. 2012). Ono što je jako karakteristično za α -Gal reakciju preosetljivosti na crveno meso je njegova jako odložena reakcija. Tačnije, gore navedeni klinički simptomi se javljaju tek 3-7 h nakon izlaganja crvenom mesu (Commins, S. P., Satinover, S. M. et al. 2009; Jacquenet, S., Moneret-Vautrin, D. A. et al. 2009; Nunez, R., Carballada, F. et al. 2011), što je često otežavajuć factor često i otežavalo pri dijagnostici ove bolesti. Mehanizam razvoja ove odložene alergijske reakcije je i dalje nepoznat (Saleh, H., Embry, S. et al. 2012).

Godinama je u jugoistočnom delu SAD učestalost alergije na crveno meso rasla, a primećen je i porast učestalosti neželjene reakcije na *Cetuximab*, što je dovelo je do razmišljanja o faktorima koji ih povezuju, npr. ishrana i izloženost tzv. *Lone Star* krpeljima (O'Neil, B. H., Allen, R. et al. 2007; Chung, C. H., Mirakhor, B. et al. 2008; Commins, S. P., James, H. R. et al. 2011). Naime, *Commins i saradnici* (2011) su pokazali da ujed krpelja prethodi preosetljivosti na α -Gal (Commins, S. P., James, H. R. et al. 2011). Kasnije je reakcija preosetljivosti na crveno meso, kao i korelacija sa krpeljima, pokazana i na drugim geografskim područjima uključujući šire područje SAD (Commins, S. P., Satinover, S. M. et al. 2009), Australiju (Van Nunen, S. A., O'Connor, K. S. et al. 2009) i Evropu (Nunez, R., Carballada, F. et al. 2011; Hamsten, C., Starkhammar, M. et al. 2013; Hamsten, C., Tran, T. A. et al. 2013). Razlog povezanosti α -Gal neželjene reakcije na crveno meso i senzibilizacije sa krpeljima još

uvek nije poznat, s obzirom da se na svim prijavljenim geografskim područjima nalaze različite vrste krpelja.

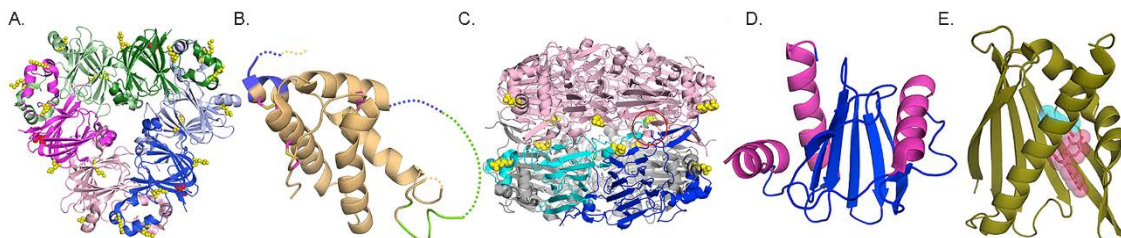
2.5. Molekulska osnova alergije na kikiriki

Kikiriki (*Arachis hypogaea*) je veoma nutritivna i važna hrana širom sveta. Međutim, konzumiranje kikirikija ili prehrambenih proizvoda bogatih kikirikijem može izazvati ozbiljne, pa čak i fatalne, alergijske reakcije na pojedincima (Sampson, H. A. 2004).

Alergija na kikiriki predstavlja veliki svetski zdravstveni problem. Pokazano je da je od 1997-2008 godine učestalost alergije na kikiriki 11 godina (Sicherer, S. H., Munoz-Furlong, A. et al. 1999; Sicherer, S. H., Munoz-Furlong, A. et al. 2003; Sicherer, S. H. and Mahr, T. 2010). Simptomi koji se javljaju nakon unosa kikirikija su uobičajeni za alergije na hranu i mogu se javiti u roku od nekoliko minuta od izlaganja, ali reakcija može biti odložena do 2 h (Boyce, J. A., Assa'ad, A. et al. 2010). Kad je osoba jednom senzibilisana, alergijska reakcija može biti pokrenuta unošenjem veoma male količine alergena, i to u vidu trenutnih simptoma, kao što su urtikarija, rinokonjuktivitis, astma, povraćanje, dijareja i u najtežim slučajevima anafilaktički šok i smrt (Berin, M. C., Kiliaan, A. J. et al. 1998). Treba naglasiti da je kikiriki jedan od glavnih uzročnika razvoja anafilaske (Astier, C., Morisset, M. et al. 2006), kao i da senzibilizacija dolazi unosom hrane, *in utero*, prilikom dojenja ili preko kože (King, N., Helm, R. et al. 2005; de Leon, M. P., Rolland, J. M. et al. 2007; Tordesillas, L., Goswami, R. et al. 2014).

Do danas je okarakterisano 12 proteina (Ara h 1 do Ara h 13), koji su priznati od strane ANSCIUIS (*engl. Allergen Nomenclature Sub-committee of the International Union of Immunological Societies*), gde 70% njih pripada nekoj od proteinskih familija (Mueller, G. A., Maleki, S. J. et al. 2014). Ovih 12 alergena se mogu klasifikovati: kupinska familija (Ara h 1 i Ara h 3); prolaminska super-familija (Ara h 2, Ara h 6, Ara h 7 i Ara h 9); profilinska familija (Ara h 5), Bet v 1 familija (Ara h 8), oleozini (Ara h 12) i defenzini (Ara h 13) (Mueller, G. A., Maleki, S. J. et al. 2014). Trenutno postoje strukturni podaci za: Ara h 1 (Cabanos, C., Urabe, H. et al. 2011), Ara h 2 (Mueller, G.

A., Gosavi, R. A. et al. 2011), Ara h 3 (Jin, T., Guo, F. et al. 2009), Ara h 5 (Wang, Y., Fu, T. J. et al. 2013), Ara h 6 (Lehmann, K., Schweimer, K. et al. 2006) i Ara h 8 (Hurlburt, B. K., Offermann, L. R. et al. 2013). Na slici 2.3. su prikazane structure nekih od alergena kikirikija (Mueller, G. A., Maleki, S. J. et al. 2014).



Slika 2.3. Struktura alergena kikirikija. A- Ara h 1 (trimer); B- Ara h 2 i Ara h 6; C- Ara h 3 (heksamer); D- Ara h 5; E- Ara h 8. *Preuzeto i modificovano od (Mueller, G. A., Maleki, S. J. et al. 2014).*

Danas je generalno prihvaćeno da su alergeni Ara h 1, Ara h 3, Ara h 6 i Ara h 2 uglavnom najveći krivci za izazivanje kliničkih reakcija (Zhuang, Y. and Dreskin, S. C. 2013). Termalno procesovanje možda igra jednu od važnih uloga u alergnosti kikirikija i to poboljšavajući alergena svojstva kikirikija (Maleki, S. J., Chung, S. Y. et al. 2000; Maleki, S. J., Viquez, O. et al. 2003). Pronađeno je da pečeni kikirikiji iz dve različite sorte pokazuje povećanje vezujućeg IgE kapaciteta u poređenju sa nepečenim (Maleki, S. J., Chung, S. Y. et al. 2000), mada neke druge studije pokazuju da ovakav tretman ne smanjuje IgE-vezujućeg kapaciteta u slučaju Ara h 1 (Burks, A. W., Williams, L. W. et al. 1992; Koppelman, S. J., Bruijnzeel-Koomen, C. A. et al. 1999). Takođe je pokazano da se većina sorti kikirikija ne razlikuje po sastavu alergena (Liang, X. Q., Luo, M. et al. 2006; Guo, B., Liang, X. et al. 2008), mada postoje varijeteti koji sadrže manju količinu nekih alergena (Ramos, M. L., Huntley, J. J. et al. 2009). Neke studije govore da su pacijenti alergični na kikiriki većinom senzitivisani na Ara h 2 i Ara h 6, a prate ih Ara h 1, Ara h 3 i Ara h 7 (Flinterman, A. E., van Hoffen, E. et al. 2007; Codreanu, F., Collignon, O. et al. 2011). Nedavno je i pokazana ukrštena reaktivnost između glavnog alergena kikirikija Ara h 2 i ne homolognih alergena Ara h 1, Ara h 3 (Bublin, M., Kostadinova, M. et al. 2013).

2.5.1. Konglutini kikirikija, Ara h 2 i Ara h 6; struktura i funkcija

Konglutini kikirikija, Ara h 2 i Ara h 6 predstavljaju glavne alergene kikirikija koji su prepoznati kod više od 90% pacijenata alergičnih na kikiriki (Koppelman, S. J., Wensing, M. et al. 2004). Naime Ara h 2 alergen je opisan kao najeminentniji u kliničkoj praksi za dijagnozu i praćenje učestalosti alergije na kikiriki (Klemans, R. J., Broekman, H. C. et al. 2013; Klemans, R. J., Liu, X. et al. 2013; Mayorga, C., Gomez, F. et al. 2014). Nedavno je pokazano i da Ara h 6 alergen predstavlja dobar prediktor u kliničkoj reaktivnosti kao Ara h 2, kao i da je on važan marker IgE reaktivnosti kod pacijenata alergičnih na kikiriki (Klemans, R. J., Knol, E. F. et al. 2014; Koid, A. E., Chapman, M. D. et al. 2014).

Ara h 2 i Ara h 6 proteini pripadaju 2S albumin familiji i sadrže najmanje četiri čvrsto povezana heliksa koja formiraju toplotno i proteazno-stabilno jezgro ovih proteina (Sen, M., Kopper, R. et al. 2002). Mogu se međusobno nazvati izoformama jer su njihove sekvence homologne čak 59% (Koppelman, S. J., de Jong, G. A. et al. 2005).

Ara h 2 protein postoji u dve izoforme (Ara h 2.02 i Ara h 2.01), svaka u dva alela (Chatel, J. M., Bernard, H. et al. 2003; Hales, B. J., Bosco, A. et al. 2004). Na N-dodecilsulfat poliakrilamidnoj gel elektroforezi (SDS PAGE) Ara h 2 migrira kao dve trake koje su blizu jedna drugoj sa masama od 18 i 16 kDa (Li, J., Shefcheck, K. et al. 2010). Na 2D elektroforezi svaka od ove dve izoforme je prisutna u četiri proteinske tačke sa pI vrednostima oko 5.5 (Schmidt, H., Gelhaus, C. et al. 2009). U poređenju jedna sa drugom, Ara h 2.02 sadrži dodatak od 12 aminokiselina čiji je deo linearno IgE-vezujuće mesto DPYSPS (Kulis, M., Chen, X. et al. 2012). 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). Ara h 2, sem formiranja 4 disulfidne veze, sadrži mesto-specifičnu hidroksilaciju prolina (Li, J., Shefcheck, K. et al. 2010), čija je značajna uloga u alergenosti nedavno opisana (Bernard, H., Guillon, B. et al. 2014).

Ara h 6 protein se može uočiti na 2D elektroforezi u vidu nekoliko tačaka sa pI vrednostima oko 5.2 (Suhr, M., Wicklein, D. et al. 2004), dok se na SDS PAGE vidi kao jedna proteinska traka mase oko 14,8 kDa (Koppelman, S. J., de Jong, G. A. et al.

2005). Njegova karakteristika je stabilnost (kao i Ara h 2) i otpornost na digestiju pepsinom (Suhr, M., Wicklein, D. et al. 2004). Poznato je da 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 prisutni u biljci (Bernard, H., Mondoulet, L. et al. 2007).

2.6. Imunoterapija

Trenutno osim izbegavanja izvora alergena hrane, ne postoji terapija za alergije na hranu. Ovo je u praksi teško izvodljivo usled široke upotrebe velikog broja prehrambenih proizvoda koji kao sastojake ili aditive sadrže alergene. Trenutni standard za individualni tretman pacijenata koji pate od alergija na hranu je limitiran na donošenje pravilne dijagnoze, edukaciju u cilju sprečavanja slučajnog izlaganja, kao i brz i efikasan tretman simptoma alergijskih reakcija (Casale, T. B. and Stokes, J. R. 2011). Iz tog razloga, postoje naponi da se uspostave pristupi koji mogu da smanje nivo osetljivosti pacijenta i na taj način rizik od IgE posredovanih reakcija na hranu.

Imunoterapija (alergen-specifična desenzitizacija) je u upotrebi oko 80 godina, kao forma tretmana pacijenata sa IgE-posredovanim alergijskim oboljenjima (Valenta, R. 2002). Ovaj tretman obezbeđuje izvesnu zaštitu od efekata izlaganja prirodnim alergenima, a podrazumeva regularnu administraciju (najčešće potkožnim injektiranjem) antigena odgovornih za alergijske simptome. Proces se često zove desenzitizacija ili hiposenzibilizacija. Pored pozitivnih efekata koje imunoterapija donosi mogu da se jave i neželjene posledice. Shodno tome, da bi se umanjio rizik od neželjenih reakcija na imunoterapiju, prešlo se na alternativne načine administracije antigena (Casale, T. B. and Stokes, J. R. 2011).

Iako je u upotrebi već skoro jedan vek, mehanizam specifične imunoterapije još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Poznato je da je ovaj tretman izuzetno efikasan kod pacijenta koji su senzitivisani samo na jedan uzročnik alergije (monosenzitivizacija), npr. otrov pčela, ili kod pacijenta koji imaju rinitis, ali bez komplikacija na donjim disajnim putevima. Po trenutno važećoj teoriji uspešnu imunoterapiju karakterišu promene na svim ćelijama uključenim u regulaciju imunog odgovora: antigen prezentujućim

ćelijama, T-ćelijama koje u sinhronizaciji sa B-ćelijama preusmeravaju lučenje IgE na IgG i tako stvaraju masu alergen-specifičnih IgG₄ antitela, tzv. blokirajućih antitela, ali i T-regulatornim ćelijama, za koje se smatra da su u disbalansu kod osoba koje imaju neko od stanja preosetljivosti (Larche, M., Akdis, C. A. et al. 2006).

Uprkos prednostima subkutane imunoterapije (SCIT), pacijenti su i dalje pod rizikom od razvoja anafilakse prouzrokovane samom imunoterapijom. Tako postoji potreba za sigurnijom i efikasnijom strategijom razvoja imunoterapije, posebno kod astmatičnih pacijenata. Novi oblici imunoterapije su dizajnirani tako da ublaže T_H2 odgovor na alergene i obezbede sigurniju alternativu SCIT-a. Ovo može uključiti davanje standardne terapije, modifikaciju ekstrakta alergena ili promenu načina isporuke alergena.

Jedna od terapijskih opcija za smanjenje rizika od anafilakse je dodatak anti-IgE rekombinantnog humanizovanog monoklonog antitela (*Omalizumab*) koje je korišćeno kod pacijenata sa astmom i trenutno postoje preliminarni podaci kod alergije na hranu. *Omalizumab* pokazuje zaštitne efekte na neželjene reakcije od imunoterapije kao što su svrab, anafilaksa, smanjujući njihovu incidentu čak pet puta (Casale, T. B. and Stokes, J. R. 2011).

Rekombinantni alergeni su prečišćeni alergeni koji su proizvedeni tehnikama rekombinantne tehnologije, koristeći poznate molekularne, imunološke i biološke karakteristike. Jedan od oblika rekombinantnih alergena je *wild type* proizveden alergen koji imitira svojstva prirodnog alergena. Pored *wild type* rekombinantnih alergena postoje i rekombinanti ekstrakti, fragmenti proteina ili trimerne forme tog alergena (Casale, T. B. and Stokes, J. R. 2011). Ostale tehnike kreiranja anti-alergijskih proizvoda obuhvataju uvođenje tačkastih mutacija na IgE vezujućem mestu. Još jedna strategija novih formi imunoterapija uključuje peptidne fragmente koji odgovaraju T-ćelijskim epitopima specifičnog alergena koji bi indukovali imunološku toleranciju i smanjili alergnost. Mala veličina peptida smanjuje njihovu sposobnost za agregiranje alergen-specifičnog IgE na mastocitima (Casale, T. B. and Stokes, J. R. 2011).

Modifikacije alergena hemijskim reagensima koriste se u proizvodnji alergioda, koji teoretski narušavaju ili maskiraju IgE epitope dok čuvaju T-ćelijske epitope.

Alergoidi se često koriste u Evropi za SCIT, ali trenutno nisu prihvaćeni u SAD. Od drugih ruta administracije imunoterapeutika ispitane su i oralna, nazalna, intralimfatična, sublingvalna, epikutaneusna i bronhijalna (Casale, T. B. and Stokes, J. R. 2011).

2.6.1. Hemijske modifikacije alergena

Hemijske modifikacije proteina mogu dovesti do promene naelektrisanja i/ili hidrofobnosti proteina, što može umanjiti ili eliminisati alergenost. Tretiranjem ekstrakta ili prečišćenih proteina hemijskim agensom dolazi do stvaranja alergoida (Marsh, D. G., Lichtenstein, L. M. et al. 1970). Time se postiže selektivno narušavanje alergeničkih karakteristika antigena, dok su njegove imunogene karakteristike očuvane.

Neke od najprimenljivijih kovalentnih hemijskih modifikacija su:

1. *Acilacilovanje* alergena tretiranjem anhidridima, kao što su anhidridi sirćetne ili ćilibarne kiseline, što blokira pozitivno naelektrisane aminokiseline na molekulu proteina i ostavlja slobodne karboksi grupe glutaminske i aspartanske kiseline, čineći ukupno naelektrisanje modifikovanog proteina više negativnim (Cirkovic, T. D., Bukilica, M. N. et al. 1999).
2. *Karbamilovanje* je modifikacija kalijumcijanatom (KCNO), gde se ϵ -amino grupa lizina transformiše u ureido grupu. Pokazano je da karbamilacija alergena u *in vitro* i *in vivo* studijama dovodi do smanjenja alergenosti. Ovo jeste potencijalno koristan pristup za imunoterapiju, ali ovaj metod modifikacije nije prikladan za pripremu hipoalergijske hrane zbog svoje toksičnosti (Cirkovic, T., Gavrovic-Jankulovic, M. et al. 2002).
3. *Redukovanje*. Alergeni su potentniji i manje podložni digestiji u oksidovanom stanju (S-S). Kada se redukuju (SH stanje), oni gube alergenost i/ili postaju više digestibilni. Redukovanje disulfidnih mostova alergena se vrši redukujućim agensima kao što su, npr.: 2-merkaptoetanol, ditiotritol, cistein, glutation i dr, ili koristeći redukovane forme proteina tipa tioredoksin. Pokazano je da redukcijom tioredoksinom β -laktoglobulin postaje senzitivniji na simultanu gastričnu digestiju pepsinom i da gubi alergenost (del Val, G., Yee, B. C. et al. 1999). Rezultati

pokazuju da redukovanje disulfidnih veza povećava digestibilnost. Međutim, pokazano je da familija tioredoksina predstavlja ukršteno reaktivne proteine uključene u patogenezu atopijskih ekcema i astme (Glaser, A. G., Menz, G. et al. 2008). Shodno tim činjenicama korišćenje tioredoksina u modifikacijama alergena hrane može da predstavlja limitirajući faktor.

4. *Polimerizacija glutaraldehydom.* Glutaraldehyd reaguje sa amino grupom proteina umrežavajući alergene, što vodi izmeni njihovih imunoloških karakteristika (Patterson, R., Suszko, I. M. et al. 1979).

3. Imunoproteomika proteina crvenog mesa; identifikacija novih α -Gal alergena

3.1. Uvod

Alergija na crveno meso predstavlja novi tip alergije na hranu, sa teškim simptomima alergije nakon unosa crvenog mesa (npr. govedine, svinjetine i jagnjetine). U većini slučajeva, alergija na hranu je posredovana proteinskim epitopima kod kojih dolazi do brzog razvoja alergijskih simptoma. Alergijska reakcija na crveno meso je posredovana šećernim epitopom koji čini galaktozo- α -1,3-galaktoza (α -Gal) kod koje se simptomi i razvoj alergijske reakcije javljaju nekoliko sati nakon unosa hrane (Commins, S. P., James, H. R. et al. 2014).

IgE-posredovana reakcija na α -Gal je prvi put otkrivena kod pacijenata koji su tretirani monoklonskim antitelom *Cetuximab*, gde su pacijenti iskusili anafilaksiju nakon prve injekcije (Chung, C. H., Mirakhur, B. et al. 2008). Dalja istraživanja dovode do saznanja da je IgE-posredovana reakcija na α -Gal takođe povezana sa alergijom na hranu, a koja se ispoljava urtikarijom, anafilaskijom i angioedemom 3-7 h nakon unosa crvenog mesa (Commins, S. P., James, H. R. et al. 2011; Nunez, R., Carballada, F. et al. 2011; Morisset, M., Richard, C. et al. 2012; Commins, S. P., James, H. R. et al. 2014; Fischer, J., Hebsaker, J. et al. 2014). Nedavno je pokazano da laminin γ -1i kolagen α -1 (VI) lanac iz goveđeg mesa sadrže α -Gal (Takahashi, H., Chinuki, Y. et al. 2014). Ovaj nalaz je u skladu sa već prijavljenom ukrštenom reaktivnošću između crvenog mesa i želatina, derivata kolagena (Mullins, R. J., James, H. et al. 2012), kao i da laminin sadrži α -Gal kao posttranslacionu modifikaciju (Arumugham, R. G., Hsieh, T. C. et al. 1986).

Dobro je poznato da tretman temperaturom može da utiče na stabilnost proteina, i promeni njihovu IgE reaktivnost, narušavanjem postojećih konformacionih epitopa, što dovodi do smanjenja u reaktivnosti ili dovodi do stvaranja novih epitopa koji mogu

biti još više potentni. U slučaju alergena mesa, pokazano je da kuvanje uglavnom narušava ili modifikuje strukturu proteina nestabilnih na visokoj temperaturi, ali isto tako da neki pacijenti i dalje imaju alergijski odgovor na kuvano i/ili pečeno meso sisara (Fiocchi, A., Restani, P. et al. 2000; Fiocchi, A., Bouygue, G. R. et al. 2004).

U ovoj studiji mi smo imunoproteomikom okarakterisali crveno meso iz govedine koje je različito termički obrađeno (sirovo, srednje pečeno, pečeno i kuvano). Potom smo istražili potencijalnu alergenost ovako obrađenog mesa kod pacijenta alergičnih na crveno meso.

3.2. Materijal i metode

3.2.1. Serumi pacijenata

U ovoj studiji korišćeni su serumi 15 pacijenta koji su prijavili odloženu neželjenu reakciju nakon unosa crvenog mesa, zbog koje su posetili lekara u klinici u Stokholmu, Švedska (Karolinska Institutet ili kako već). Svi pacijenti su pregledani i popunili su upitnik o vrsti konzumiranja crvenog mesa, kao i vremenu nastajanja reakcije nakon unosa hrane. IgE antitela na α -Gal u serumu ovih pacijenata su određena pomoću ImmunoCAP[®] (α -Gal, Phadia, Upsala, Švedska). Svi pacijenti su imali IgE antitela na α -Gal (opseg 6,6-128,0 kU_A/L) i na proteinski ekstrakt iz goveđe meso, f27 (opseg 0,5-28,0 kU_A/L) (Tabela 3.1.). Serumi su korišćeni ili pojedinačno ili kao pul koji su činili pomešani serumi: pul 1 - medijana 63 kU_A/l na α -Gal i 10,8 kU_A/l na goveđe meso; dobijen od seruma pacijenata #5-9 iz Tabele 3.1., korišćen za IgE imunoblot, i pul 2 - medijana 56,2 kU_A/l na α -Gal i 11,8 kU_A/l na goveđe meso; dobijen od seruma pacijenata #9-14 iz Tabele 3.1., korišćen kod 2D imunoblota. Serum pacijenta sa atopijskim sindromom bez prisustva IgE antitela na α -Gal i goveđe meso je korišćen kao negativna kontrola. Ova studija je odobrena od strane lokalnog etičkog komiteta.

3.2.2. Priprema goveđeg mesa i ekstrakcija proteina

Sveže sirovo goveđe meso (ramstek) kupljeno u lokalnoj radnji je isečeno na komade (10 g sadrži 2,3 g proteina prema nutritivnim vrednostima opisanim na <http://ndb.nal.usda.gov/>). Proteinski ekstrakt je pripremljen homogenizacijom jednog

komada mesa od 10 g sa 30 ml PBS (20 mM Na-fosfat koji sadrži 0,15M NaCl pH 7,4), koristeći POLYTRON homogenizator (PT2100, Kinematica, Lucern, Švajcarska). Nakon homogenizacije, ekstrakt je centrifugiran na 6000 obrt/min u trajanju od 30 min na 4°C. Supernatant je filtriran kroz 0,8 µm filter, nakon čega je koncentracija proteina određena bicinoninskim esejem pomoću BCATM (Pierce, Rockford, IL, SAD) kita . Kako bi se dobili proteinski ekstrakti iz termalno obrađenog mesa, meso je termički obrađeno kao što je opisano u (Werfel, S. J., Cooke, S. K. et al. 1997). Ukratko kuvano meso je dobijeno kuvanjem u void 20 min na 80°C. Pečeno i srednje pečeno meso su pripremljenu u tiganju pečenjem 20 min na 80°C i 5 minuta na 50 °C, respektivno.

3.2.3. SDS PAGE i imunoblot analiza

Proteinski ekstrakti su analizirani na 10% akrilamidnom (AA) gelu pod redukujućim uslovima po protokolu iz *Laemmli* (Laemmli, U. K. 1970). Gel je obojen Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka). 10 µg proteina ekstrakta je aplicirano po bunaru. Nakon razdvajanja proteini su transferovani na polivinildifluoriden (PVDF) membranu (MilliPore, Nemačka) prema referenci (Towbin, H., Staehelin, T. et al. 1979), koja je nakon toga blokirana sa 1% ovalbuminom (OVA) u PBS-T (fosfatom puferisani fiziološki rastvor koji sadrži 0.05% Tween 20), 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja membrana je isečena na tračice i inkubirana preko noći sa pojedinačnim serumima pacijenata alergičnih na crveno meso (pacijenti #1-5 u Tabeli 3.1.), razblaženi 1:4 u 0.1% OVA u PBS-T na 4°C. Nakon ispiranja, IgE vezujući proteini su detektovani jednočasovnim inkubiranjima na sobnoj temperaturi prvo sa zečjim anti-humanim IgE antitelima (razblažena 1:2000, MIAB, Upsala, Švedska), a zatim sa kozjim anti-zečjim IgG antitelima kuplovanim sa alkalnom fosfatazom (AP) (razblažena 1:1000, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, Vest Gruv, Pensilvanija, SAD). Za razvijanje membrana korišćen je komercijalno dostupni solubilni supstrat za alkalnu fosfatazu (Bio-Rad Laboratories, Ričmond, Virdžinija, SAD).

Inhibitorni IgE imunoblot je razvijen kao što je gore navedeno, sa tom razlikom da je 5 puta razblažen serum (pul 1) pre inkubacije sa membranom, inkubiran sa 100 µg/ml tiroglobulina tokom 1 h na 21°C (Sigma-Aldrich, MO, SAD). Detekcija je urađena kao kod imunoblota sa pojedinačnim pacijentima.

Za detekciju α -Gal proteina, membrana je inkubirana sa monoklonskim mišjem anti- α -Gal antitelom (M86, Enzo LifeScience, SAD), razblaženim 1:3. Detekcija α -Gal proteina je ispraćena 1 h inkubacijom kozjeg anti-mišjeg IgM antitela konjugovanog sa AP (1:3000, SoutherBiotech, SAD). Vizualizacija α -Gal proteinskih traka je urađena korišćenjem supstrata kao i kod IgE imunoblota sa pojedinačnim pacijentima.

3.2.4. Enzimska deglikozilacija

Uklanjanje šećera sa glikoproteina u ekstraktu iz svežeg mesa je rađeno na skali od 1 mg/ml proteina sa PNGase F enzimom (New England BioLabs, SAD) po instrukciji proizvođača. Proces uspešne deglikozilacije je praćen pomoću imunoblota razvijenim sa monoklonskim anti- α -Gal antitelom po gore navedenom protokolu.

3.2.5. 2D elektroforeza visoke rezolucije (2D PAGE) i 2D imunoblot

Rasoljeni proteinski ekstrakti mesa su razblaženi do koncentracije od 150 μ g/ml i 300 μ g/ml u rehidracionom puferu (8 M urea, 2% CHAPS, 0.5% IPG pufer pH opsega 3-10NL, 0.002% bromofenol plavo i 50 mM ditiotritol). Tako pripremljen ekstrakt je nanet na traku sa imobilizovanim pH gradijentnim gelom pH 3-10NL (GE Healthcare, Upsala, Švedska), gde su proteini razdvojeni na prvoj dimenziji na Ettan IPGphor sistemu (GE Healthcare) prateći uputstva proizvođača.

Druga dimenzija je nastavljena na 10% i 12% AA gelu. Nakon druge dimenzije gelovi su bojeni metodom koloidnog bojenja sa Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva) (Candiano, G., Bruschi, M. et al. 2004), ili su proteini transferovani na PVDF membranu. Nakon transfera membrane su inkubirane se serumom pacijenta alergičnih na crveno meso (pul 2) ili sa mišjim anti- α -Gal antitelom i razvijene po protokolu opisanom u delu sa SDS PAGE i imunoblot analize.

Gelovi obojeni koloidnim bojenjem su skenirani pomoću Typhoon 7000 serije i proteinske tačke su analizirane pomoću 2D Master Platinum 7.0 softverom (GE Healthcare).

3.2.6. Digestija u gelu i LC-ESI MS/MS identifikacija IgE-vezujućih proteina mesa

Proteinske tačke od interesa su sa 2D gela ručno isečene i podvrgnute protokolu digestije u gelu sa tripsinom (iz svinjskog pankreasa, *proteomics* čistoće, dimetilovan; Sigma Aldrich), koji je prethodno opisan (Shevchenko, A., Tomas, H. et al. 2006). Dobijeni peptidi su analizirani na EASY nLC II sistemu koji je povezan sa LTQ Orbitrap XL (Thermo scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Četiri mikrolitara peptida je injektovano na EASY-Spray PepMap C18 kolonu (150 x 0.075 mm, 3 µm prečnik čestica matriksa). Kao eluent A korišćen je vodeni ratvor 0.1% mravlje kiseline, a kao eluent B 0.1% mravlja kisleina u acetonitrilu. Uzorci su eluirani sa gradijentom eluenta B 5-70% u toku 50 min pri protoku od 300 nl/min. Vrednost za CID normalizovanu kolizionu energiju je bila 35%. Vrednosti parametara Nano electroSpray jonizacije (NSI) su bili: voltaža spreja +3.8 kV, kapilarna voltaža 6 V, kapilarna temperatura 275°C. Spektri su snimljeni u pozitivnom modulu u opsegu m/z 300-2000. Pet najintenzivnijih monoizotopskih pikova u spektru je fragmentisano pomoću CID i mereno u linearnoj jonskoj zamci. Analiza podataka je urađena pomoću SEQUEST pretraživača i Proteome Discoverer 1.3.0339 softvera (Thermo Scientific) po sledećim uslovima: FASTA databaza: *Bos taurus* validovane sekvence sa Uniprota; enzim: tripsin; broj promašenih mesta za proteolizu: 2; tolerancija greške za peptide: ±10 ppm; MS/MS tolerancija: ±0.5 Da; dinamičke modifikacije: oksidacija metionina; fiksne modifikacije: karbamidometilacija na cisteinu.

Homologna pretraga identifikovanih proteina je izvedena sa BLASTp algoritmom i NCBI bazom podataka proteinske sekvence. Za predviđanje N-glikozilacije sekvence identifikovanih proteina su analizirane softverom Structure Feature Analysis Tool (hive.biochemistry.gwu.edu).

3.2.7. IgE-vezivanje na čvrstoj fazi

Sposobnost α -Gal-bogatog tiroglobulina i proteinskog ekstrakta iz sirovog mesa da blokiraju IgE vezivanje na čvrstoj fazi rađena je na ImmunoCAP® sistemu. Serumi pacijenata alergičnih na crveno meso i sa IgE antitelima na α -Gal su inkubirani 1 h na sobnoj temperaturi sa serijom razblaženja (0,125-4000 µg/ml, faktor razblaženja 2)

tiroglobulina ili proteinskog ekstrakta iz sirovog mesa. Nakon toga je izmeren nivo slobodnih IgE antitela.

3.3. Rezultati

3.3.1. Pacijenti alergični na crveno meso prepoznaju proteine iz termalno obrađenog mesa

IgE-vezivanje za proteine iz ekstrakta sirovog mesa je ispitivano sa individualnim serumima od 5 pacijenta alergičnih na crveno meso (#1-5 u Tabeli 3.1.). Kod svih pacijenta uočeni su obrasci IgE-vezivanja za proteine iz govedine (veličine 25-250 kDa), koji nisu bili prisutni u negativnoj kontroli (Slika 3.1A).

Tabela 3.1. Karakteristike pacijenata alergičnih na crveno meso

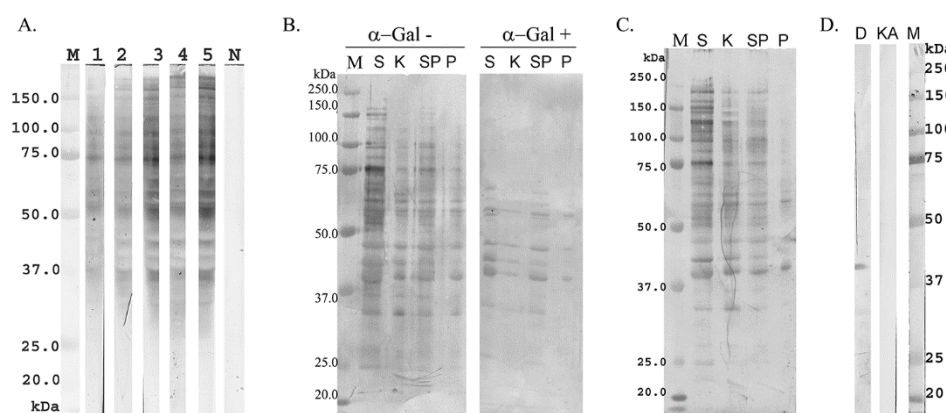
ID Pacijenta	Starost (god)/ pol	Reakcija	Vreme reakcije ‡	IgE*		
				Ukupni	α -Gal	govedina
1.	69/M	AE, GI, U	6	260	54	5
2.	71/M	AE, GI, U	4	280	23	11
3.	35/Ž	ANA, AE, GI, U	6-7	270	46	7,2
4.	71/M	ANA, AE, GI, U	6	48	6,6	0,5
5.	72/M	AE, U	6	420	128	16
6.	46/M	ANA, AE, GI, U	4-7	1800	24	4,5
7.	67/Ž	ANA, AE, U	6	550	31	22
8.	57/M	/	4-12	/	22	1,9
9.	46/Ž	U	2-7	240	110	9,7
10.	43/Ž	GI, U	3	360	91,1	12
11.	54/Ž	ANA, AE, U	1-2	87	12	5,4
12.	75/M	GI	/	340	37	6
13.	38/Ž	AE, GI, U	4-5	120	37	9,9
14.	42/Ž	GI, U	6	270	80	28
15.	43/Ž	GI, U	3	360	91,1	12

M, muško; Ž, žensko; AE, angioedem; ANA, anafilaksa; GI, gastrointestinalni simptomi; U, urtikarija; *ImmunoCAP® IgE rezultati: Ukupan IgE nivo je izražen u kilo jedinicama po litru, dok je nivo alergenski specifičnog IgE u kilojednicama alergena po litru.

‡Prijavljeno vreme reakcije nakon unosa hrane (u satima).

Za poređenje IgE-vezujućih osobina kod sirovog i termalno obrađenog mesa, urađen je IgE imunoblot sa *pulom* seruma sačinjen od pojedinačnih seruma pacijenta

alergičnih na crveno meso. Višestruko-reaktivne proteinske trake, u opsegu od 25-150 kDa, su detektovane kod različitih proteinskih ekstrakata (sirov, kuvan, srednje pečen i pečen) (Slika 3.1B). U proteinskom ekstraktu iz sirovog i srednje pečenog mesa postoji više proteinskih traka u opsegu 30-100 kDa koje su reaktivnije od ostalih. U proteinskom ekstraktu kuvanog i pečenog mesa pokazan je sličan profil reaktivnih proteinskih traka u opsegu od 37-75 kDa, mada i dalje slabije reaktivnosti od sirovog i srednje pečenog proteinskog ekstrakta. Ovo objašnjava slabije IgE vezivanje za ova dva proteinska ekstrakta. Pre-inkubacija seruma sa 100 $\mu\text{g/ml}$ tiroglobulina ($\alpha\text{-Gal}$) rezultovala je gubitkom većeg broja proteinskih traka na membrani (Slika 3.1B).



Slika 3.1. IgE-imunoblot sa proteinima govedeg mesa.

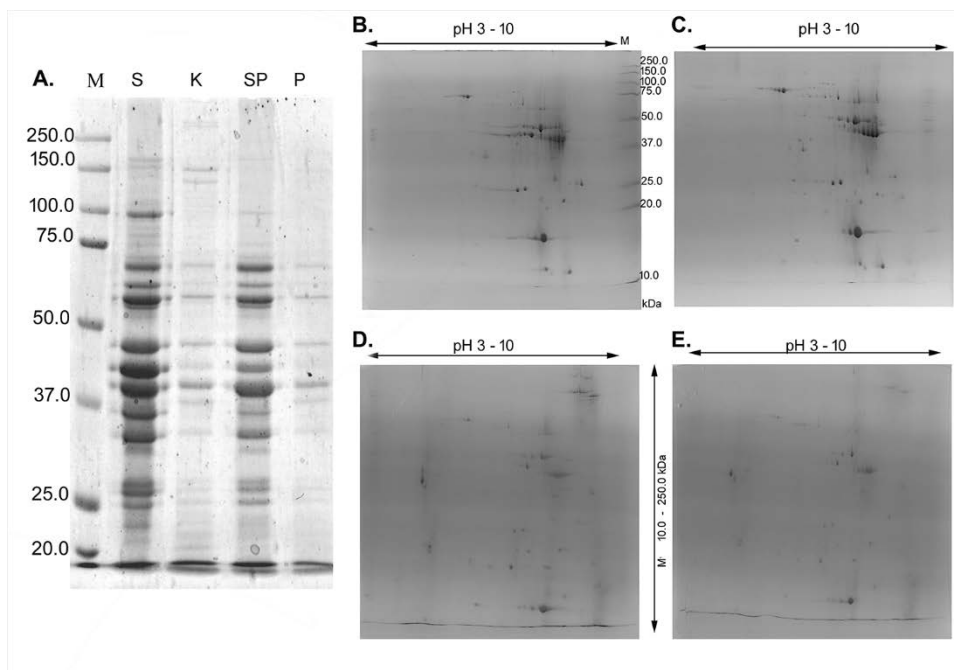
A) IgE vezujuće osobine pojedinačnih pacijenata na proteinima (ID 1-5) iz sirovog mesa; B) Vezivanje IgE antitela iz pula I za proteine iz sirovog i različito termički obrađenog govedeg mesa, sa i bez preinkubacije sa $\alpha\text{-Gal}$ (tiroglobulin, 100 $\mu\text{g/ml}$); C) Anti- $\alpha\text{-Gal}$ imunoblot sirovog i termički obrađenog govedeg mesa; D) Anti- $\alpha\text{-Gal}$ imunoblot deglikozilovanih proteina iz sirovog govedeg mesa. M, molekularni markeri; N- negativna kontrola; S, sirovi goveđi proteinski ekstrakt; K- proteinski ekstrakt iz kuvanog govedeg mesa; SP, proteinski ekstrakt iz srednje pečenog govedeg mesa; P, proteinski ekstrakt iz jače pečenog govedeg mesa; DG, deglikozilovani proteini iz proteinskog ekstrakta sirovog mesa; KA, kontrola antitela.

Pored toga, imunoblot razvijen sa monoklonskim antitelom koje ima sposobnost vezivanja samo šećerne $\alpha\text{-Gal}$ komponente (Slika 3.1C), pokazuje isti vezujući profil kod svih proteinskih ekstrakta kao kod imunoblota razvijenog sa serumom pacijenata. Ovi rezultati pokazuju da većina IgE-reaktivnih proteina govedeg mesa sadrži $\alpha\text{-Gal}$ šećernu komponentu. Kako bi proverili da li IgE-vezujući proteini iz govedeg mesa zaista sadrže $\alpha\text{-Gal}$ uradili smo deglikozilaciju N-povezanih šećera koristeći enzimski esej i PNGase F enzim. Nakon toga smo razvili imunoblot sa monoklonskim anti- $\alpha\text{-Gal}$

antitelom (Slika 3.1D), gde je uočen gubitak α -Gal šećerne komponente za većinu proteinskih traka, osim u slučaju jedne trake na oko 37 kDa.

3.3.2. 2D PAGE profili proteina kod termalno obrađenog mesa

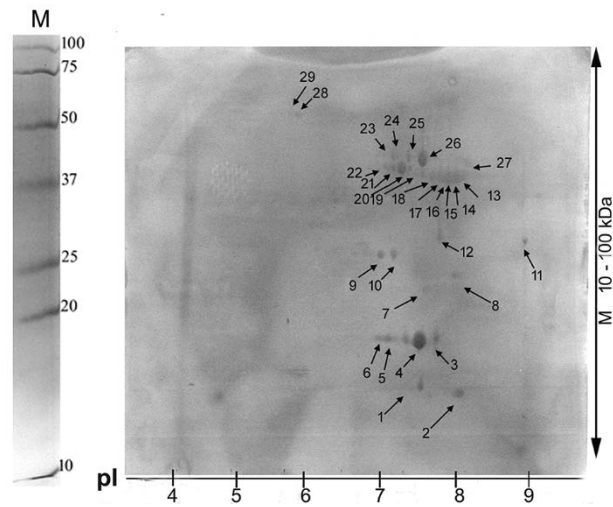
Proteinski ekstrakti, dobijeni od različito termalno obrađenog goveđeg mesa, razdvojeni na SDS PAGE (Slika 3.2A) pokazuju da sirovo i srednje pečeno meso imaju veoma slične proteinske profile, dok sa druge strane kuvano i pečeno meso imaju međusobno jako slične profile, ali različite od sirovog i srednje pečenog mesa. Kuvano meso sadrži proteine većih molekulskih masa, ≥ 250 kDa, koji verovatno potiču od agregata nastalih termalnom obradom i oni nisu prisutni u sirovom i srednje pečenom mesu. Upoređivanje proteinskih profila dobijenih visoko rezolutnom 2D PAGE i softverom za komparaciju proteinskih tačaka uočeno je da proteinski ekstrakt sirovog i srednje pečenog mesa sadrži 53 istih proteinskih tačaka (Slika 3.2B i 3.2C). Poređenjem proteinskih profila kuvanog i pečenog mesa identifikovano je 35 istih proteinskih tačaka (Slika 3.2D i 3.2E). Može se uočiti i prisustvo proteina oko 17 i 50 kDa koji su se održali i nakon termalne obrade.



Slika 3.2. SDS PAGE i 2D PAGE profil različito termički obrađenog goveđeg mesa. A. SDS PAGE različito termički obrađenog goveđeg mesa; 2D PAGE profili: B. proteinskog ekstrakta iz sirovog goveđeg mesa; C. proteinskog ekstrakta iz srednje pečenog goveđeg mesa; D. proteinskog ekstrakta iz kuvanog goveđeg mesa; E. proteinskog ekstrakta iz pečenog goveđeg mesa. M, molekularni markeri; S, sirovi goveđi proteinski ekstrakt; K- proteinski ekstrakt iz kuvanog goveđeg mesa; SP, proteinski ekstrakt iz srednje pečenog goveđeg mesa; P, proteinski ekstrakt iz pečenog goveđeg mesa;

3.3.3. Identifikacija IgE-vezujućih alergena goveđeg mesa

U cilju identifikacije alergena mesa koji imaju IgE-vezujući kapacitet uradili smo 2D IgE imunoblot na proteinskom ekstraktu iz sirovog mesa (slika 3.3.), koristeći serume pacijenta alergičnih na crveno meso (pul 2, pacijenti #9-14 iz Tabele 3.1.). Pronađeno je 29 proteinskih tačaka (Tabela A1. u Prilogu A) (u opsegu masa 15-100 kDa) koje su vezivale IgE iz seruma i koje su podvrgnute peptidnom mapiranju. MS/MS spektri ovih proteinskih tačaka dali su poklapanje sa proteinima *Bos taurus* proteinske baze podataka iz i identifikovano je 18 proteina. Neki od identifikovanih proteina, kao što su mioglobin i BSA su već poznati alergeni mesa.



Slika 3.3. 2D IgE imunoblot proteinskog ekstrakta iz sirovog goveđeg mesa razvijenog sa serumom pacijenata alergičnih na crveno meso (*pul 2*). M, molekularni markeri.

Daljom analizom sekvenci identifikovanih proteina i homolognim modelovanjem sa istim proteinima čoveka (*Homo sapiens*) utvrđen je visoki stepen homologije (> 85%) (Tabela 3.2.). Predikcijom N-glikozilacije utvrdili smo da 10 od 18 identifikovanih proteina sadrži više od jednog mesta za N-glikozilaciju (Tabela 3.2.).

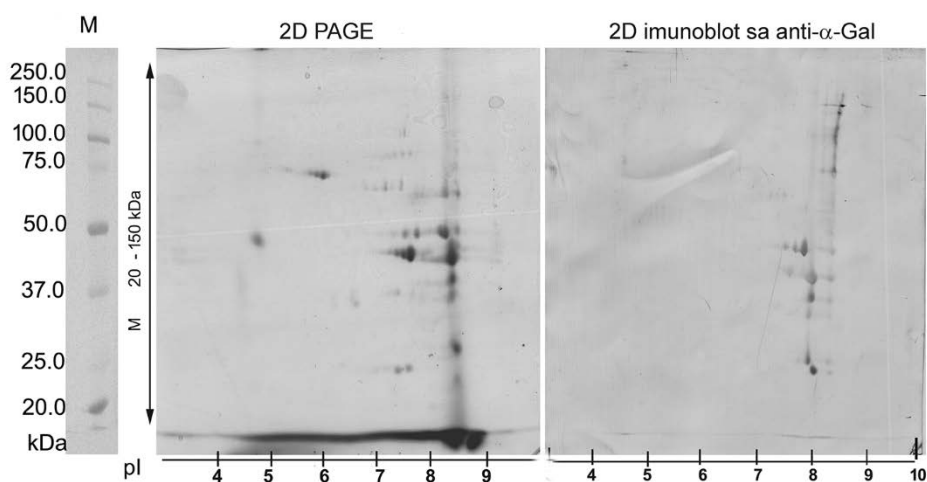
Tabela 3.2. Homologija identifikovanih proteina govedjeg mesa sa odgovarajućim homolozima kod čoveka i predikcija N-glikozilacije identifikovanih proteina govedeg mesa.

#	Protein	Identifikacioni Uniprot#	Identičnost (%)	Sličnost (%)	N-glikozilovano mesto
1	Hemoglobinu subjedinica beta	P68871.2	85	91	/
2	Lanac C, Hemoglobin	1SI4_C	88	92	132N
3	Mioglobin	NP_976312.1	84	89	/
4	Fosfatidiletanolamin-vezujući protein	ADI99998.1	94	95	96N; 140N
5	Adenilat kinaza izoenzim 1	NP_000467	97	98	/
6	Triozofosfat izomeraza	CA49379.1	98	97	196N
7	Fosfoglicerat mutaza 2	NP_000281.2	95	97	/
8	Karbonska anhidraza 3	NP_005172.1	85	91	27N
9	Fruktozo-bifosfat aldolaza A	P04075.2	98	99	/
10	Fruktozo-bifosfat aldolaza C	NP_005156.1	99	99	/
11	Latktat dehidrogenaza A	AAH67223.1	94	97	84N
12	Kreatin kinaza M-tip	NP_001815.2	97	98	222N
13	Aspartat amino-transferaza	NP_002070.1	92	96	63N; 125N; 270N
14	Fosfoglicerat kinaza 1	NP_000282.1	97	99	/
15	Beta-enolaza	P13929.5	98	99	70N; 102N
16	Alfa-enolaza	P06733.2	96	98	70N; 102N
17	glicerol-3-fosfat dehidrogenaza [NAD(+)], citoplazmatična	NP_005267.2	93	96	/
18	Albumin	AAA98797.1	76	86	/
19	Heat shock 70 kDa protein 2	P54652.1	85	92	36N; 152N; 363N; 420N; 437N; 490N

3.3.4. Identifikacija proteina govedeg mesa koji sadrže α -Gal

Kako bi smo identifikovali koji od proteina sadrže α -Gal uradili smo 2D imunoblot sa specifičnim monoklonskim anti- α -Gal antitelom (slika 3.4.). Pokazano je da proteini koji sadrže α -Gal uglavnom imaju pI vrednosti u baznom opsegu pH gradijenta (pI \geq 7), koji takođe poseduju sposobnost da vežu IgE iz seruma pacijenta. Na osnovu molekulske mase i pI vrednosti, kao i u literaturi već identifikovanih IgE-

vezujućih proteina koji sadrže mesto za N-glikozilaciju, mi smo identifikovali sedam novih proteina koji sadrže α -Gal (Tabela 3.3.), koji su ujedno IgE reaktivni.



Slika 3.4. 2D PAGE i 2D imunoblot proteinskog ekstrakta iz sirovog mesa sa anti- α -Gal antitelom. M, molekularni markeri.

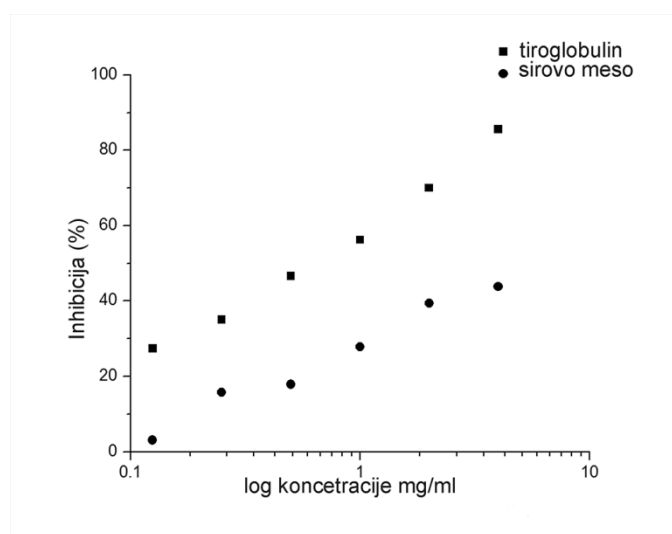
Sedam novih α -Gal proteina su: triozofosfat izomeraza, karboanhidraza 3, laktat dehidrogenaza A, kreatin kinaza M-tip, aspartat aminotranferaza, β -enolaza i α -enolaza. Nakon identifikacije proteina i upoređivanja proteinskih profila između različito termalno obrađenog mesa (nije prikazano), utvrdili smo da četiri od ovih sedam proteina (kreatin kinaza M-tip, aspartat aminotranferaza, β -enolaza i α -enolaza) ostaju stabilni i ne podležu termalnoj obradi (podvučeni u Tabeli 3.3.).

Tabela 3.3. Identifikovani α -Gal sadržujući proteini koji vezuju IgE iz seruma pacijenata alergičnih na crveno meso.

Protein	Identifikacioni #	Mm (kDa); pI	# identifikovane tačke sa slike 3.3.3.
Triozofosfat izomeraza	NP_001013607.1	26,7; 6,92	9, 10
Karbonska anhidraza 3	NP_001029609.1	29,4; 7,84	12, 16
Laktat dehidrogenaza A	BAA14170.1	35,6; 8,00	15, 16
<u>Kreatin kinaza M-tip</u>	AAD30974.10	43,0; 7,12	17-18, 20-26
<u>Aspartat aminotranferaza</u>	P33097.3	46,4; 7,49	17-18, 21-26
<u>Beta-enolaza</u>	NP_001029874.1	47,1; 7,72	19, 24-27
<u>Alfa-enolaza</u>	DAA21263.1	47,3; 6,80	24-27

3.3.5. Inhibicija α -Gal epitopa

Serum pacijenta alergičnog na crveno meso (pacijent #15 u Tabeli 3.1.) je pre-inkubiran ili sa α -Gal-bogatim proteinom (tiroglobulin) ili sa ekstraktom proteina iz sirovog goveđeg mesa u različitim koncentracijama (125-4000 μ g/ml), pre merenja nivoa specifičnog IgE na α -Gal. Dozno-zavisna kriva inhibicije IgE antitela sa α -Gal ili ekstraktom proteina iz sirovog mesa pokazuje maksimum inhibicije od 44% nakon inkubacije seruma sa 4 mg/ml proteinskog ekstrakta, u odnosu na 86% inhibicije koja je dobijena nakon inkubacije sa istom koncentracijom tiroglobulina (slika 3.5.).



Slika 3.5. Inhibicija IgE vezivanja na čvrstoj fazi tiroglobulinom i ekstraktom sirovog mesa. Za esej je korišćen serum jednog pacijenta (#15).

3.4. Diskusija

U ovoj studiji, koristeći imunoproteomiku, identifikovali smo α -Gal proteine u različito termički obrađenom goveđem mesu. Sedam proteina su identifikovani kao novi, u literaturi još neopisani, α -Gal noseći proteini koji vezuju IgE iz seruma pacijenata alergičnih na crveno meso, od kojih četiri ostaju prisutni i nakon termalne obrade mesa. Većina seruma pacijenata alergičnih na crveno meso prepoznaje slične IgE-vezujuće proteinske trake u ekstraktu, opsega masa 25-250 kDa, što je i ranije prijavljeno (Werfel, S. J., Cooke, S. K. et al. 1997). Mi smo primetili da je većina IgE-vezujućih proteina očuvala alergnost i nakon termalne obrade mesa, kao i da nakon

pre-inkubacije seruma sa α -Gal proteinom ove IgE reaktivne proteinske trake nestaju. Termalno stabilni proteini su takođe bili prepoznati od strane anti- α -Gal antitela. S obzirom da serum (pul) i anti- α -Gal antitelo pokazuju sličan obrazac vezivanja kod termalno obrađenog mesa, ovo ukazuje da α -Gal proteini i dalje imaju očuvanu svoju reaktivnost i nakon termalne obrade. Ovi rezultati su u skladu sa našim podacima da pacijenti alergični na crveno meso prijavljuju alergijske reakcije i nakon unosa termalno obrađenog mesa.

Kako bi identifikovali IgE-vezujuće proteine koji nose α -Gal epitop, i kako bi smo ispitali da li oni ostaju očuvani nakon termalne obrade, svi proteinski ekstrakti su analizirani pomoću moćne visoko-rezolutivne tehnike imunoproteomike, koja obuhvata 2D PAGE, 2D imunoblot i MS/MS analizu. Nedavno su *Takahashi i saradnici* (2014) identifikovali dva proteina iz goveđeg mesa većih molekulskih masa (laminin γ -1 kolagen α -1 (VI) lanac), koja su sposobna da vežu IgE iz seruma pacijenata alergičnih na crveno meso i koja sadrže α -Gal epitop. Pored toga ovi autori su naveli da zbog lošeg razdvajanja nisu bili u mogućnosti da identifikuju proteine manjih molekulskih masa (Takahashi, H., Chinuki, Y. et al. 2014). Naši rezultati ne samo da pokazuju jasno razdvajanje proteina u opsegu od 20-100 kDa, već i da se 53 proteinske tačke pronađene u proteinskom ekstraktu sirovog mesa nalaze i u proteinskom ekstraktu srednje pečenog mesa. Isto tako, naši rezultati pokazuju veliku sličnost u proteinskom profilu između kuvanog i pečenog mesa (35 proteinskih tačaka). Srednje pečeno meso je ustvari samo blago termički tretirano (4 min na 50°C), te stoga i nije moglo doći do značajne denaturacije i primetnog formiranja agregata, pa je stoga po svom proteinskom profilu jako slično sirovom mesu. Za razliku od toga kuvano i pečeno meso su tretirani na sličnim visokim (denaturišućim) temperaturama, tokom znatno dužeg vremena, rezultirajući u sličnim proteinskim profilima. Osim toga, pokazali smo da proteini razdvojeni na drugoj dimenziji reaguju u istoj meri sa serumom pacijenata kao i sa antitelom specifičnom za α -Gal.

Pomoću MS/MS analize uspehi smo da identifikujemo 18 IgE-vezujućih proteina. Neki od identifikovanih proteina su dobro poznati alergeni mesa (mioglobin i BSA) (Fiocchi, A., Restani, P. et al. 1995; Fuentes, M. M., Palacios, R. et al. 2004), ali većina njih do sada nije prijavljena u smislu alergena mesa ili kao α -Gal-sadržući

proteini. Sedam od ovih 18 proteina se pokazalo da imaju α -Gal epitop, od kojih je četiri ostalo stabilno i nakon termalne obrade mesa. Novo-identifikovani proteini (triozofosfat izomeraza, karbonska anhidraza 3, laktat dehidrogenaza A, kreatin kinaza M-tip, aspartat aminotranferaza, β -enolaza i α -enolaza), pripadaju proteinima citoplazme gde igraju esencijalne uloge u metaboličkim putevima (Joseph, P., Suman, S. P. et al. 2012; Bax, M. L., Sayd, T. et al. 2013). Neki od njih imaju razne funkcije, npr. enolaza učestvuje u procesima kao što je kontrola rasta, tolerancija hipooksije, u alergijskom odgovoru, a može i da stimuliše proizvodnju imunoglobulina (Aaronson, R. M., Graven, K. K. et al. 1995).

Pored toga, uočili smo da proteini većih molekularnih masa, koji sadrže α -Gal, nisu u velikom izobilju kao proteini manjih molekularnih masa prepoznati od strane anti- α -Gal antitela, što je specifično za Gal α 1 \rightarrow 3 Gal-R epitop (Thall, A. D., Maly, P. et al. 1995). Drugi proteini, poznati da sadrže α -Gal, su tiroglobulin, fibrinogen, IgG, fibronektin i integrin (β 1 subjedninca) (Thall, A. and Galili, U. 1990; Everett, M. L., Lin, S. S. et al. 2003). Ovi proteini nisu detektovani u našem istraživanju verovatno zbog niske rastvorljivosti i veoma velike molekularne mase. Daljom analizom aminokiselinske sekvence identifikovanih proteina pronašli smo da ovi proteini imaju homologiju sa odgovarajućim proteinima iz čoveka (> 85%). Ovi rezultati ukazuju da IgE iz seruma pacijenta alergičnih na crveno mesto nastaje isključivo u odgovoru na šećernu komponentu, s obzirom da ovaj šećer nije eksprimiran kod ljudi zbog nekodiranja odgovarajućeg gena (Lammerts van Bueren, J. J., Rispens, T. et al. 2011).

Da bi smo istražili da li IgE vezivanje iz seruma pacijenta može da se blokira proteinskim ekstraktom iz sirovog mesa uradili smo kompetetivan inhibicioni esej. Tako smo pokazali da ekstrakt goveđeg mesa može da blokira IgE vezivanje za α -Gal na čvrstoj fazi u manjem obliku nego sam α -Gal. Ovo je objašnjeno time da određeni α -Gal epitopi nisu tako lako izloženi na proteinima, kao što je i ranije objavljeno (Galili, U. 2005; Lammerts van Bueren, J. J., Rispens, T. et al. 2011).

U zaključku, u ovoj studiji smo pokazali da je α -Gal epitop uobičajeno prisutan na proteinima iz goveđeg mesa, koji bivaju prepoznati od strane IgE antitela pacijenta alergičnih na crveno meso. Pored toga, tehnikama imunoproteomike identifikovali smo 18 proteina koji IgE antitela prepoznaju. Od ovih 18 proteina pokazali smo da sedam

proteina, koji su prvi put opisani do sada, sadrži α -Gal epitop, od čega su četiri proteina stabilna pri termalnoj obradi (kreatin kinaza M-tip, aspartat aminotrasferaza, β -enolaza i α -enolaza). Samim tim alergenost proteina iz crvenog mesa je očuvana i nakon termalne obrade mesa.

4. Karakterizacija intermedijernih i krajnih produkata izoformi Ara h 2 i Ara h 6 alergena kikirikija dobijenih redukovanjem i alkilovanjem

4.1. Uvod

U poslednjih nekoliko decenija uočen je porast učestalosti alergije na hranu. Uprkos ovome, dijagnostika i tehnike za kvalitetan tretman pacijenata sa alergijom na hranu je i dalje limitirana (O'Keefe, A. W., De Schryver, S. et al. 2014). Poznato je da se alergija na kokošja jaja i kravlje mleko može prerasti u 80% slučajeva, nasuprot alergiji na kikiriki koja je veoma frekventna kod odrasle populacije. Iz tog razloga uloženi su ogroman napor u razvoju specifične imunoterapije za alergene hrane.

Alergeni kikirikija Ara h 2 i Ara h 6 su 2S albumini i pripadaju porodici konglutina, proteina skladištenih u semenu (Breiteneder, H. and Radauer, C. 2004). Ovi proteini predstavljaju glavne alergene kikirikija, *in vitro* i *in vivo* (Bernard, H., Paty, E. et al. 2003; Koppelman, S. J., de Jong, G. A. et al. 2005; Flinterman, A. E., van Hoffen, E. et al. 2007; Blanc, F., Adel-Patient, K. et al. 2009; Porterfield, H. S., Murray, K. S. et al. 2009) i zajedno čine 80-90% alergnog potencijala kikirikija (Porterfield, H. S., Murray, K. S. et al. 2009; Zhuang, Y. and Dreskin, S. C. 2013). Ara h 2 i Ara h 6 alergeni sadrže čvrsto kompaktno jezgro povezano sa nekoliko disulfidnih mostova, koje je rezistentno na tretman visokim temperaturama i uticaj digestivnih proteaza (Sen, M., Kopper, R. et al. 2002; Maleki, S. J., Viquez, O. et al. 2003; Lehmann, K., Schweimer, K. et al. 2006). Pokazano je da imunoterapija sa Ara h 2 i Ara h 6 alergenima može da dovede do desenzitizacije u miševima (Kulis, M., Chen, X. et al. 2012). Međutim, pacijenti alergični na kikiriki su i dalje pod rizikom od razvoja anafilakse pri imunoterapiji. Zbog toga postoji potreba za sigurniju i efikasniju strategiju razvoja imunoterapije, koja uključuje modifikacije alergena, ili promenu načina isporuke istih (Casale, T. B. and Stokes, J. R. 2011).

Modifikacije alergena hemijskim reagensima koriste se u proizvodnji alergioda, sa ciljem da redukuju IgE epitope dok čuvaju T-ćelijske epitope (Casale, T. B. and Stokes, J. R. 2011). Jedan od načina dobijanja alergoida jeste redukovanje disulfidnih mostova proteina. Pokazano je da redukovanjem β -laktoglobulina tioredoksinom on postaje senzitivniji na simuliranu gastričnu digestiju pepsinom i gubi alergеност (del Val, G., Yee, B. C. et al. 1999). Međutim, uvideno je da familija tioredoksina predstavlja ukršteno reaktivne proteine uključene u patogenezu atopijskih ekcema i astme (Glaser, A. G., Menz, G. et al. 2008).

U grupi konglutin izoformi kikirikija, dokazano je da redukovanje disulfidnih veza i alkilovanje sulfhidridnih grupa dovodi do smanjenja IgE vezivanja (Starkl, P., Felix, F. et al. 2012). Očigledno je da je IgE vezivanje ovih alergena uglavnom zavisno od njihove strukture. Naime, pokazano je da su redukovani i alkilovani molekuli hipoalergeni, ali i dalje imunogeni (van der Kleij, H. P. M., Smit, J. et al. 2011). Stoga je naš cilj bio da ispitamo kritični korak tokom redukovanja i alkilovanja kikiriki alergena kako bi omogućili razvoj konzistentnih modifikovanih konglutina kikirikija.

4.2. Materijal i metode

4.2.1. Izolovanje izoformi Ara h 2 i Ara h 6 alergena

Smeša Ara h 2.02, Ara h 2.01 i Ara h 6 alergena, je prečišćena prema (Koppelman, S. J., de Jong, G. A. et al. 2005). Ovoj smeši, dodat je 4 M amonijum sulfat u 20 mM Tris HCl puferu pH 8 kako bi se dobila finalna koncentracija amonijum sulfata od 1,6 M. 15 mg proteina po 1 ml zapremine kolone je aplicirano na SourcePhenyl 15 kolonu (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), prethodno ekvilibrisanu sa 1,6 M amonijum sulfatom u 20 mM Tris HCl puferu pH 8. Nakon ispiranja nevezanih proteina, vezani proteini su eluirani gradijentom od 1,28 M do 0,12 M amonijum sulfata u 20 mM Tris HCl pH 8 (10 zapremina kolona). Čistoća dobijenih frakcija je testirana na SDS PAGE.

4.2.2. Optimizacija metode za modifikaciju izoformi Ara h 2 i Ara h 6 alergena

Radi dobijanja adekvatne koncentracije redukujućeg i alkilujućeg reagensa, kao i za utvrđivanje optimalnog vremenskog perioda koji je neophodan za kompletnu modifikaciju, urađena je kinetička studija. Pojedinačne izoforme (0.5 mg/ml proteina u 50 mM natrijum-fosfatnom puferu pH 8) su redukovane sa 0,5 i 5 mM ditiotreitolom (DTT) (Sigma-Aldrich, MO, SAD). Uzorak proteina je preinkubiran na 60°C tokom 30 sekundi pre dodatka redukujućeg sredstva. Nakon dodavanja DTT reakcija je nastavljena na 60°C sa konstantnim mešanjem i alikvoti su uzimani u određenim vremenskim intervalima: nakon 0,5, 1, 2, 5, 10, 30 i 60 minuta. Proces redukovanja je odmah zaustavljen inkubiranjem sa jodacetamidom (JAM) (Sigma-Aldrich), finalne koncentracije 0,5, 5 i 50 mM, na sobnoj temperaturi u mraku tokom 90 minuta. Svi alikvoti su analizirani pomoću SDS PAGE pod ne-redukujućim uslovima.

Za karakterisanje krajnjih produkata modifikacije, proteini u 50 mM Na-fosfatnom puferu pH 8 su redukovani uz pomoć 5 mM DTT u trajanju 60 minuta na 60°C, a potom su alkilovani uz pomoć 50 mM JAM na sobnoj temperaturi u mraku tokom 90 minuta. Kada je modifikacija završena višak reagensa je uklonjen centrifugiranjem u Amicon centrikonima (Ultracel 3K, regenerisana celuloza, Millipore, 3 kD cut-off membrana) na 3750 rpm 30 minuta. Za filtraciju i izmenu pufera je korišćen 10 mM Na-fosfatni pufer pH 8. Na kraju je određena koncentracija proteina uzorcima korišćenjem BCA testa na mikrotitar pločici (Pierce, Amsterdam, Holandija) po uputstvima proizvođača.

4.2.3. SDS PAGE analiza prirodnih i redukovano-alkilovanih izoformi Ara h 2 i Ara h 6 alergena

Proteini (Ara h 2.02, Ara h 2.01 i Ara h 6) su analizirani na 14% AA gelu skladu sa referencom (Laemmli, U. K. 1970), pod redukujućim i ne redukujućim uslovima. Gelovi su obojeni bojom Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva).

4.2.4. Masena spektrometrijska analiza intaktnih izoformi Ara h 2 i Ara h 6 alergena

Mase intaktnih prirodnih i modifikovanih proteina su analizirane na EASY nLC II sistemu koji je povezan sa LTQ Orbitrap XL (Thermo scientific, Inc.), kako bi se odredile egzaktne mase. 0,5 µg svakog proteina i njegovog modifikata je injektirano na EasyColumn C18 predkolonu (2 cm dužine, ID 100 µm i 3 µm prečnik čestica matriksa) i razdvojeno na EasyColumn C18 koloni (10 cm dužine, ID 75 µm i 5 µm prečnik čestica matriksa). Kao eluent A korišćen je vodeni rastvor 0,1% mravlje kiseline, a kao eluent B 0,1% mravlja kiselina u acetonitrilu (MS čistoće, Sigma-Aldrich). Uzorci su eluirani u LTQ sistem sa gradijentom eluenta B 5-65% u toku 100 min pri protoku od 300 nl/min. Sprej je generisan sa emiterom na čijem vrhu je voltaža podešena od 2,0 kV, kapilarna voltaža od 9V sa kapilarnom temperaturom od 275°C. Visoko-rezolutni FTMS profilni spektar (raspon skeniranja od 300-4000 m/z, sa rezolutivnom moći od 60.000) je praćen koristeći Xcalibur softver (verzija 2.1) (Thermo Scientific).

4.2.5. Spektroskopija cirkularnog dihiroizma (CD)

Karakterizacija sekundarnih struktura izoformi Ara h 2 i Ara h 6 alergena kikirikija kao i njihovih modifikata vršena je pomoću CD spektroskopije. CD spektri su snimljeni na spektropolarimetru JASCO J-815 (JASCO, Tokio, Japan). Sistem je kalibrisan rastvorom amonijum D-10-kamforsulfonata koncentracije 0,6 g/l i poznatog elipticiteta +190.4 mdeg na 290.5 nm. Spektri uzoraka (50 µg/ml izoformi Ara h 2 i Ara h 6 alergena, kao i njihovih modifikata u 10 mM Na-fosfatnom puferu pH 8.0) su snimani na 20°C u dalekoj ultra-ljubičastoj oblasti (190-260 nm) u kiveti sa dužinom svetlosnog puta od 0,5 mm. Spektri su snimani u inkrementima od 0,1 nm brzinom od 100 nm/min u atmosferi azota. Svaki spektar je snimljen 15 puta u dva nezavisna eksperimenta i uzeta je njihova uprosečena vrednost. Rezultati su predstavljeni kao srednji molarni elipticitet aminokiselinskih ostataka proteina:

$$[\theta] = \theta / (10nCd),$$

gde je θ izmereni elipicitet, n je broj aminokiselinskih ostataka u proteinu, C je molarna koncentracija proteina u uzorku, a d je dužina svetlosnog puta u kiveti.

4.2.6. Spektrofluorimetrijska analiza prirodnih i modifikovanih izoformi Ara h 2 i Ara h 6 alergena

Fluorescentni spektri su snimani na spektrofluorimetru FluoroMax-4 (Horiba Scientific, Japan), na sobnoj temperaturi (25°C) u kvarčnoj kivetici od 3,5 ml sa prorezom širine 5 nm. Izloženost triptofana i tirozina kod Ara h 2 izoformi i Ara h 6 (koncentracije 25 µg/ml) je praćena pomoću emisionih spektara u opsegu 290-450 nm nakon pobuđivanja ekscitacijom na 280 nm.

4.2.7. Peptidno mapiranje (*Peptide Mass Fingerprint*)

Tripsinska digestija kompletno i parcijalno redukovanih proteina je rađena u 100 mM amonijum bikarbonatnom puferu pH 8,5 (ABC) sa tripsinom iz svinjskog pankreasa (*proteomic* čistoće, dimetilovan; Sigma-Aldrich). Odnos enzima i supstrata u rastvoru korišćen u eseju je 1:50 (m/m). Digestija je rađena na 37°C u trajanju od 16 h, nakon čega je reakcija stopirana dodatkom mravlje kiseline finalne koncentracije 1%.

Peptidi su analizirani na EASY nLC II sistemu koji je povezan sa LTQ Orbitrap XL (Thermo scientific Inc.). Ukupno je 100 ng proteina injektovano na EASY-Spray PepMap C18 kolonu (150x 0,075 mm, 3 µm prečnik čestica matriksa). Kao eluent A korišćen je vodeni rastvor 0,1% mravlje kiseline, a kao eluent B 0,1% mravlja kiselina u acetonitrilu. Uzorci su eluirani gradijentom eluenta B 5-95% u toku 62 min pri protoku od 300 nl/min. Vrednost za CID normalizovanu kolizionu energiju je bila 35% u vremenu od 30 ms. Vrednosti parametara Nano electroSpray jonizacije (NSI) su bili: voltaža spreja +2,0 kV, kapilarna voltaža 6,00 V, kapilarna temperatura 250°C. Spektri su snimljeni u pozitivnom modu u opsegu m/z 300-2000. Pet najintenzivnijih monoizotopskih pikova u spektru je fragmentirano pomoću CID, i detektovano u linearnoj jonskoj zamci.

Analiza podataka je urađena pomoću SEQUEST pretraživača i Proteome Discoverer 1.3.0339 softvera (Thermo Scientific) po sledećim uslovima: FASTA databaza proverenih proteinskih sekvenci iz Uniprot baze podataka; enzim, tripsin; broj promašenih mesta za proteolizu, 2; tolerancija greške za peptide, ±10 ppm; MS/MS

tolerancija, $\pm 0,5$ Da; fiksne modifikacije aminokiselina: karbamidometilacija na cisteinu; dinamičke modifikacije, oksidacija metionina i prolina.

MassMatrix softver (www.massmatrix.net) verzija 2.4.2 je korišćen za utvrđivanje i identifikaciju disulfidnih veza kod peptida nastalih tripsinskom digestijom intermedijarnih produkata nastalih limitiranim redukovanjem i alkilovanjem.

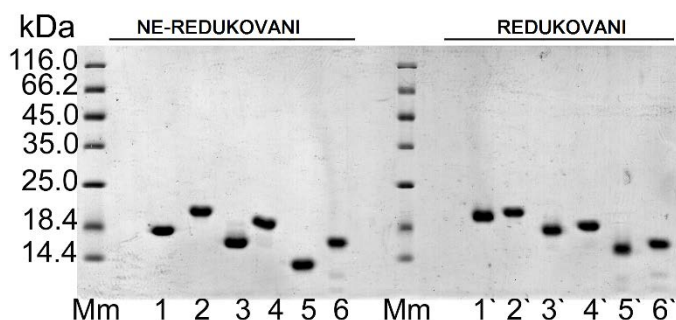
4.2.8. Inhibicija vezivanja IgE antitela u ELISA testu

Za bunare Maxi Sorb pločice sa 96 bunara (Nunc, Danska) vezan je prirodni alergen preko noći u vlažnoj atmosferi na sobnoj temperaturi (100 μ l po bunaru, 5 μ g/ml u karbonatnom puferu pH 9.6). Blokiranje je rađeno sa 1% BSA (Sigma Aldrich) u TTBS (20 mM Tris pH 7.4 koji sadrži 0,9 % NaCl i 0,1 % Tween 20), u trajanju od 1 h na 37°C u ELISA šejkeru. ELISA je rađena sa serumom koji je sačinjen od pojedinačnih seruma pacijenata alergičnih na kikiriki, čiji je nivo IgE antitela određen ImmunoCAP metodom (šifra f13, Phadia) i, iznosio 39,61 k_AU/L. Serum je inkubiran 1 h na sobnoj temperaturi sa prirodnim ili modifikovanim alergenima u različitim koncentracijama pre apliciranja u bunare pločice gde je inkubacija nastavljena još 1 h na 37°C. Koncentracioni opseg uzoraka je optimizovan tako da zahvata linearni opseg tipične S krive, sa faktorom razblaženja 3 i startnim koncentracijama od 10 μ g/ml za prirodne i 500 μ g/ml za modifikovane alergene. Nakon ispiranja, IgE, čije vezivanje za vezani alergen nije inhibirano, detektovan je jednočasovnim inkubiranjem sa mišjim anti-humanim IgE antitelima (1:2000, Abcam, Velika Britanije), za koje je konjugovana peroksidaza iz renaKonačno, bojenje je vršeno dodavanjem supstrata za peroksidazu, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB; Sigma Aldrich), 100 μ L po bunaru na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 minuta, da bi na kraju reakcija bila zaustavljena dodavanjem 50 μ L 0,5 M H₂SO₄. Apsorbanca je očitavana na 450 nm. IgE vezujuća potentnost je izračunata metodom horizontalnog rasejavanja, upoređivanjem sa inhibicionom krivom prirodnog alergena kao referentne vrednosti od 100%. Inhibitorne krive imale su korelaciju od $\geq 0,985$.

4.3. Rezultati

4.3.1. Molekulska masa prirodnih i redukovano-alkilovanih izoformi Ara h 2 i Ara h 6 alergena

Pomoću SDS PAGE utvrđena je čistoća i profil izoformi Ara h 2.02 (teški lanac), Ara h 2.01 (laki lanac) i Ara h 6 alergena, pre i posle modifikacije (Slika 4.1.), pod ne-redukujućim i redukujućim uslovima. Modifikovane izoforme Ara h 2 alergena, i Ara h 6 alergena imaju karakteristični pomeraj u prividnoj molekularnoj masi tokom redukovanja disulfidnih mostova koristeći 5 mM DTT.

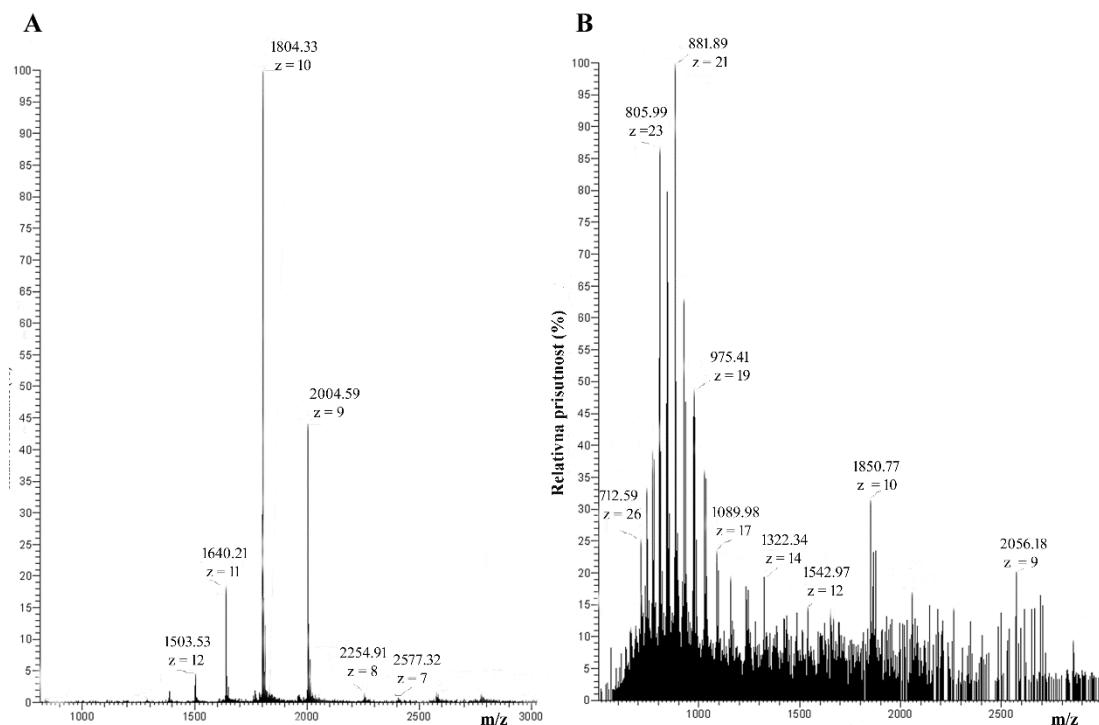


Slika 4.1. SDS PAGE prečišćenih i redukovano-alkilovanih konglutin izoformi pod neredukujućim i redukujućim uslovima.

Konglutini kikirikija sadrže 8 (Ara h 2), ili 10 (Ara h 6) cisteina (Cys), čiji su bočni ostaci podlegli alkilovanju viškom JAM, time izazivajući povećanje u prividnoj molekularnoj masi u odnosu sa prirodne proteine pod ne redukujućim uslovima. Na osnovu povećanja mase pri alkilovanju (116 Da po jednom disulfidnom mostu), ovaj pomeraj u molekularnoj masi je veći od očekivanog i javlja se usled gubitka proteinske trodimenzionalne strukture utičući na njihovu mobilnost tokom elektroforeze. Pod redukujućim uslovima ovaj pomeraj kod modifikovanih alergena je neznatan i predstavlja povećanje mase usled alkilovanju. Pod redukujućim uslovima može se uočiti mala količina proteinskih traka manjih molekularnih masa, nastalih verovatno od izoformi koje su podlegle posttranslacionom procesovanju.

U cilju procene tačne molekularne mase prirodnih kao i modifikovanih proteina, urađena je visoko-rezolutna masena spektrometrija Ara h 2 izoformi kao i Ara h 6

alergena. Na slici 4.2. prikazani su ESI-MS spektri prirodnih i redukovano-alkilovanih Ara h 2.02 izoformi kao primer.



Slika 4.2. ESI MS spektri Ara h 2.02 proteina. A- nemodifikovani; B- redukovano-alkilovani.

Spektri modifikovanih proteina pokazuju veće naelektrisanje (srednja vrednost $q=+21$), u poređenju sa prirodnim proteinima (srednja vrednost $q=+10$), verovatno iz razloga što je više protonovanih grupa izloženo rastvaraču nego kod nemodifikovanih proteina. Tabela 4.1. sadrži rezime dobijenih masa Ara h 2 izoformi i Ara h 6 alergena. Iz tabele je jasno uočljiva razlika u masi između redukovano-alkilovanih i nemodifikovanih proteina. Naime, masa modifikovanih Ara h 2.02, Ara h 2.01 i Ara h 6 proteina je povećana za po 465,58; 464,21 i 579,56 Da, respektivno.

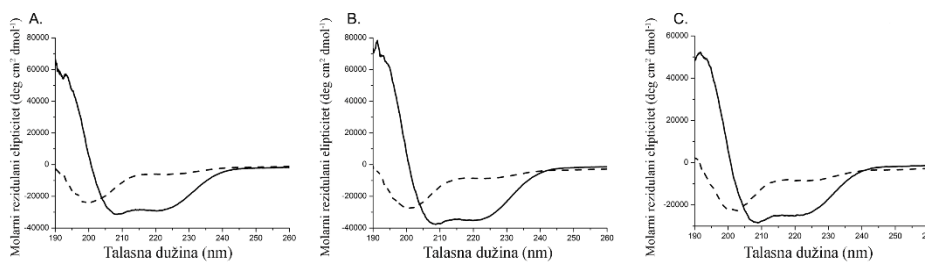
Tabela 4.1. Mase konglutin izoformi dobijene pomoću LTQ XL Orbitrap masenog spektrometra

Proteini	UniProt pristupni broj*	Ekperimentalne mase prirodnog proteina (Da)	Ekperimentalne mase modifikovanog protein (Da)	Dobijena razlika između modifikovanog i prirodnog proteina (Da)
Ara h 2.02	Q6PSU2-1	18032,13	18497,71	465,58
Ara h 2.01	Q6PSU2-4	16341,26	16805,47	464,21
Ara h 6	Q647G9	14835,12	15414,68	579,56

* - izvor www.uniprot.org

4.3.2. Strukturni aspekti Ara h 2 izoformi i Ara h 6, pre i nakon modifikacije

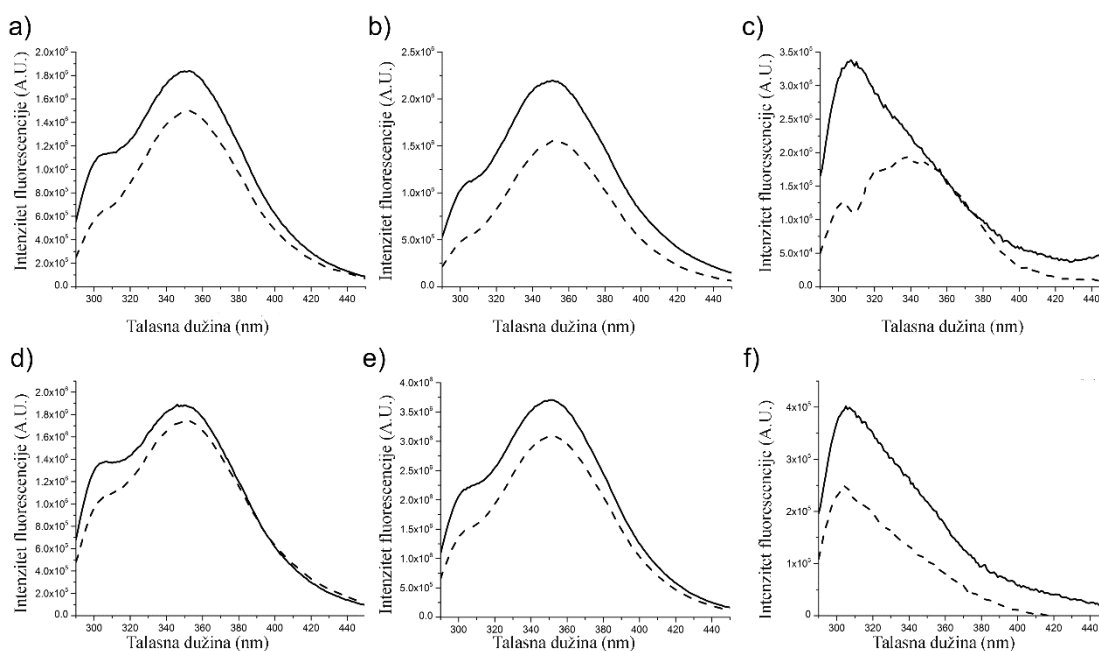
Sekundarne strukture prirodnih i redukovano-alkilovanih proteina analizirane su pomoću CD spektroskopije. CD spektri snimljeni u dalekoj ultra-ljubičastoj oblasti (190-260 nm) prikazani su na slici 4.3. Prirodni proteini pokazuju minime na 208 i 220 nm, kao i porast elepticiteta u oblasti talasnih dužina manjih od 200 nm, ukazujući na pravilno uvijene proteinske strukture i visok sadržaj α -heliksa. Ovo je uočeno za sve tri izoforme. Nakon modifikacije, svi proteini pokazuju karakteristične promene u CD spektarima što se odraz znatno razvijene strukture. CD spektroskopijom uočen je značajan gubitak α -heliksa gubljenjem minimuma na 220 i 208 nm kao i gubitka maksimuma elipticiteta u oblasti talasnih dužina manjih od 200 nm. Pri tome je primećen porast β -struktura i razvijenih struktura sa minimumima na 200 nm.



Slika 4.3. CD spektri nedomifikovanih (puna linija) i redukovano-alkilovanih konglutin izoformi. A- Ara h 2.02; B- Ara h 2.01; C- Ara h 6.

Intenziteti i emisioni maksimumi unutrašnjih fluorofora Ara h 2 izoformi, kao i Ara h 6 proteina, praćeni su spektrofotometrijskom metodom radi karakterisanja tercijarne strukture pre i nakon modifikacije. Naime, obe izoforme Ara h 2 proteina,

sadrže jedan triptofan (Trp) i 4-6 tirozina (Tyr), u zavisnosti o kojoj se izoformi radi, dok Ara h 6 sadrži samo dva Tyr. Pri pobuđivanju na 280 nm fluorescentni spektri prirodnih Ara h 2 izoformi imaju tipičan emisioni maksimum na 350 nm, koji potiče od Trp potpuno izloženog vodenom rastvaraču. Emisioni maksimum Tyr na 305 nm je takođe uočljiv zbog velikog broja Tyr u proteinu, a delimično i usled nedovoljne rezonantne energije transfera između Trp i Tyr. Kod Ara h 6 proteina dominantan je samo emisioni maksimum Tyr na 305 nm.



Slika 4. 4. Fluorescentni emisioni spektri konglutin izoformi na pH 8 (a-c) i na pH 7 (d-f), pri pobuđivanju na 280 nm. Puna linija:prečišćeni protein, isprekidana linija:redukovano-alkilovani protein. a-, d-Ara h 2.02; b-, e- Ara h 2.01; c-, f- Ara h 6.

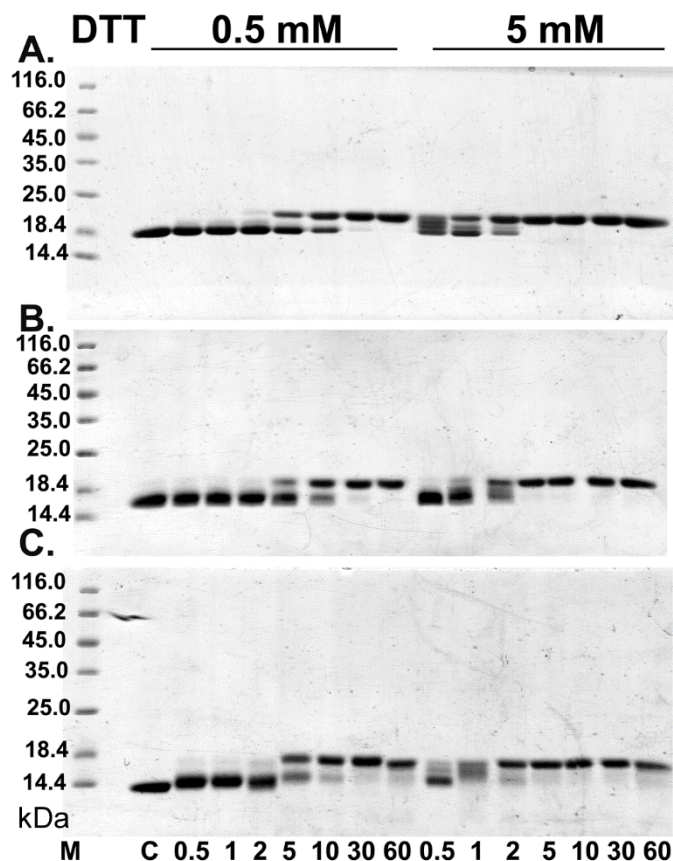
Nakon redukovanja i alkilovanja Ara h 2 izoformi, nije uočena nikakva promena maksimuma intenziteta Trp, s obzirom da je Trp već potpuno izložen rastvaraču. Međutim, maksimum intenziteta na 305 nm koji potiče od emisije Tyr nestaje (Slika 4.4.a-c), verovatno zbog povećanog gašenja emisionog maksimuma, koji je takođe uočen i kod Ara h 6 proteina. Kod modifikovanog Ara h 6 proteina, pri pH vrednosti od 8,0 javlja se novi emisioni maksimum na 345 nm, koji nije prisutan u neutralnoj pH sredini (slika 4.4. d-f). Ovaj maksimum se javlja verovatno zbog tirozinske emisije koja je izražena u baznoj sredini, i upravo odsustvo ove emisiju u neutralnoj sredini potvrđuje odsustvo kontaminacije ovog proteina nekim drugim proteinom bogatim Trp.

Na osnovu ovih rezultata pretpostavljamo da razlika u distribuciji naelektrisanja kod masenih spektara, između prirodnih i modifikovanih proteina, može biti objašnjena promenama u sekundarnoj i tercijarnoj strukturi proteina. Naime, distribucija naelektrisanja u masenim spektrima intaktnih proteina je u tzv. "obliku zvona", sa najintenzivnijem naelektrisanjem od $q=+10$ kod prirodnih proteina, i $q=+21$ kod modifikovanih proteina. Ovakva distribucija naelektrisanja ukazuje na veću izloženost protonovanih grupa kod modifikovanih proteina zbog delimično denaturisanog karaktera.

4.3.3. Kinetika modifikacije - redukovanje i alkilovanje praćeno elektroforetskom mobilnošću

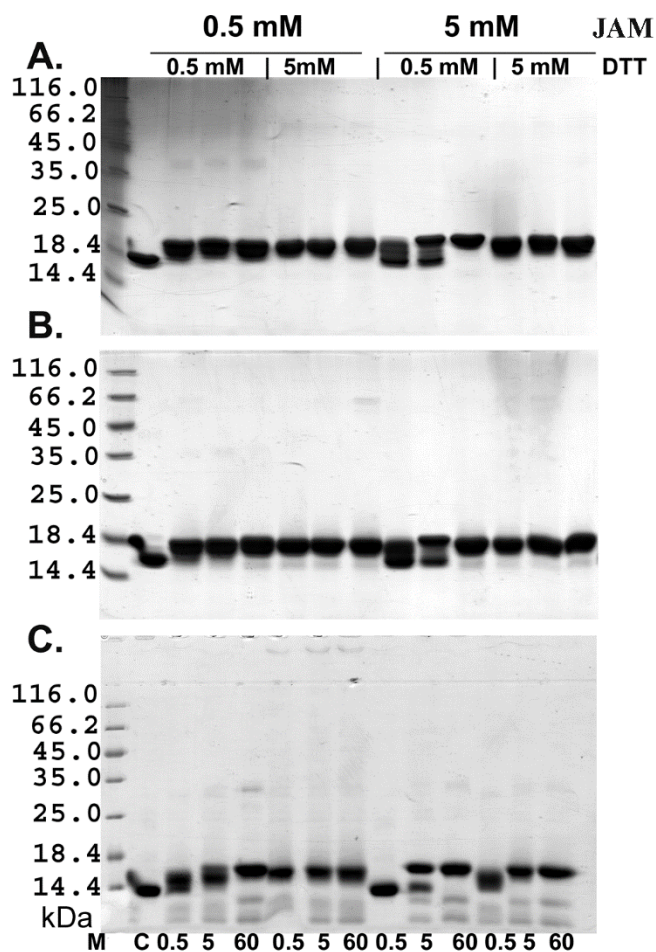
Kinetika modifikacije izoformi Ara h 2 i Ara h 6 alergena kikirikija praćena je elektroforetskom mobilnošću proteina u zavisnosti od koncentracije redukujućeg ili alkilujućeg agensa, kao i vremena izlaganja ovim agensima .

SDS PAGE analizom prvo je praćen efekat redukujućeg agensa na alergene (Slika 4.5.). Uočeno je da se modifikacija znatno brže završava u prisustvu 5 mM DTT, gde je kompletna redukcija dostignuta već nakon 5 minuta. Sa druge strane, manja koncentracija DTT reagensa, u koncentraciji od 0,5 mM, pokazuje da je neophodno više vremena (30 minuta) da bi redukovanje bilo kompletno. Naime, uočeno je da DTT u koncentraciji od 0,5 mM u vremenu od 2 minuta dovodi do redukcije nekih od disulfidnih mostova, ali tek nakon 5 minuta vidi se da je određena količina proteina kompletno modifikovana, dok većina i dalje nije podlegla modifikaciji. Kada na SDS PAGE uporede proteinski profili proteina modifikovanih sa 5 mM i 0,5 mM DTT, može se uočiti da manja koncentracija reagensa daje manje stabilne intermedijere tokom inkubacije do 30 minuta.



Slika 4.5. SDS PAGE analiza kinetike redukovanja konglutina praćena u vremenu u prisustvu 0,5 i 5 mM DTT. A- Ara h 2.02; B- Ara h 2.01; C- Ara h 6.

Za sledeći eksperiment izabrana su tri različita vremena inkubacije (0,5, 5 i 60 minuta) tokom redukovanja sa 0,5 mM i 5 mM DTT i pri tome je varirana koncentracija alkilujućeg reagensa (0,5 i 5 mM JAM). Koncentracija od 0,5 mM JAM nije bila dovoljno efektivna da prekine reakciju redukovanja u oba slučajaja (0,5 i 5 mM DTT) (Slika 4.6., leva polovina). Sa druge strane, 5 mM JAM stopira redukovanje kod primene 0,5 mM DTT, ali ne i kod primene 5 mM DTT (Slika 4.6., desna polovina). Ono što je uočljivo jeste pojava proteinskih traka visoke molekulske mase (posebno u slučaju Ara h 6 proteina), koje u slučaju manjih koncentracija JAM (0,5 i 5 mM) nastaju intra-molekularnim umrežavanjem do kojeg dolazi tokom razmene disulfidnih veza.

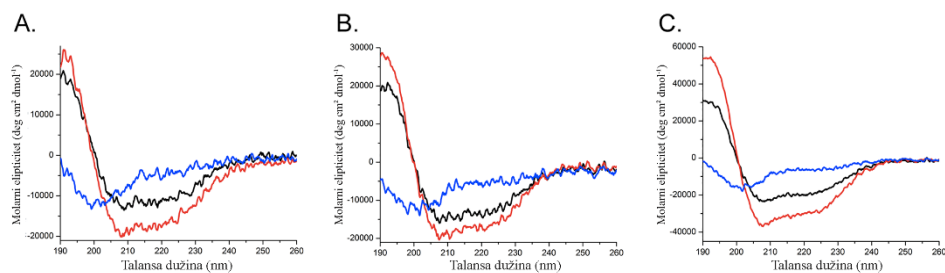


Slika 4.6. SDS PAGE analiza kinetika alkilovanja konglucin izoformi praćena u vremenu pri alkilaciji sa 0,5 i 5 mM JAM nakon redukcije sa 0,5 i 5 mM DTT. A- Ara h 2.02; B- Ara h 2.01; C- Ara h 6.

4.3.4. Kinetika modifikacije - redukovanje i alkilovanje praćeno povećanjem masa

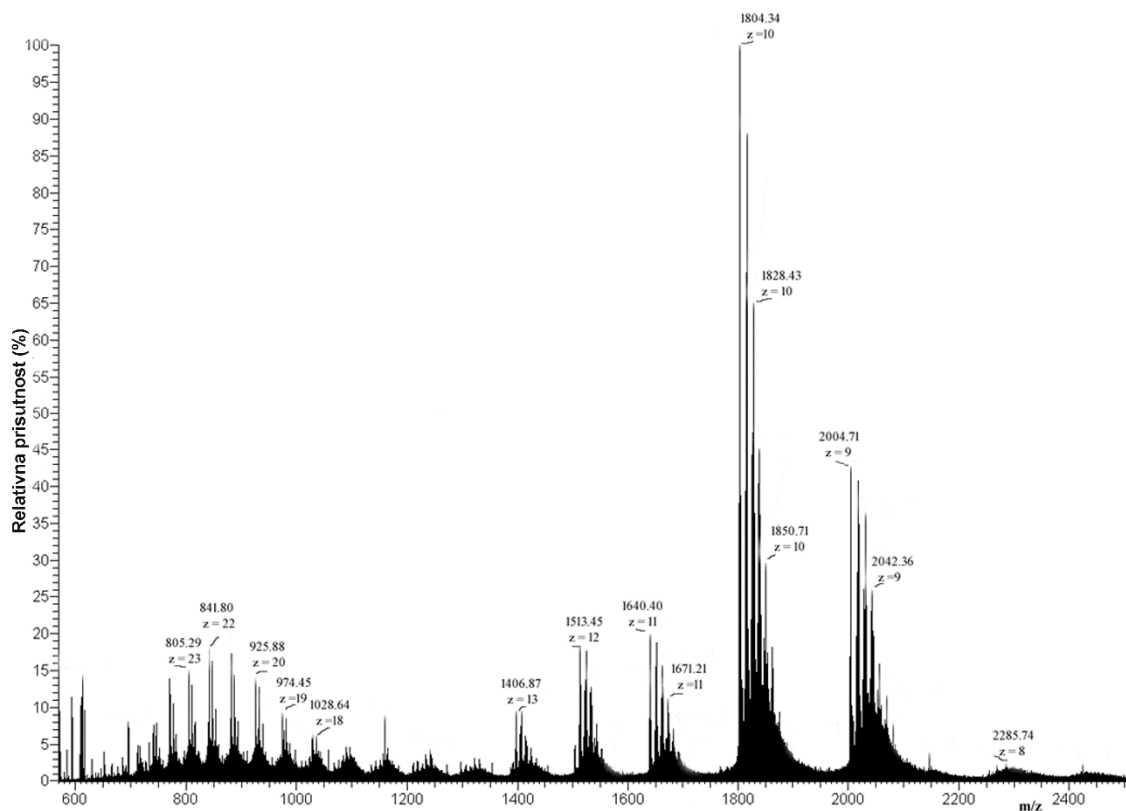
Sa namerom da utvrdimo da li postoji kritična disulfidna veza koja se modifikuje tokom prvih minuta redukovanja, snimljeni su maseni spektri Ara h 2.02 proteina nakon 0,5 minuta redukcije sa 0,5 i 5 mM DTT. Prema gore navedenim rezultatima, u 0,5 minutu redukovanja sa 0,5 mM DTT nije uočena nikakva prividna promena molekulske mase proteina, ali je uočena slabo vidljiva proteinska traka koja se nalazi nešto malo iznad proteinske trake nemodifikovanog proteina (Slika 4.5A).

Koristeći daleku ultra-ljubičastu CD spektroskopiju za modifikovani protein jasno se vidi da limitirani uslovi modifikacije nemaju efekte na sekundarnu strukturu proteina, koja je slična kao kod nemodifikovane forme (Slika 4.7.).



Slika 4.7. CD spektri konglutin izoformi u 0,5 min 0,5 mM DTT (crvena linija). Crna linija nativni protein; plava linija redukivni protein sa 5 mM DTT i 50 mM JAM. Ara h 2.02; B- Ara h 2.01; C- Ara h 6.

Podaci koji su dobijeni masenom spektrometrijom govore da se u uzorku nalazi, ne samo nemodifikovani oblik proteina, već i protein čija se masa razlikuje od nemodifikovanog za 116,27 Da, što odgovara modifikaciji tačno jednog disulfidnog mosta. Za 0,5 minuta redukovanja sa 5 mM DTT na SDS PAGE vide se četiri proteinske trake (Slika 4.5A). Maseni spektar ovog modifikovanog produkta prikazuje pet dominantnih masa sa istim naelektrisanjem (Slika 4.8.). Tačnije, prva masa odgovara masi proteina koji nije podlegao modifikaciji (populacija jona 1640,40; 1804,34; 2004,71 m/z); druga masa pokazuje da je jedan disulfid modifikovan (jon 1513,45 m/z); treći intermedijarni produkt ima masu koja odgovara modifikaciji dva disulfida (populacija jona 1406,87; 1828,43 i 2285,74 m/z); četvrti intermedijer ima tri modifikovana disulfida (1627,21 i 2042,36 m/z); i na kraju, masa poslednjeg odogovara konačnom produktu modifikacije gde su sva četiri disulfida podlegala modifikaciji (805,29; 841,80; 925,88; 974,56; 1028,65 i 1850,72 m/z).



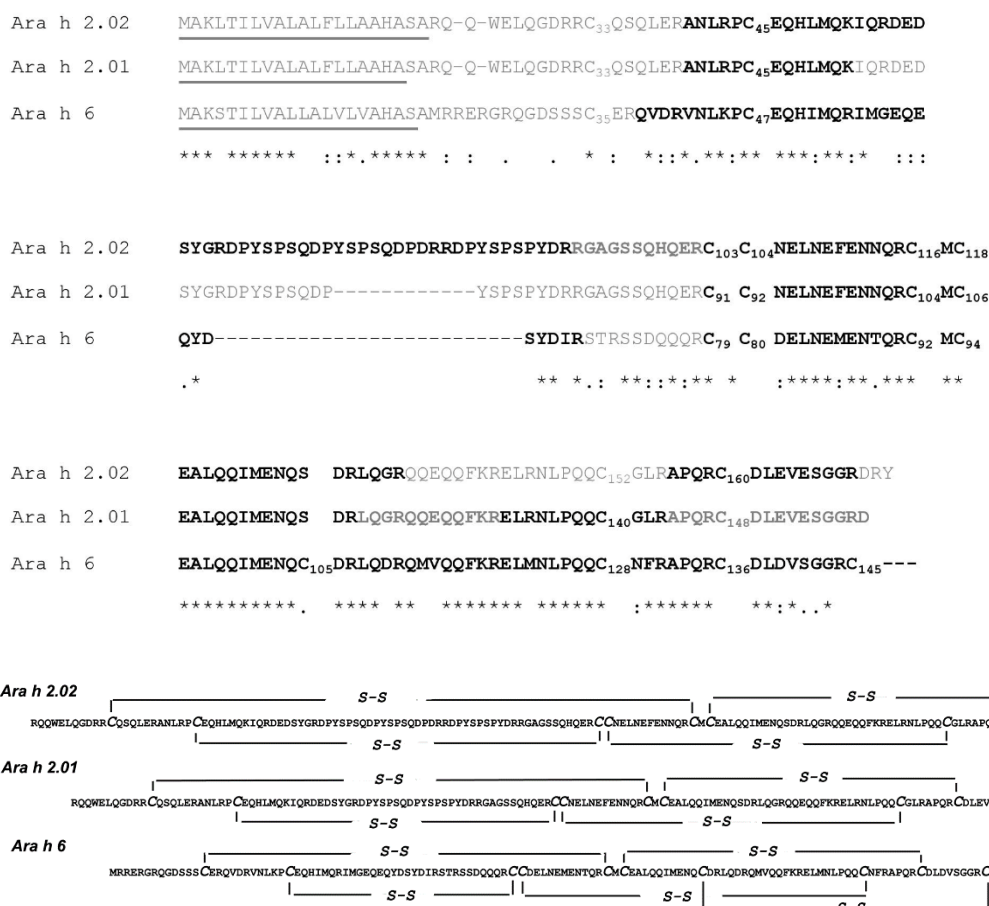
Slika 4.8. ESI MS spektar Ara h 2.02 alergena redukovanim 0,5 minuta sa 5 mM DTT.

Kao što se vidi na slici 4.3.9., u regionu naelektrisanja od $q=+23$ do $+18$ (maksimum na $+22$), najzastupljeniji su joni proteina koji sadrži sva četiri disulfida modifikovana, dok se u oblasti naelektrisanja $q=+13$ do $+8$ (maksimum na $+10$), nalaze joni proteina sa jednim, dva ili tri modifikovana disulfida. Pored toga, u delu gde su visoka naelektrisanja nisu pronađene mase koje odgovaraju nemodifikovanom proteinu ili modifikovanom sa jednim ili dva disulfida.

Ovi rezultati, zajedno sa dalekim ultra-ljubičastim CD spektrima, ukazuju da struktura proteina nije značajno narušena čak iako su dva disulfida raskinuta. Sa druge strane, populacija jona sa modifikovanih četiri disulfida je distribuirana između populacije nativnih proteina i delimično modifikovanih proteina. Ovi rezultati idu u prilog SDS PAGE rezultatima koji demonstriraju da tokom limitiranih uslova redukovanja ili alkilovanja postoje vrste sa minimum dve različite konformacije (nativna i delimično modifikovana) rezultujući pojavom trake na prividno drugoj masi.

4.3.5. Karakterizacija disulfidnih veza tokom procesa modifikacije

Kako bi dalje istražili da li određeni disulfid podleže modifikaciji nakon prvog koraka modifikacije, Ara h 2 i Ara h 6 izoforme su redukovane sa 0,5 mM DTT na 0,5 minuta. Naime, digestijom tripsinom i mapiranjem dobijenih peptida od kompletno redukovanih i alkilovanih Ara h 2.02, Ara h 2.01 i Ara h 6 alergena, kao i pretragom kroz bazu podataka korsiteći SEQUEST algoritam, pronađeno je da su svi cisteini pronađenih peptida modifikovani sa 57,56%, 31,40% i 67,59% pokrivenosti sekvence (potamnjeni deo sekvenci slika 4.9.).



Slika 4.9. Homologija konglutin izoformi i pozicija disulfidnih mostova

U posebnom eksperimentu, Ara h 2 i Ara h 6 izoforme su limitirano redukovane (0,5 minuta sa 0,5 mM DTT), alkilovane standardnom procedurom alkilovanja i potom

su modifikati digestovani tripsinom i analizirani peptidnim mapiranjem. Analiza dobijenih MS/MS spektara je urađena u MassMatrix programu kako bi se utvrdilo koji su disulfidi modifikovani, a koji su sačuvani. MS/MS spektri modifikata pokazuju da svi cisteini bivaju prisutni u obe forme, redukovanoj i u formi semi-disulfida, što indukuje da ne postoji specifični disulfid koji prvi podleže modifikaciji (Tabela 4.2.). Ono što je interesantno što smo pronašli je da tokom modifikacije dolazi do razmene disulfida. U poređenju sa slikom 4.9., koji prikazuje organizaciju disulfida u Ara h 2 izoformama i Ara h 6, mi smo identifikovali nove lokalizacije disulfida (Tabela 4.2.). Neki od identifikovanih disulfida se nalaze na svojoj lokaciji kao kod nativnog proteina, npr. Cys₃₃ u disulfidu Ara h 2.01 i Ara h 2.02 (Slika 4.9.). U Ara h 2.02 izoformi dolazi do formiranja novog disulfida između Cys₁₁₆ i Cys₁₁₈, kao i Cys₁₀₃ i Cys₁₀₄, ukazujući na formiranje disulfida između cisteina koji se nalaze blizu jedan drugome. Takođe, dolazi do formiranja novog disulfida između cisteina koji su prostorno odvojeni jedan od drugog (npr. Cys₃₃ sa Cys₁₁₆, kao i Cys₃₃ sa Cys₁₆₀). Uočeno je da do formiranja novih disulfida tokom redukovanja isto tako nije restriktivno za specifični cisteinski ostatak. Na primer, Cys₃₃ može da reaguje sa Cys₁₁₆ i Cys₁₆₀; Cys₁₁₆ može da formira disulfidnu vezu sa Cys₁₁₈ i Cys₁₆₀, pored Cys₃₃.

Tabela 4.2. Lista peptida iz konglutin izoforma koji sadrže izmenjenji disulfid.

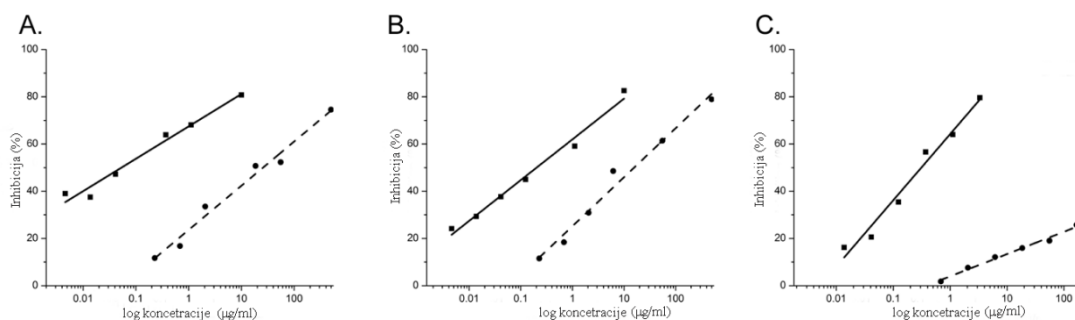
Ara h 2.02												
#	Disulfidna veza	Skor	pp*	pp ^{2*}	pp _{tag} *	m/z	q	Mm detektovana	Mm	ΔM	Propušteno cepanje	Sekvenca
1.	C116-C118	24	11,9	13,2	5,6	632,9288	+3	1896,7718	1806,7707	0,0011	0	C ₁₁₆ M C ₁₁₈ EALQQIMENQSDR
2.	C103-C104	69	20,9	18,2	7,6	806,8222	+2	1610,6271	1610,6322	0,0049	0	C ₁₀₃ C ₁₀₄ NELNEGENNQR
3.	C33-C160	29	6,1	9,0	3,1	642,2902	+3	1924,8561	1924,8488	0,0074	0	C ₃₃ QSQLER C ₁₆₀ DLEVSGGR
4.	C33-C118	62	11,9	13,9	5,8	939,4041	+3	2816,1978	2816,1889	0,0089	0	C ₃₃ QSQLER C ^{JAM} M C ₁₁₈ EALQQIMENQSDR
5.	C116-C160 C33-C118	22	3,6	5,2	2,1	713,1540	+6	4273,1540	4273,8458	0,0418	1	APQRC ₁₆₀ DLEVESGGR C ₁₁₆ M C ₁₁₈ EALQQIMENQSDR C ₃₃ QSQLER
Ara h 2.01												
#	Disulfidna veza	Skor	pp*	pp ^{2*}	pp _{tag} *	m/z	Q	Mm detektovana	Mm	ΔM	Propušteno cepanje	Sekvenca
1.	C104-C106	146	29,6	29,1	12,1	632,9304	+3	1896,7765	1896,7707	0,0058	0	C ₁₀₄ M C ₁₀₆ EALQQIMENQSDR
2.	C91-C92	71	27,3	18,9	8,7	805,8219	+2	1610,6365	1610,6322	0,0043	0	C ₉₁ C ₉₂ NELNEGENNQR ANLRP C ₄₅ EQHLMK
3.	C45-C91	28	2,2	6,6	2,7	855,1862	+5	4271,9020	4271,8934	0,0085	1	GAGSSQHQERC ₉₁ C ^{JAM} NELNEGENNQR
4.	C33-C106	20	4,1	6,0	1,4	705,3057	+4	2818,2011	2818,1763	0,0248	0	C ₃₃ QSQLER C ^{JAM} M C ₁₀₆ EALQQIMENQSDRLQGR C ₃₃ QSQLER
5.	C33-C92 C91-C140	25	3,3	6,2	1,8	757,3406	+6	4539,0071	4538,9719	0,0352	1	GAGSSQHQER C ₉₁ C ₉₂ NELNEGENNQR NLPQQ C ₁₄₀ GLR

Ara h 6												
#	Disulfidna veza	Skor	pp*	pp ² *	pp _{tag} *	m/z	q	Mm detektovana	Mm	ΔM	Propušten o cepanje	Sekvenca
1.	C79-C80	72	22,3	23,3	5,3	791,8029	+2	1582,8029	1582,5986	0,0055	0	C ₇₉ C ₈₀ DELNEMENTQR
2.	C92-C94	59	16,5	13,9	7,1	828,0196	+3	2482,0442	2482,0400	0,0042	1	C ₉₂ M C ₉₄ EALQQIMENQC ^{JAM} DRLQDR
3.	C128-C136	12	7,4	4,5	2,5	804,3707	+3	2411,0974	2411,0901	0,0074	0	C ₁₂₈ DLDVSGGR ELMNPQQ C ₁₃₆ NFR
4.	C47-C80	24	2,6	5,2	4,3	809,6121	+4	3235,4267	3235,4057	0,0209	0	VLNKP C ₄₇ EQIMQR C ^{JAM} C ₈₀ DELNEMENTQR

*pp, pp²: Dva pp skots bazirana na dva statistička modela. Visoka vrednost pp i pp² pokazuje dobro poklapanje. pp skor treba korigirati i sa pp_{tag} skorom.
pp_{tag}: statistički skor koji evaluira poklapanja na osnovu njegovih obojenih oznaka. Bolji skor pokazuje poklapanje boljeg kvaliteta.
Značajan statistički skor je kada su pp ili pp² vrednosti veće od šest.
JAM : Modifikovani Cys.

4.3.6. IgE vezujuće osobine modifikata

Kako bi se ispitaio alergeni potencijal modifikovanih proteina, urađena je inhibitorna IgE vezujuća ELISA. Ara h 2 izoforme, kao i Ara h 6, pokazuju smanjenje u alergenom potencijalu nakon redukovanja i alkilovanja (Slika 4.10.), gde je uviđeno da je neophodna veća koncentracija modifikovanog proteina koji će da inhibira IgE vezivanje. Dok oko 50 puta veća koncentracija modifikovanih Ara h 2 izoformi dovodi skoro do kompletne inhibicije, kao što je uočeno kod prirodnih izoformi, modifikovani Ara h 6 protein nije doveo do kompletne inhibicije čak ni u oko 50 puta većoj koncentraciji (slika 4.10C). Analiza horizontalnog rasejavanja inhibitorne krive je korišćena radi određivanja smanjenja IgE vezujuće potentnosti. Ova analiza je urađena samo na Ara h 2 izoformama, iz razloga što inhibitorna kriva modifikovanog i prirodnog Ara h 6 alergena nije horizontalna. Iako ne baš kvantitativno, može se reći da je IgE vezujuća potentnost ovog alergena smanjena bar za 99,9%.



Slika 4.10. IgE-vezujuće osobine konglutin izoformi pre (puna linija) i posle modifikacije (isprekidana linija). A- Ara h 2.02; B- Ara h 2.01; C- Ara h 6.

Naime, pokazano je da Ara h 2.02 nakon modifikacije gubi IgE vezujuću potentnost za 98,8%, a Ara h 2.01 za 98,9%. Iz analiziranih podataka, jasno je da efekat modifikacije je najjači za Ara h 6.

4.4. Diskusija

Trenutno ne postoji terapijska opcija u lečenju alergije na kikiriki (Nowak-Wegrzyn, A. and Sampson, H. A. 2011). Pokazano je da subkutana imunoterapija ekstraktom (Oppenheimer, J. J., Nelson, H. S. et al. 1992), koja je jako praktična kod

respiratornih alergija kao što su alergija na trave i grinje, nije prihvatljiva u slučaju alergije na hranu zbog visokog rizika od anafilakse.

Najvažniji alergeni kikirikija su Ara h 2 i Ara h 6, izoforme koje pripadaju konglutinskoj porodici skladišnih proteina semena (Breiteneder, H. and Radauer, C. 2004). Iz tog razloga mi smo izabrali ove proteine za razvoj unapređenog preparata za imunoterapiju. Često korišćena metoda za hemijsko modifikaciju alergena kako bi se umanjila njihova alergičnost, jeste umrežavanje alergena glutaraldehidom (Ceuppens, J. L., Bullens, D. et al. 2009). Međutim, ovo nije pogodan pristup za konglutin alergene, iz razloga što sadrže mali broj lizinskih ostataka (Lys). Zbog svega pomenutog, odabrali smo modifikaciju disulfidnih veza kao način za smanjenje alergičnog potencijala. Inicijalna ispitivanja na proteinu iz brazilskog oraha, koji je slične strukture kao i Ara h 2, pokazala su da ovaj pristup održava imunogenost dok je proteinska struktura narušena (Koppelman, S. J., Nieuwenhuizen, W. F. et al. 2005). Kod konglutin alergena iz kikirikija pokazano je da ovaj pristup smanjuje alergičnost (van der Kleij, H. P. M., Smit, J. et al. 2011; Starkl, P., Felix, F. et al. 2012).

S obzirom da se Ara h 2 izoforme i Ara h 6 razlikuju u strukturnoj stabilnosti, po broju IgE epitopa i broju disulfidnih veza, cilj našeg rada je bio da se ispita efekat hemijske modifikacije na individualnim izoformama, kao i kinetika ovih modifikacija.

Nakon redukovanja i alkilovanja, izoforme Ara h 2 i Ara h 6 alergena kikirikija pokazuju povećanje u prividnoj molekularnoj težini na SDS PAGE, kao i povećanje mase detektovane masenom spektrometrijom. Pokazali smo da do povećanja mase dolazi zbog alkilovanja 4 i 5 disulfida za Ara h 2 izoforme, kao i Ara h 6 protein, respektivno. Takođe, sve tri izoforme pokazuju promenu u sekundarnoj strukturi, tj. gubitak α -heliksa i profil razvijene strukture. Slični rezultati su pronađeni i kod redukovanog i alkilovanog Pru p 3 alergena iz breskve (Toda, M., Reese, G. et al. 2011), rekombinantnih Ara h 6 i Ara h 2 alergena (van der Kleij, H. P. M., Smit, J. et al. 2011; Hazebrouck, S., Guillon, B. et al. 2012), kao i Ber e 1 alergena iz brazilskog oraha (Koppelman, S. J., Nieuwenhuizen, W. F. et al. 2005), proteina koji pripadaju porodici 2S albumina sa strukturom stabilizovanom pomoću disulfidnih mostova. Ovaj gubitak α -heliksa ne dovodi samo do formiranja razvijene strukture, već i do povećanja β -pločica i β -zavojka, indukujući tranziciju α -heliks u β -pločice. *Maleki i saradnici* (2003)

su kod parcijalno redukovanog i pečenog Ara h 2 uočili smanjenje α -heliksa u korist porasta β -pločica, razvijene strukture i zavijutaka (Maleki, S. J., Viquez, O. et al. 2003). Ovo razvijanje proteina na nivou sekundarnih struktura je povezano sa preuređivanjem tercijarne strukture, koje je pokazano pomoću spektrofluorimetrijske metode. Ara h 6 alergen ne sadrži Trp, dok Ara h 2 izoforme sadrže po jedan Trp na poziciji 4, koji je prostorno odvojen od proteinskog jezgra (Lehmann, K., Schweimer, K. et al. 2006). Emisioni spektri Ara h 2 izoforme imaju emisioni maksimum na oko 350 nm, sugerišući da je Trp u polarnom okruženju. Samim tim, emisija Trp je slab indikator za razvijanje Ara h 2. Određeni dokazi o slabljenju tercijarne strukture mogu se naći u masenim spektrima i distribuciji naelektrisanja "roditeljskih" jona proteina. Modifikovani proteini sadrže veća naelektrisanja u masenim spektrima nego njihovi prirodni pandani, sugerišući razvijenu strukturu proteina nakon redukovanja i alkilovanja (Konijnenberg, A., Butterer, A. et al. 2013).

Rezultati ove studije su pokazali nastajanje intermedijernih produkata za sva tri proteina, sa jednim, dva, tri, četiri ili pet redukovanih disulfida, pod limitiranim uslovima modifikacije. Smanjivanjem koncentracije DTT 10 puta, pronašli smo da je samo jedan disulfid pogođen modifikacijom. Kako bi smo mapirali disulfide koji su ili u slobodnom ili u "polu-disulfidnom" obliku, koristili smo metodu peptidnog mapiranja. Rezultati su pokazali da ne postoji određeni disulfid koji prvi podleže redukovanju. Takođe smo uočili da dolazi do ekstenzivne promene intra-molekulskih disulfida, slično onima opisanih kod insulina (Morris, H. R., Pucci, P. et al. 1990). Cisteinski ostaci podlegli redukciji mogu da odreaguju sa drugim ostacima Cys na nasumičan način. Ova nespecifičnost reakcije nakon redukovanja pod limitiranim uslovima, ukazuje da je redosled redukovanja u velikoj meri nasumičan. Izmena disulfida je dobro poznat fenomen koji se javlja kod modifikovanih proteina i samim tim otežava karakterizaciju istih (Echterbille, J., Quinton, L. et al. 2013).

Iz gore navedenog vidi se značaj i važnost dobijanja kompletno modifikovanih izoformi Ara h 2 i Ara h 6 alergena iz kikirikija sa aspekta bezbednosti imunoterapije. Ovo se može postići primenom navedenih uslova kako bi se izbegla izmena disulfida. Poređenjem sa zlatnim standardom, umrežavanjem glutaraldehidom gde se formiraju

heterogeni agregati, u ovoj studiji razvijena metodologija redukovanja i alkilovanja rezultuje nastajanjem alergena koji se mogu okarakterisati na višem nivou.

Efekat razvijanja proteina , dobijen kompletnim redukovanjem i alkilovanjem, na alergnost je evaluirana metodom IgE vezivanja. Rezultati ukazuju da je za svaku izoformu alergnost proteina daleko umanjena u poređenju sa prirodnim. Ovo je i ranije pokazano na smeši konglutin izoformi (van der Kleij, H. P. M., Smit, J. et al. 2011; Starkl, P., Felix, F. et al. 2012). Štaviše, pokazano je i da je alergnost modifikovanih izoformi ostala kao i kod prirodnih izoformi, što je i ranije pokazano (Chen, X., Wang, Q. et al. 2013), gde je Ara h 2.02 izoforma pokazana kao najpotentija, zatim Ara h 2.01 i na kraju Ara h 6. Najveći efekat modifikacije je uočen kod Ara h 6 alergena. Moguće objašnjenje ovog rezultata leži u činjenici da Ara h 2 sadrži linearni IgE-vezujući epitop, tj. SQDPYSPSPY, koji nije prisutan u Ara h 6 alergenu (Stanley, J. S., King, N. et al. 1997). U svakom slučaju, rezultati pokazuju da IgE-vezivanje više zavisi od konformacionih epitopa nego od linearnih, jer je oko 99% IgE-vezivanja izgubljeno nakon procesa redukovanja i alkilovanja oba alergena.

U zaključku, naši rezultati pokazuju da izoforme Ara h 2 i Ara h 6 alergena kikirikija bivaju kompletno redukovane i alkilovane, što rezultira kompletnim narušavanjem sekundarne i tercijarne sturkture i gubitkom sposobnosti da vežu IgE iz seruma pacijenata alergičnih na Ara h 2 i Ara h 6. Korišćenjem limitiranih uslova modifikacije dolazi do izmene disulfida, koji dovode do stvaranja heterogenih intermedijarnih produkata koji su neželjeni u razvoju farmaceutskog produkta.

5. Karakterizacija alergeni peptida Ara h 2 i Ara h 6 alergena kikirikija dobijenih tripsinskom proteolizom

5.1. Uvod

Ara h 2 i Ara h 6 alergeni pripadaju familiju konglutina i spadaju u najvažnije alergene kikirikija (Koppelman, S. J., Wensing, M. et al. 2004). Pokazano je da u odnosu na druge alergene iz kikirikija, konglutin izoforme su veoma rezistentne na proteolizu u GI traktu, čak i nakon termalne obrade (Sen, M., Kopper, R. et al. 2002; Maleki, S. J., Viquez, O. et al. 2003; Suhr, M., Wicklein, D. et al. 2004; Koppelman, S. J., Hefle, S. L. et al. 2010; Hazebrouck, S., Guillon, B. et al. 2012). Ranije studije su pokazale da digestijom ovih proteina nastaju protelitički rezistentni peptidi (PRP) molekulske mase oko 10 kDa (Sen, M., Kopper, R. et al. 2002; Koppelman, S. J., Hefle, S. L. et al. 2010), bez obzira na tip GI proteaza.

Nedavno su alergeni kikirikija detektovani u majčinom mleku, sugerišući da bar jedan imunoreaktivni domen kikirikija ostaje intaktan tokom prolaska kroz intestinalnu barijeru i ulazi u cirkulaciju (Vadas, P., Wai, Y. et al. 2001; Bernard, H., Ah-Leung, S. et al. 2014). *Baumert i saradnici* (2009) su detektovali PRP Ara h 2 alergena u serumu pacijenta 24 h nakon unosa kikirikija, dok prisustvo intaktnog proteina nije pokazano (Baumert, J. L., Bush, R. K. et al. 2009). Da peptid nastao digestijom proteina, mogao da senzitivizuje mora biti minimalne mase 3-5 kDa (van Beresteijn, E. C., Meijer, R. J. et al. 1995). Takođe pokazano je da anafilaksa kod pacijenta nakon transfuzije krvi je izazvana pasivnim transferom alergena kikirikija prisutnog u krvi donatora (Jacobs, J. F., Baumert, J. L. et al. 2011), ukazujući na očuvanu *in vivo* funkciju alergena kikirikija u cirkulaciji.

Postoje limitirani podaci o sekvenci PRP i da oni zadržavaju svoju alergenost. Međutim većina ovih podataka je dobijeno iz studija na rekombinantnim proteinima.

Zbog toga cilj našeg istraživanja je bio da identifikujemo alergene peptide nakon digestije prirodnih konglutin izoformi, Ara h 2.02, Ara h 2.01 i Ara h 6, kako bi smo bolje razumeli prirodu i način predstavljanja epitopa u imunskom sistemu GI trakta i njihovu potencijalnu prisutnost u cirkulaciji.

5.2. Materijal i metode

5.2.1. Konglutin izoforme kikirikija i tripsin

Individualne konglutin izoforme kikirikija, Ara h 2.02, Ara h 2.01 i Ara h 6 su izolovane kao što je opisano u odeljku 5.2.1. Za digestiju je korišćen tripsin imobilizovan na magnetnim zrnima (Clone Tech Laboratories Inc., Kalifornija, SAD; kat #635646). Aktivnost tripsina je određena korišćenjem supstrata α -benzoil-L-Arg etil ester (BAEE, Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD; kat #B4500) po instrukciji proizvođača. Određena aktivnost imobilizovanog tripsina je bila 218 U/ml što ispunjava specifikaciju proizvođača (>150 U/ml). Aktivnost rastvorenog enzima je određena kako bi se izrazila koncentracija imobilizovanog tripsina u $\mu\text{g/ml}$. Specifična aktivnost rastvornog tripsina (Sigma-Aldrich, SAD; kat #T-1426 sa aktivnošću > 10000 U/mg) je određena i iznosi 9560 U/mg. Koristeći ovu specifičnu aktivnost dobili smo da aktivnost imobilizovanog tripsina od 218 U/ml odgovara koncentraciji od 22,8 $\mu\text{g/ml}$.

5.2.2. Digestija konglutin izoformi tripsinom

Prečišćeni Ara h 2.02, Ara h 2.01 i Ara h 6, kao i smeša Ara h 2 i Ara h 6 alergena su razblaženi 6,5 mM Tris HCl puferom pH 8,0 u finalnoj zapremini od 1 ml do koncentracije 0,5 mg/ml. U rastvor proteina je dodata suspenzija od 30 μl imobilizovanog tripsina, čija je finalna koncentracija 0,68 $\mu\text{g/ml}$. Uzorci su inkubirani na 37°C uz mešanje brzinom 1400 obrt/min u inkubator šejkeru. U različitim vremenskim periodima: 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 i 180 minuta uzimani su alikvoti i digestija je stopirana odvajanjem magnetnih zrna pomoću magnetnog stalka. Nulto vreme digestije, 0 minuta, predstavlja protein pripremljen pod istim uslovima za digestiju sa razlikom da nije bio u kontaktu sa imobilizovanim tripsinom. Osim za SDS PAGE za sve ostale analize su korišćeni peptidi dobijeni nakon 90 minuta digestije. Uzroci su analizirani na

SDS PAGE pod redukovanim uslovima na 12% Bis-Tris gradijentnim gelovima po preporuci proizvođača (BioRad, Herkules, Kalifornija, SAD). 2 µg peptida u zapremini od 8 µl je aplicirano po bunaru.

5.2.3. Spektroskopija cirkularnog dihroizma

Daleki ultra-ljubičasti CD spektri proteina i PRP su snimljeni na CD spektropolarimetru JASCO J-815 (JASCO, Tokio, Japan). Sistem je kalibrisan rastvorom amonijum D-10-kamforsulfonata kao što je opisano u poglavlju 5.2.5. Spektri uzoraka (500 µg/ml izoformi Ara h 2 i Ara h 6 alergena, kao i PRP koji potiču od iste količine alergena, u 6,5 mM Tris HCl puferu pH 8.0) su snimani na 20°C u dalekoj ultra-ljubičastoj oblasti (190-260 nm) u kiveti sa dužinom svetlosnog puta od 0,1 mm. Spektri su snimani u inkrementima od 0,1 nm brzinom 50 nm/min u atmosferi azota. Svaki spektar je snimljen po 5 puta u dva nezavisna eksperimenta i uzeta je njihova uprosečena vrednost.

5.2.4. Maseno spektrometrijska analiza

PRP su analizirani na EASY nLC II sistemu povezan sa LTQ Orbitrap XL (Thermo scientific, Waltham, Massachusetts, SAD), koji je prethodno kalibrisan ProteoMass™ LTQ/FT-Hybrid ESI Positive Mode Cal Mix (MSCAL5 SUPELCO, Sigma Aldrich). Uzorci su analizirani i nakon redukovanja i alkilovanja, opisanim u poglavlju 5. 0,1 µg uzoraka je apliciran na EasyColumn C18 kolonu (2 cm dužine, ID 100 µm i 3 µm prečnik čestica matriksa) i razdvojen na EasyColumn C18 koloni (10 cm dužine, ID 75 µm i 5 µm prečnik čestica matriksa). Kao eluent A korišćen je vodeni rastvor 0,1% mravlje kiseline, a kao eluent B 0,1% mravlja kiselina u acetonitrilu (MS čistoće, Sigma-Aldrich). Metoda eluiranja peptida je bila ista kao i u poglavlju 5.2.4 sa malim izmenama. Naime, uzorci su eluirani u LTQ sistem gradijentom eluenta B 5-95% u toku 50 min pri protoku od 300 nl/min. Sprej je generisan emiterom na čijem vrhu je voltaža podešena na 2,35 kV, kapilarna voltaža je bila 6 V sa kapilarnom temperaturom od 275°C. Visoko-rezolutni FTMS profilni spektar (raspon skeniranja od 300-3000 m/z, sa rezolutivnom moći od 60.000) je praćen koristeći Xcalibur softver (verzija 2.1) (Thermo scientific) sa tolerancijom prekursor jona od 10 ppm.

5.2.5. Identifikacija proteazno-rezistentnih peptida Ara h 2 izoformi i Ara h 6

Predviđanje sekvenci PRP je rađeno na osnovu egzaktnih masa dobijenih MS analizom i masa prirodnih izoformi dobijenih u poglavlju 5, koristeći kalkulator mase peptida (<http://pepcalc.com/>). Za određivanje teorijske mase u kalkulatoru peptida su korišćene aminokiselinske sekvence proteina objavljenih na Uniprot bazi podataka sa brojevima, Q6PSU2 i Q647G9 (računajući i konflikte u sekvenci). Pored toga u obzir su uzete i post-translacione modifikacije kao što je hidroksilacija na prolinu kod Ara h 2 proteina (Pro₆₇, Pro₇₄ and Pro₈₆), tj. dodatak masi za 48 ili 32 Da u zavisnosti od Ara h 2 izoforme. Dodatno, uzet je u obzir proces alkilovanja cisteinskih ostataka tj. dodatak masi za 57 Da po cisteinu. Za lociranje potencijalnih mesta cepanja tripsinom korišćen je ExPaSy PeptideCutter softver.

5.2.6. 2D PAGE i 2D IgE-imunoblot

Priprema uzorka za prvu i drugu dimenziju, kao i sama metoda, rađena je po proceduri opisanoj u poglavlju 4.2.5. 18,75µg/ml PRP je aplicirano po IPG tračici pH opsega 3-10NL i 4-7, dužina 7 i 13 cm. Gelovi su obojeni koloidnom bojom opisanom ranije (Candiano, G., Bruschi, M. et al. 2004). Obojeni gelovi su skenirani pomoću softvera Typhoon 7000 serije i analizirani pomoću 2D Master Platinum 7.0 softverom (GE Healthcare).

Kao dodatni eksperiment posle druge dimenzije peptidi sa 2D gela su transferovani na PVDF membranu (BioRad, SAD) po referenci (Towbin, H., Staehelin, T. et al. 1979). Nakon, transfera membrana je blokirana 1% BSA u PBS-T, 1 h na sobnoj temperaturi. Posle blokiranja, membrana je inkubirana preko noći sa serumom pacijenta alergičnih na kikiriki na 4 °C (razblaženje 1:5 u 0,1% BSA i PBS-T). Serum korišćen u ovoj studiji bio je pul od sedam pojedinačnih seruma dobijenih od pacijenata sa pokazanom alergijom na kikiriki (opseg IgE na kikiriki: 53-787 kU_A/l, srednja vrednost 254 kU_A/l, opseg IgE na Ara h 2: 27-317 kU_A/l, srednja vrednost 117 kU_A/l). Serum pacijenta sa dokazanom alergijom na korov je korišćen kao negativna kontrola. Nakon ispiranja, IgE vezivanje za peptide je detektovano kao što je opisano u poglavlju 4.2.3.

5.2.7. Inhibicija vezivanja IgE antitela ELISA testom

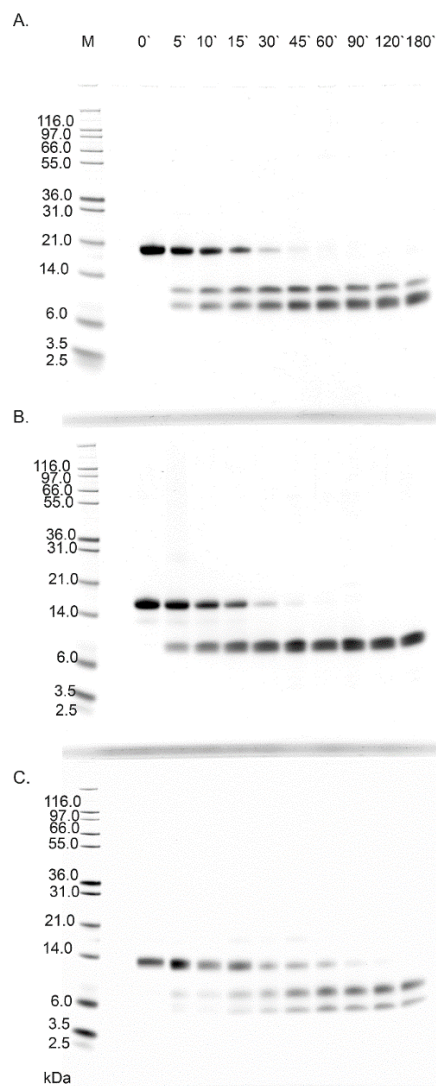
Eksperiment je urađen po protokolu opisanom u poglavlju 5.2.8.

5.3. Rezultati

5.3.1. Prolongirana digestija tripsinom daje stabilne peptide iz konglutin izoformi čije strukture nisu promenjene

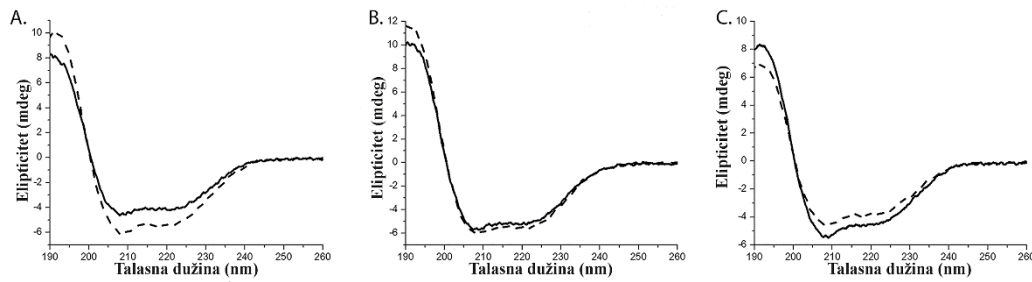
Konglutin izoforme kikirikija, Ara h 2 izoforme i Ara h 6 alergena su podvrgnute digestiji tripsinom. Na Slici 5.1. je prikazana SDS PAGE analiza digesta pod redukujućim uslovima, tokom različitih vremenskih intervala digestije. U prvom vremenskom intervalu, tačnije nakon 5 minuta digestije, za sve izoforme, uočeni su peptidi nastali proteolizom tripsina, mada većina proteina i dalje ostaje intaktna. Uočeno je da kod digestije Ara h 2.02 i Ara h 2.01 proteinska traka koja pripada intaktnom proteinu biva prisutna i nakon 45 minuta (Slika 5.1A i 5.1B). Kod Ara h 6 proteina uočena je inaktna proteinska traka do 90 minuta digestije (Slika 5.1C). Peptidi dobijeni digestijom ostaju stabilni do 180 min digestije. Naime, na osnovu SDS PAGE analize nije uočeno da dobijeni proteini bivaju dalje hidrolizovani.

Ono što je interesantno je da tokom digestije Ara h 2.02 proteina dolazi do stvaranja dve grupe PRP sa približnim masama oko 12 i 10 kDa, pri čemu se kod prolongirane digestije uočava da proteinska traka oko 10 kDa biva sve izraženija (Slika 5.1A). Nasuprot tome, peptidi dobijeni digestijom Ara h 2.01 imaju približnu masu oko 10 kDa, ali pažljivim posmatranjem mogu se uočiti zapravo dve trake koje ko-migriraju (Slika 5.1B). PRP nastali Ara h 6 digestijom postaju dominantniji od intaktnog nakon 15 min digestije, sa približnim molekulskim masama od 9 i 5 kDa. Ovi peptidi ostaju stabilni tokom celog perioda digestije (slika 5.1C).



Slika 5.1. SDS PAGE profil tripsinske digestije konglutin izoformi. A- Ara h 2.02; B- Ara h 2.01; C- Ara h 6; M- molekularni markeri.

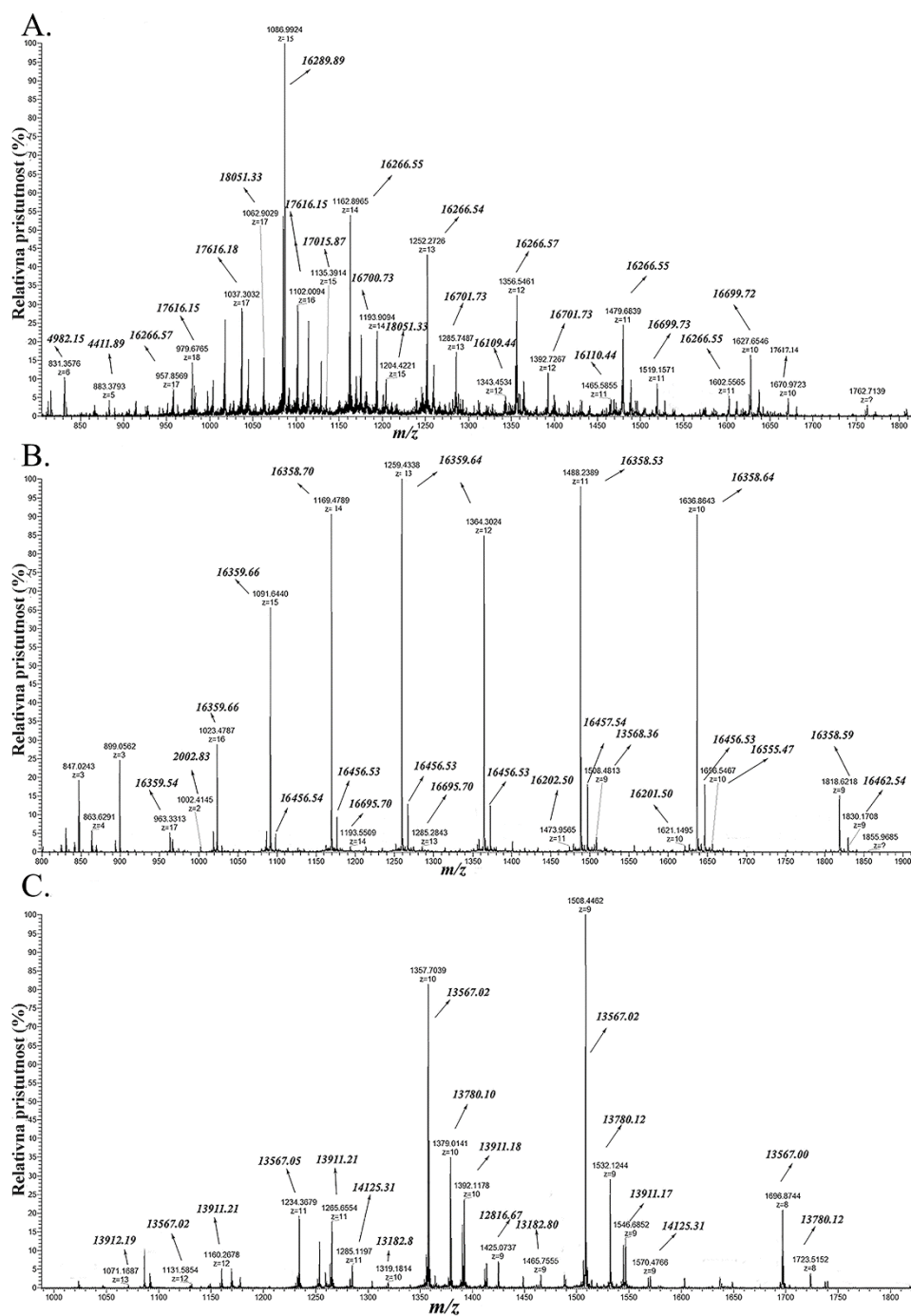
Snimanje dalekih ultra-ljubičastih CD spektara je rađeno kako bi smo bolje razumeli strukturne karakteristike PRP dobijenih nakon 90 min tripsinske digestije. CD spektri prirodnih alergena pokazuju, kao i u poglavlju 4.3.2, pravilno uvijene proteine sa visokim sadržajem α -heliksa (slika 5.2). Snimljeni CD spektri PRP (isprekidana linija na slici 5.2.) sadrže isti oblik kao prirodni proteini - minimume na 208 i 220 nm, kao i porast elepticiteta niže od 200 nm, samim tim potvrđujući da nakon digestije nije došlo do primetne promene u sekundarnoj strukturi proteina.



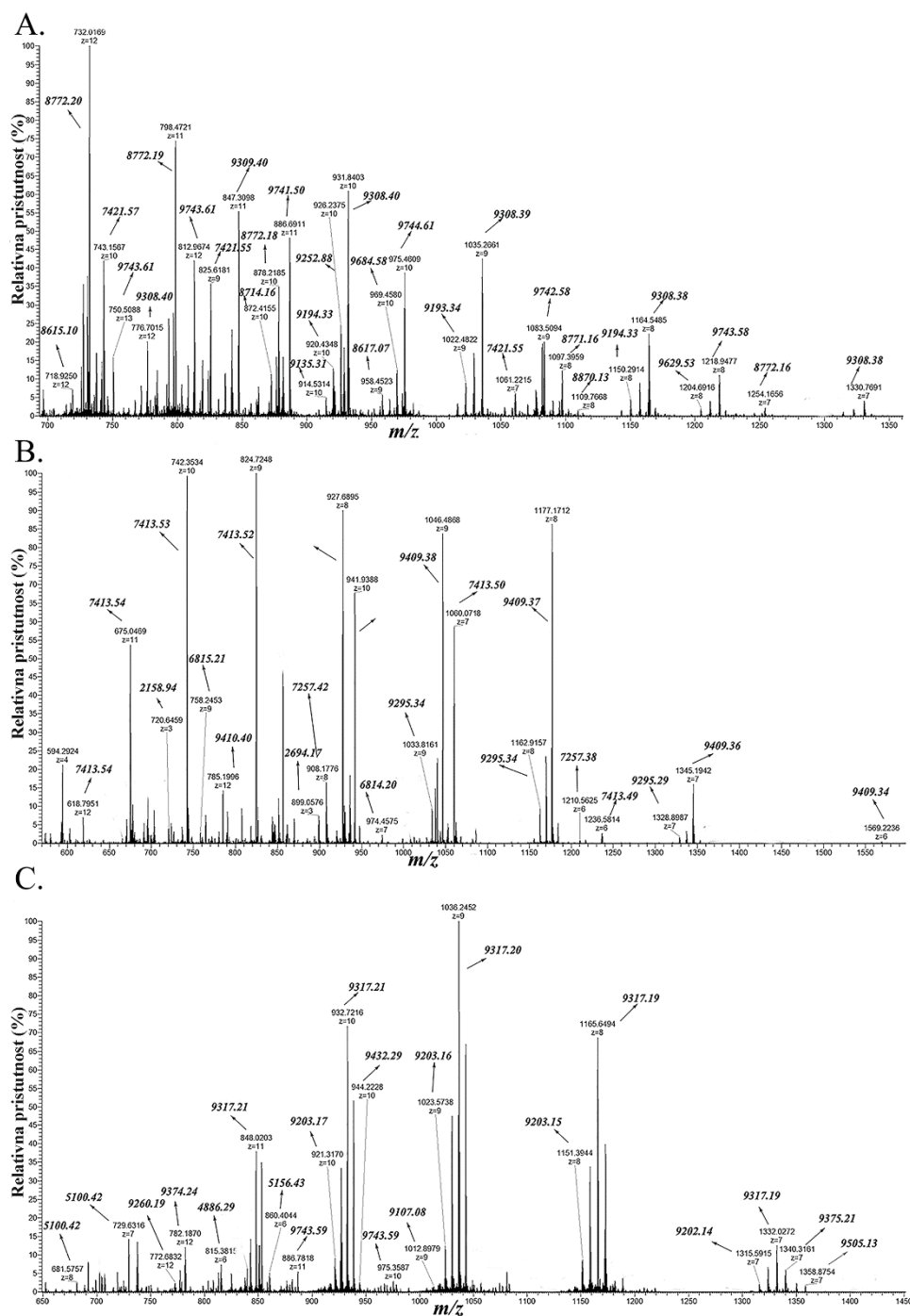
Slika 5.2. CD spektri PRP-a (isprekidana linija) uporedo sa prirodnim prečišćenim proteinima (puna linija). A- Ara h 2.02; B- Ara h 2.01; C- Ara h 6.

5.3.2. Identifikacija sekvenci peptida dobijenih digestijom

Maseni spektri visoke rezolucije peptida dobijenih tripsinskom digestijom su snimljeni pre i nakon njihovog redukovanja i alkilovanja. Slike 5.3 i 5.4. predstavljaju ESI MS spektre neredukovanih (Slika 5.3. paneli A do C) i redukovano-alkilovanih (Slika 5.4. paneli A do C) peptida, respektivno. Kod neredukovanih PRP uočen je širok opseg m/z jona sa velikim naelektrisanjima (+8 do +17), koji predstavljaju mase > 13 kDa. Pored jona sa velikim naelektrisanjima, ovi spektri sadrže i jone sa manjim naelektrisanjima (od +2 do +6) koji predstavljaju mase < 5 kDa. Maseni spektri redukovano-alkilovanih peptida sadrže opseg jona sa naelektrisanjima od +4 do +12, i masama od 2,2-10 kDa. Ono što se može uočiti u ovim spektrima jeste da nekoliko jona poseduje isto naelektrisanje, čija je razlika u masama za 57 Da. Ovo potiče od delimične alkilacije cisteina koje je opisano u poglavlju 4. Tabela 5.1. sadrži sve pronađene mase PRP, pre i nakon redukovanja i alkilovanja.



Slika 5.3. ESI MS spektri nemodifikovanih PRP-a. A- Ara h 2.02; B- Ara h 2.01; C- Ara h 6.



Slika 5.4. ESI MS spektri redukovano-alkilovanih PRP-a. A- Ara h 2.02; B- Ara h 2.01; C- Ara h 6.

Digestijom Ara h 2.02 i Ara h 2.01 alergena dobijaju se PRP molekulske mase od 16,2-17,6 kDa, kao i neki mali peptidi od 2-4 kDa (Tabela 5.1.). PRP Ara h 6 imaju molekulske mase od 13,5-14,1 kDa. Uzimajući u obzir dodatak mase od 32 ili 48 Da za hidroksilaciju prolina kod Ara h 2 izoformi, kao i kombinujući mase neredukovanih i

redukovano-alkilovanih peptida uspeli smo da povežemo eksperimentalno određene mase sa teorijskim masama peptida, samim tim da identifikujemo sekvence ovih peptida.

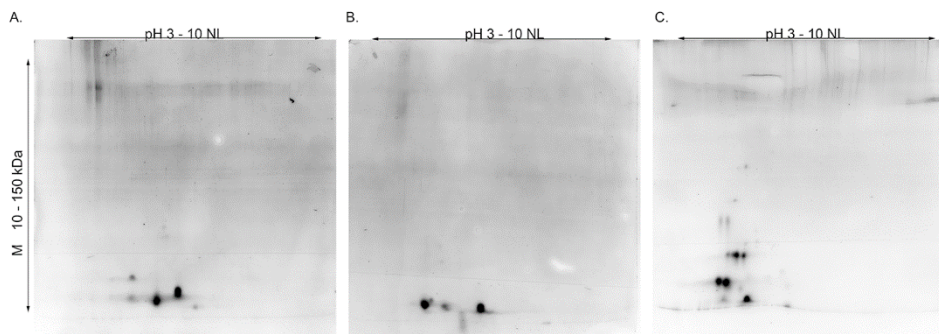
Tabela. 5.1. Dobijene mase peptida rezistentnih na digestiju.

PRP	Masa peptide (Da)	pI	Modifikacije					Izračunata masa (Da)	Eksperimentalna masa
			H ₂ O ^{a)}	Disulfidna veza	Alkil grupa	Hidroksilacija prolina	Koflikt u sekvenci		
Ara h 2.02									
a	17993,69	5,36	+18	-8	0	+48	0	18051,69	18051,33
b	17559,24	5,35	+18	-8	0	+48	0	17617,24	17617,14
c	16659,28	5,34	+18	-8	0	+32	0	16701,28	16700,72
d	16224,82	5,33	+18	-8	0	+32	0	16266,82	16266,55
e	16068,64	5,1	+18	-8	0	+32	0	16110,64	16110,44
f	3541,67	4,17	0	0	0	+48	0	3589,67	3589,57
g	3030,04	3,79	0	0	0	+32	0	3062,04	3061,28
h	4364,46	4,01	0	0	0	+48	0	4412,46	4411,90
Ara h 2.02 redukovani i alkilovani									
i	9401,39	5,2	0	0	+342	0	0	9743,39	9743,58
i	9401,39	5,2	0	-2	+285	0	0	9684,39	9684,58
i	9401,39	5,2	0	0	+228	0	0	9629,39	9629,53
j	8966,94	5,18	0	0	+342	0	0	9308,94	9308,38
j	8966,94	5,18	0	0	+285	0	0	9251,94	9252,88
j	8966,94	5,18	0	0	+228	0	0	9194,94	9194,35
j	8966,94	5,18	0	-2	+171	0	0	9135,94	9135,31
k	8610,31	5,64	0	0	+114	+48	0	8772,31	8772,16
k	8610,31	5,64	0	0	+57	+48	0	8715,31	8714,16
l	8454,13	5,05	0	0	+114	+48	0	8616,13	8615,10
m	7275,9	5,61	0	0	+114	+32	0	7421,90	7421,57

Ara h 2.01									
a	16579,23	5,67	0	-8	0	+32	+92	16695,23	16695,72
b	16423,04	5,33	+18	-8	0	+32	+92	16557,04	16555,50
b	16423,04	5,33	0	-8	0	+32	+14	16461,04	16462,54
c	16416,06	5,67	+18	-8	0	+32	0	16458,06	16456,54
d	16259,87	5,1	+18	-8	0	+32	+58	16359,87	16359,54
e	16103,68	5,1	+18	-8	0	+32	+58	16203,68	16202,52
f	1971,03	3,59	0	0	0	+32	0	2003,03	2002,83
Ara h 2.01 redukovani i alkilovani									
g	9238,21	5,73	0	0	+171	0	0	9409,21	9409,40
g	9238,21	5,73	0	0	+114	0	0	9352,21	9352,31
g	9238,21	5,73	0	0	+57	0	0	9295,21	9295,29
g	9238,21	5,73	0	0	0	0	0	9238,21	9238,31
h	7195,86	7,02	0	0	+171	+32	+14	7412,86	7413,49
i	7039,67	5,59	0	0	+171	+32	+14	7256,67	7257,43
j	2127,21	4,17	0	0	0	+32	0	2159,21	2158,94
Ara h 6									
a	14116,86	4,83	+18	-10	0	0	0	14124,86	14125,29
b	13903,62	4,68	+18	-10	0	0	0	13911,62	13911,17
c	13772,49	4,68	+18	-10	0	0	0	13780,49	13780,12
d	13559,25	4,55	+18	-10	0	0	0	13567,25	13567,02
Ara h 6 redukovani i alkilovani									
e	9148,37	4,78	0	-2	+285	0	0	9431,37	9432,23
e	9148,37	4,78	0	-2	+228	0	0	9374,37	9374,24
e	9148,37	4,78	0	-2	+171	0	0	9317,17	9317,22
e	9148,37	4,78	0	-2	+114	0	0	9260,37	9260,19
e	9148,37	4,78	0	-2	+57	0	0	9203,37	9203,17
f	5330,88	5,56	0	0	+171	0	0	5501,88	5501,62

f	5330,88	4,9	0	0	+114	0	0	5444,88	5444,59
g	5117,64	4,9	0	0	+171	0	0	5288,64	5288,50
g	5117,64	4,9	0	0	+114	0	0	5231,64	5231,47
h	4986,51	4,9	0	0	+228	0	0	5214,51	5214,47
h	4986,51	4,9	0	0	+171	0	0	5157,51	5157,45
h	4986,51	4,9	0	0	+114	0	0	5100,51	5100,43
i	4773,27	4,55	0	0	+171	0	0	4944,27	4943,47
i	4773,27	4,55	0	0	+114	0	0	4887,27	4886,29
i	4773,27	4,55	0	0	+57	0	0	4830,27	4829,27

Pored toga, uradili smo visoko rezolitivne 2D PAGE peptida dobijenih digestijom pojedinačnih izoformi konglutina (slika 5.5.), koje smo iskoristili za verifikaciju identifikovanih peptida po pI vrednostima. Slika 5.6. daje pregled sekvenci identifikovanih PRP-a iz sve tri izoforme.



Slika 5.5. 2D PAGE PRP-a iz pojedinačnih konglutin izoformi. A- Ara h 2.02; B- Ara h 2.01; C- Ara h 6.

Ono što smo detektovali kod PRP jeste hidroliza jedne peptidne veze unutar peptida (Slika 5.6. Panel A - Ara h 2.02, peptidi a i b; Panel B - Ara h 2.01, peptidi b, c, d i e; Panel C - Ara h 6, peptidi a i b), od koje nakon redukovanja disulfidnih veza dolazi do nastajanja dva peptida molekulskih masa 7,2-9,7 kDa kod Ara h 2 izoformi i 4,8-9,4 kDa kod Ara h 6. Isto tako smo primetili da peptidi kod Ara h 2 izoforme podležu proteolitičkoj obradi C-terminusa. Takođe smo primetili da peptidi imaju hidrolizovani kratki segment ($S_{48}TR_{50}$ u Ara h 6 i $D_{61}PYSPSPYDRR_{71}$ u Ara h 2.02), koji se nalazi unutar PRP čiji su disulfidni mostovi očuvani. Naime, mesta koja su najviše sklona hidrolizi od strane tripsina su N- i C-terminalni segmenti, kao i limitirani delovi unutar proteina.

Evidentno za sve tri izoforme konglutina iz kikirikija jeste da je glavno mesto cepanja unutar sekvence proteina od strane tripsina strukturno identično ($R_{59}|R_{60}|D_{61}PYSPSPYDR_{71}|D_{72}$ u Ara h 2.02, $R_{58}|R_{59}|G_{60}$ u Ara h 2.01 i $R_{47}|S_{48}TR_{50}|S_{51}$ u Ara h 6). Ovi delovi se nalaze u proteinskoj petlji koja je slobodno dostupna tripsinu.

A

Ara h 2.02

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	
a:	R ₁ QDELQGR	ROQSLEKAR	LAPCEQILMQ	KIQREDSTG	RD42FTSPSQDF	YSPSQDFDR _{R1} D ₁ FTSPFTDR	R ₁ Q ₁ AGSSQIQE	RCCKELNEFE	NNQRCMCEAL	QQIMENQSDR	LQGRQEQDF	KRELNLFPQ	CGLRAFPQCD	LEVESGGR ₁₃₁	Y	
b:	R ₁ QDELQGR	ROQSLEKAR	LAPCEQILMQ	KIQREDSTG	RDFTSPSQDF	YSPSQDFDR	DFTSPFTDR	R ₁ Q ₁ AGSSQIQE	RCCKELNEFE	NNQRCMCEAL	QQIMENQSDR	LQGRQEQDF	KRELNLFPQ	CGLRAFPQCD	LEVESGGR ₁₃₁	Y
c:	R ₁ QDELQGR	ROQSLEKAR	LAPCEQILMQ	KIQREDSTG	RDFTSPSQDF	YSPSQDFDR _{R1} --DFTSPFTDR	R ₁ Q ₁ --GAGSSQIQE	RCCKELNEFE	NNQRCMCEAL	QQIMENQSDR	LQGRQEQDF	KRELNLFPQ	CGLRAFPQCD	LEVESGGR	Y	
d:	R ₁ QDELQGR	ROQSLEKAR	LAPCEQILMQ	KIQREDSTG	RDFTSPSQDF	YSPSQDFDR _{R1} --DFTSPFTDR	R ₁ Q ₁ --GAGSSQIQE	RCCKELNEFE	NNQRCMCEAL	QQIMENQSDR	LQGRQEQDF	KRELNLFPQ	CGLRAFPQCD	LEVESGGR ₁₃₁ --DR	Y	
e:	R ₁ --Q ₁ DELQGR	ROQSLEKAR	LAPCEQILMQ	KIQREDSTG	RDFTSPSQDF	YSPSQDFDR _{R1} --DFTSPFTDR	R--Q ₁ AGSSQIQE	RCCKELNEFE	NNQRCMCEAL	QQIMENQSDR	LQGRQEQDF	KRELNLFPQ	CGLRAFPQCD	LEVESGGR ₁₃₁ --DR	Y	
f:	RQDELQGR	ROQSLEKAR	LAPCEQILMQ	KIQREDSTG	R--D ₁ FTSPSQDF	YSPSQDFDR	DFTSPFTDR	R ₁ Q ₁ --GAGSSQIQE	RCCKELNEFE	NNQRCMCEAL	QQIMENQSDR	LQGRQEQDF	KRELNLFPQ	CGLRAFPQCD	LEVESGGR	Y
g:	RQDELQGR	ROQSLEKAR	LAPCEQILMQ	KIQREDSTG	RDFTSPSQDF	YSPSQDFDR _{R1} --DFTSPFTDR	AGSSQIQE	RCCKELNEFE	NNQRCMCEAL	QQIMENQSDR	LQGRQEQDF	KRELNLFPQ	CGLRAFPQCD	LEVESGGR	Y	
h:	RQDELQGR	ROQSLEKAR	LAPCEQILMQ	KIQREDSTG	RDFTSPSQDF	YSPSQDFDR	DFTSPFTDR	R ₁ Q ₁ --GAGSSQIQE	RCCKELNEFE	NNQRCMCEAL	QQIMENQSDR	LQGRQEQDF	KRELNLFPQ	CGLRAFPQCD	LEVESGGR	Y
i:	RQDELQGR	ROQSLEKAR	LAPCEQILMQ	KIQREDSTG	RDFTSPSQDF	YSPSQDFDR	DFTSPFTDR	R--Q ₁ AGSSQIQE	RCCKELNEFE	NNQRCMCEAL	QQIMENQSDR	LQGRQEQDF	KRELNLFPQ	CGLRAFPQCD	EYESGGR	Y
j:	RQDELQGR	ROQSLEKAR	LAPCEQILMQ	KIQREDSTG	RDFTSPSQDF	YSPSQDFDR	DFTSPFTDR	R--Q ₁ AGSSQIQE	RCCKELNEFE	NNQRCMCEAL	QQIMENQSDR	LQGRQEQDF	KRELNLFPQ	CGLRAFPQCD	LEVESGGR ₁₃₁ --DR	Y
k:	R ₁ QDELQGR	ROQSLEKAR	LAPCEQILMQ	KIQREDSTG	RDFTSPSQDF	YSPSQDFDR	DFTSPFTDR	R ₁ Q ₁ --GAGSSQIQE	RCCKELNEFE	NNQRCMCEAL	QQIMENQSDR	LQGRQEQDF	KRELNLFPQ	CGLRAFPQCD	LEVESGGR	Y
l:	R ₁ --Q ₁ DELQGR	ROQSLEKAR	LAPCEQILMQ	KIQREDSTG	RDFTSPSQDF	YSPSQDFDR	DFTSPFTDR	R ₁ Q ₁ --GAGSSQIQE	RCCKELNEFE	NNQRCMCEAL	QQIMENQSDR	LQGRQEQDF	KRELNLFPQ	CGLRAFPQCD	LEVESGGR	Y
m:	R ₁ QDELQGR	ROQSLEKAR	LAPCEQILMQ	KIQREDSTG	RDFTSPSQDF	YSPSQDFDR _{R1} --DFTSPFTDR	AGSSQIQE	RCCKELNEFE	NNQRCMCEAL	QQIMENQSDR	LQGRQEQDF	KRELNLFPQ	CGLRAFPQCD	LEVESGGR	Y	

B.

Ara h 2.01

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	
a:	R ₁ QDELQGR	ROQSLEKAR	LAPCEQILMQ	KIQREDSTG	RD ₁ FTSPSQDF	YSPFTDR _{R1} R ₁	AGSSQIQERC	CNELNEFEN	QRCMCEALQQ	IMENQSDRIQ	GRQEQDFR	ELANLPQQG	LRAFPQCDLE	VESSGR ₁₃₁ Y
b:	R--Q ₁ DELQGR	ROQSLEKAR	LAPCEQILMQ	KIQREDSTG	RDFTSPSQDF	YSPFTDRG	AGSSQIQERC	CNELNEFEN	QRCMCEALQQ	IMENQSDRIQ	GRQEQDFR	ELANLPQQG	LRAFPQCDLE	VESSGR ₁₃₁ Y
c:	R ₁ QDELQGR	ROQSLEKAR	LAPCEQILMQ	KIQREDSTG	RDFTSPSQDF	YSPFTDRG	AGSSQIQERC	CNELNEFEN	QRCMCEALQQ	IMENQSDRIQ	GRQEQDFR	ELANLPQQG	LRAFPQCDLE	VESSGR ₁₃₁ --Y
d:	R ₁ QDELQGR	ROQSLEKAR	LAPCEQILMQ	KIQREDSTG	RDFTSPSQDF	YSPFTDRG	AGSSQIQERC	CNELNEFEN	QRCMCEALQQ	IMENQSDRIQ	GRQEQDFR	ELANLPQQG	LRAFPQCDLE	VESSGR ₁₃₁ --RY
e:	R--Q ₁ DELQGR	ROQSLEKAR	LAPCEQILMQ	KIQREDSTG	RDFTSPSQDF	YSPFTDRG	AGSSQIQERC	CNELNEFEN	QRCMCEALQQ	IMENQSDRIQ	GRQEQDFR	ELANLPQQG	LRAFPQCDLE	VESSGR ₁₃₁ --RY
f:	RQDELQGR	ROQSLEKAR	LAPCEQILMQ	KIQREDSTG	R--D ₁ FTSPSQDF	YSPFTDR _{R1} --G	AGSSQIQERC	CNELNEFEN	QRCMCEALQQ	IMENQSDRIQ	GRQEQDFR	ELANLPQQG	LRAFPQCDLE	VESSGR ₁₃₁ Y
g:	RQDELQGR	ROQSLEKAR	LAPCEQILMQ	KIQREDSTG	RDFTSPSQDF	YSPFTDR _{R1} --G	AGSSQIQERC	CNELNEFEN	QRCMCEALQQ	IMENQSDRIQ	GRQEQDFR	ELANLPQQG	LRAFPQCDLE	VESSGR ₁₃₁ --Y
h:	R ₁ QDELQGR	ROQSLEKAR	LAPCEQILMQ	KIQREDSTG	RDFTSPSQDF	YSPFTDR _{R1} --G	AGSSQIQERC	CNELNEFEN	QRCMCEALQQ	IMENQSDRIQ	GRQEQDFR	ELANLPQQG	LRAFPQCDLE	VESSGR ₁₃₁ Y
i:	R--Q ₁ DELQGR	ROQSLEKAR	LAPCEQILMQ	KIQREDSTG	RDFTSPSQDF	YSPFTDR _{R1} --G	AGSSQIQERC	CNELNEFEN	QRCMCEALQQ	IMENQSDRIQ	GRQEQDFR	ELANLPQQG	LRAFPQCDLE	VESSGR ₁₃₁ Y
j:	RQDELQGR	ROQSLEKAR	LAPCEQILMQ	KIQREDSTG	R--D ₁ FTSPSQDF	YSPFTDR _{R1} --G	AGSSQIQERC	CNELNEFEN	QRCMCEALQQ	IMENQSDRIQ	GRQEQDFR	ELANLPQQG	LRAFPQCDLE	VESSGR ₁₃₁ Y

C.

Ara h 6

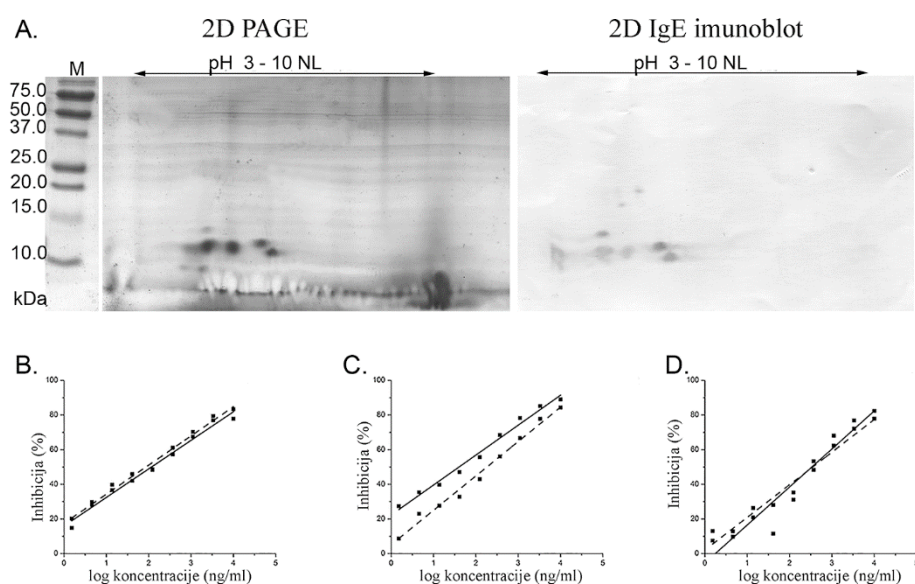
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	
a:	MRER ₁ --Q ₁ GD	SSSCERQVDR	VNLKPCQGH	MQRIMGQEQ	YDSDIRSTR	SSDQQRCCD	ELNEMNTQR	CMCEALQQIM	ENQCDRLGR	QMVQFKREL	MNLPGQCNFR	AFQCDLQVS	GGRC
b:	MRER ₁ --Q ₁ GD	SSSCERQVDR	VNLKPCQGH	MQRIMGQEQ	YDSDIRSTR	SSDQQRCCD	ELNEMNTQR	CMCEALQQIM	ENQCDRLGR	QMVQFKREL	MNLPGQCNFR	AFQCDLQVS	GGRC
c:	MRER ₁ --Q ₁ GD	SSSCERQVDR	VNLKPCQGH	MQRIMGQEQ	YDSDIR _{R1} --S ₁ TR ₁ --S ₁	SSDQQRCCD	ELNEMNTQR	CMCEALQQIM	ENQCDRLGR	QMVQFKREL	MNLPGQCNFR	AFQCDLQVS	GGRC
d:	MRER ₁ --Q ₁ GD	SSSCERQVDR	VNLKPCQGH	MQRIMGQEQ	YDSDIR _{R1} --S ₁ TR ₁ --S ₁	SSDQQRCCD	ELNEMNTQR	CMCEALQQIM	ENQCDRLGR	QMVQFKREL	MNLPGQCNFR	AFQCDLQVS	GGRC
e:	MRER ₁ --Q ₁ GD	SSSCERQVDR	VNLKPCQGH	MQRIMGQEQ	YDSDIR _{R1} --S ₁ TR ₁ --S ₁	SSDQQRCCD	ELNEMNTQR	CMCEALQQIM	ENQCDRLGR	QMVQFKREL	MNLPGQCNFR	AFQCDLQVS	GGRC
f:	MRER ₁ --Q ₁ GD	SSSCERQVDR	VNLKPCQGH	MQRIMGQEQ	YDSDIRSTR _{R1} --	SSDQQRCCD	ELNEMNTQR	CMCEALQQIM	ENQCDRLGR	QMVQFKREL	MNLPGQCNFR	AFQCDLQVS	GGRC
g:	MRER ₁ --Q ₁ GD	SSSCERQVDR	VNLKPCQGH	MQRIMGQEQ	YDSDIRSTR _{R1} --	SSDQQRCCD	ELNEMNTQR	CMCEALQQIM	ENQCDRLGR	QMVQFKREL	MNLPGQCNFR	AFQCDLQVS	GGRC
h:	MRER ₁ --G ₁ GD	SSSCERQVDR	VNLKPCQGH	MQRIMGQEQ	YDSDIR _{R1} --STR	SSDQQRCCD	ELNEMNTQR	CMCEALQQIM	ENQCDRLGR	QMVQFKREL	MNLPGQCNFR	AFQCDLQVS	GGRC
i:	MRER ₁ --Q ₁ GD	SSSCERQVDR	VNLKPCQGH	MQRIMGQEQ	YDSDIR _{R1} --STR	SSDQQRCCD	ELNEMNTQR	CMCEALQQIM	ENQCDRLGR	QMVQFKREL	MNLPGQCNFR	AFQCDLQVS	GGRC

Slika 5.6. Sekvence identifikovanih PRP-a (crna slova). A- Ara h 2.02; B- Ara h 2.01; C- Ara h 6.

5.3.3. Proteazno-rezistentni peptidi imaju sposobnost IgE-vezivanja kao i prirodne konglutin izoforme

Vezivanje IgE antitela za peptide dobijene tripsiniskom digestijom konglutin izoformi, Ara h 2 i Ara h 6, je prvo ispitivano pomoću 2D IgE imunoblota sa pulom seruma koji sadrži 117 kU_A/l IgE za Ara h 2. Uočili smo da svi peptidi osim onih < 10 kDa imaju sposobnost da vežu IgE iz seruma (Slika 5.7A). Kako bi smo odredili koliko su ovi peptidi potentni urađena je IgE inhibitorna ELISA. Na Slici 5.7. nalazi se tipičan

primer inhibicije Ara h 2.02 (panel B), Ara h 2.01 (panel C) i Ara h 6 (panel D) proteina, kao i njihovih peptida. Kod Ara h 2.01 i Ara h 6 peptida uočeno je praktično preklapanje inhibitornih kriva sa krivama intaktnih alergena. Kod Ara h 2.01 postoji mala razlika u većim koncentracijama, što ukazuje na manju IgE potentnost. Iz tri različita eksperimenta izračunata je srednja vrednost IC_{50} i određeno je koliko puta je povećan alergeni potencijal između PRP i njihovih intaktnih alergena. Za Ara h 2.02, Ara h 2.01 i Ara h 6 stepen povećanja je bio $0,8 (\pm 0,4)$, $1,4 (\pm 1,4)$ i $1,5 (\pm 0,6)$, respektivno. Ovo povećanje je blizu faktora 1 što ukazuje da tripsinoliza konglutina izoformi nema uticaj na njihovu alergenu potentnost.



Slika 5.7. IgE-vezujuće osobine PRP-a. A- 2D PAGE i 2D IgE imunoblot PRP-a iz smeše konglutin izoformi; B- IgE-vezujuće osobine Ara h 2.02 (puna linija) u poređenju sa PRP-ima (isprekidana linija) iz Ara h 2.02; C- IgE-vezujuće osobine Ara h 2.01 (puna linija) u poređenju sa PRP-ima iz Ara h 2.01 (isprekidana linija); D- IgE-vezujuće osobine Ara h 6 (puna linija) u poređenju sa PRP-ima iz Ara h 6 (isprekidana linija).

5.4. Diskusija

Poznato je da su konglutin izoforme kikirikija, Ara h 2 i Ara h 6, otporne na proteolizu pepsinom pod kiselim uslovima želudačnog soka (Astwood, J. D., Leach, J. N. et al. 1996; Suhr, M., Wicklein, D. et al. 2004; Koppelman, S. J., Hefle, S. L. et al. 2010), ali i na proteolizu enzima iz intestinalnog trakta, tripsina i himotripsina (Sen, M., Kopper, R. et al. 2002; Lehmann, K., Schweimer, K. et al. 2006; Koppelman, S. J., Hefle, S. L. et al. 2010). Iako na ovim proteinima postoji više potencijalnih mesta hidrolize peptidne veze tripsinom nego pepsinom, digestija sa samo jednom ili obe proteaze daje peptide rezistentne na dalju proteolizu, molekulskih masa sličnih nativnim proteinima. Ovo ukazuje da su mesta cepanja ovim proteazama određena drugim faktorima, a ne samo proteaznom specifičnošću. Tako su *Sen i saradnici* (2002) na Ara h 2 proteinu pokazali da struktura proteina i disulfidne veze u njemu imaju ključnu ulogu u dostupnosti mesta za proteolizu, tj. pristupačnosti proteaza koje vrše hidrolizu peptidne veze (Sen, M., Kopper, R. et al. 2002). Pokazano je da tačkastim mutacijama na kodirajućem mestu za cistein (Hazebrouck, S., Guillon, B. et al. 2012), ili redukovanjem disulfidnih mostova, kao što smo i pokazali u poglavlju 4., konglutin izoforme gube stabilnu α -helikoidnu strukturu i postaju više podložne dejstvu GI proteaza (Sen, M., Kopper, R. et al. 2002; Lehmann, K., Schweimer, K. et al. 2006; Hazebrouck, S., Guillon, B. et al. 2012).

U ovoj studiji su dobijeni protelitički rezistentni peptidi masa malo manjih od prirodnih alergena, koji pod redukujućim uslovima imaju mase opsega 5-10 kDa. Ovi proteinski fragmenti ostaju stabilni i nakon 180 min digestije. Prisustvo većih peptida od 10 kDa je u skladu sa prethodnim rezultatima *Lehman i saradnika* (2006), koji su pokazali da C-terminalni deo proteina ostaje u sklopu većeg peptida, dok N-terminus pripada nešto manjem peptidu (Lehmann, K., Schweimer, K. et al. 2006). Pod neredukujućim uslovima delovi N- i C-terminusa proteina su u peptidu povezani disulfidnim mostovima.

Danas postoje limitirani podaci o aminokiselinskoj sekvenci ovih peptida. Kako bi ih detaljnije identifikovali, ovi peptidi su analizirani, pre i nakon redukovanja i alkilovanja, pomoću tačne hromatografije kuplovane za masenu spektrometriju. Za neke

PRP smo opisali detaljne sekvence čiji su N-terminusi već publikovani i određeni pomoću Edmandove degradacije (Sen, M., Kopper, R. et al. 2002; Koppelman, S. J., Hefle, S. L. et al. 2010). Određivanjem egzaktnih masa pomoću MS, uspeali smo da identifikujemo nekoliko dodatnih PRP i da rasvetlimo njihove aminokiselinske sekvence. Pokazali smo da, kod sve tri konglutin izoforme, pored cepanja N-terminalnog dela, javlja se i heterogenost tokom digestije. Ovo je u saglasnosti sa objavljenim 3D modelom za Ara h 6 i super-pozicioniranim Ara h 2, potvrđujući da se region najveće heterogenosti nalazi u nestruktuiranom delu proteina, tačnije u N- i C- terminalnom, kao i u središnjem delu sekvence (Lehmann, K., Schweimer, K. et al. 2006). Kod Ara h 2.02 i Ara 2.01 pronašli smo peptide koji su oslobođeni iz središnjeg dela sekvence. Veličina peptida, odgovara veličini petlje koja se nalazi van struktuiranog dela proteina i koja je kod Ara h 2.02 veća nego kod Ara h 2.01. Kod Ara h 6 peptidi iz ovog dela nisu nađeni, verovatno jer je ova petlja kod datog proteina jako mala, kao i iz razloga što ne poseduje tripsinsko mesto cepanja. Ova hipoteza je podržana našim rezultatima koji ukazuju da veći C-terminalni deo proteina, kao i manji N-terminalni deo, imaju hidrolizovane unutrašnje krajeve, zbog kojih ova dva peptida bivaju razdvojena nakon redukovanja. Rezultati su u saglasnosti sa objavljenim podacima, gde su pomoću MALDI MS analize pronađene velika i mala subjedinica molekulskih masa 10 i 5 kDa, koje nastale tripsinolizom Ara h 6 proteina (Hazebrouck, S., Guillon, B. et al. 2012). Pored toga, potvrdili smo mesta cepanja tripsinom na Arg₅-Gly₆, Arg₇-Gln₈ i Arg₄₇-Ser₄₈. Pokazano je da veći segment PRP počinje sa Ser₄₈, mali segment sa Gly₆ ili Gln₈, kao i da su veliki i mali segment povezani disulfidnim mostovima Cys₁₄-Cys₇₁ i Cys₂₆-Cys₅₈ (Hazebrouck, S., Guillon, B. et al. 2012). Pored toga, mi smo pronašli heterogenosti PRP iz Ara h 6 alergena. Kod PRP iz Ara h 2 izoformi pronašli smo hidrolizovane N- i C- terminalne krajeve, mada je već pokazano ranije da Ara h 2 može da podleže postranslacionoj obradi u samoj biljci (Radosavljevic, J., Dobrijevic, D. et al. 2010), pa ne možemo da isključimo da se to desilo sa našim prečišćenim proteinima.

Kod Ara h 2 i Ara h 6 proteina, veliki broj potencijalnih mesta hidrolize tripsinom se nalaze u blizini cisteina. Vrlo je verovatno da, zbog takve lokacije, ova mesta nisu dostupna aktivnom mestu tripsina. Prisustvo sternih smetnji od disulfidnih mostova i njihova lokacija u kompaktno spakovanom jezgru proteina koji sadrži CX_nCX_nCCX_nCXCCX_nC obrazac (tipičan za sve 2S albumine)(Shewry, P. R.,

Beaudoin, F. et al. 2002), najverovatnije jako ometa enzim da priđe mestu hidrolize. Naši rezultati identifikacije sekvenci PRP-a su u skladu sa ovom hipotezom. Osim toga, CD spektri dobijeni u ovoj studiji, potvrđuju da je strukturno proteinsko jezgro proteina očuvano i nakon dužeg dejstva tripsina.

Drugi aspekt rezistencije ovih proteina na dejstvo GI proteaza je da PRP imaju svojstva vezivanja IgE antitela iz seruma pacijenta alergičnih na kikiriki. Ranije je već pokazano da digestovani Ara h 2 i Ara h 6 na imunoblotu mogu da vežu IgE (Sen, M., Kopper, R. et al. 2002; Hazebrouck, S., Guillon, B. et al. 2012). Mi smo ovde prikazali da IgE potentnost nije izgubljena nakon digestije Ara h 2 izoformi i Ara h 6 alergena. Osim toga pokazali smo da su oba dela (N- i C-terminalni deo proteina) PRP-a sposobna da vežu IgE. Očuvan IgE-vezujući potencijal PRP-a podržava naše zapažanje iz poglavlja 5, tj. da IgE vezivanje uglavnom zavisi od konformacionih epitopa, dok su linearni epitopi, koji se nalaze van jezgra proteina i koji su definisani od strane *Stanley i saradnika* (1997), manje relevantni (Stanley, J. S., King, N. et al. 1997).

Proteoazno-rezistentni peptidi iz konglutin izoformi podsećaju na struktuirano proteinsko jezgro nativnih proteina koje je sposobno da veže IgE, samim tim i da izazove IgE posredovanu alergijsku reakciju. Deo proteina koji se ne nalazi u struktuiranom jezgru, a koje je veće kod Ara h 2 proteina nego kod Ara h 6, je podložno hidrolizi i gubi se tokom digestije. Samim tim, može se reći da su PRP iz Ara h 2 i Ara h 6 strukturno još sličniji jedni drugima nego njihovi nativni alergeni. S obzirom da je glavni put izloženosti alergena kikirikija, kao i alergena hrane uopšte, preko GI trakta, digestovane forme konglutina iz kikirikija mogu biti relevantnije od njihovih nedigestovanih formi.

U zaključku ovog dela, možemo reći da su u ovoj studiji pripremljeni i okarakterisani proteolitički rezistentni peptidi iz prečišćenih konglutin izoformi kikirikija, Ara h 2 i Ara h 6. Karakterizacija PRP može u mnogome da posluži u razvoju analitičkih tehnika za ispitivanje prisustva alergena kikirikija u različitim *in vivo* stadijama digestije ili preuzimanja od strane ćelija imunog sistema kroz intestinalnu barijeru. Pokazali smo da struktuirano jezgro konglutin izoformi ostaje netaknuto tokom dužeg procesa digestije, dok je petlja koja ne pripada jezgru daleko podložnija

proteolizi. Rezultati ukazuju na visoki stepen heterogenosti peptida kod kojih je uklonjena pomenuta petlja, kao i da ovi peptidi imaju očuvanu alergenost.

6. Zaključci

U skladu sa ciljevima iznetim u odeljku 1.1., mogu se izvesti sledeći zaključci:

- 1) Identifikovani su proteini nosioci α -Gal-a u proteinskom ekstraktu crvenog mesa iz govedine. Pokazano je da je α -Gal epitop uobičajeno prisutan na proteinima iz govedeg mesa, kao da ovi proteini bivaju prepoznati od strane IgE antitela pacijenta alergičnih na crveno meso. Tehnikama imunoproteomike identifikovali smo 18 proteina koje IgE antitela prepoznaju. Od ovih 18 proteina pokazali smo da sedam proteina sadrži α -Gal epitop, što je po prvi put opisano do sada, od čega su četiri stabilna pri termalnoj obradi. Samim tim alergnost proteina iz crvenog mesa ostaje očuvana i nakon termalne obrade mesa.
- 2) Hemijskom modifikacijom Ara h 2 i Ara h 6 alergena kikirikija generisani su stabilni modifikati koji su izgubili sekundarnu i tercijarnu strukturu, kao i sposobnost da vežu IgE iz seruma pacijenata alergičnih kikiriki. Limitiranom modifikacijom dobijeni su heterogeni intermedijerni produkti u kojima dolazi do izmene disulfida i koji su neželjeni u razvoju farmaceutskog produkta. Iz navedenog se vidi značaj i važnost dobijanja kompletno modifikovanih izoformi Ara h 2 i Ara h 6 alergena iz kikirikija u smislu bezbednosti imunoterapije.
- 3) Sve tri konglutin izoforme, Ara h 2.02, Ara h 2.01 i Ara h 6, digestijom daju heterogenu grupu peptida sa struktuiranim jezgrom, gde se region najveće heterogenosti nalazi u nestruktuiranom delu proteina, tačnije u N- i C-terminalnom, kao i u središnjem delu. Deo proteina koji se ne nalazi u struktuiranom jezgri, koji je veći kod Ara h 2 proteina nego kod Ara h 6, je podložan hidrolizi i gubi se tokom digestije. Ovi peptide, rezistentni na digestiju, su sposobni da vežu IgE iz seruma pacijenata alergičnih na kikiriki. S obzirom da je glavni put izloženosti alergena kikirikija preko GI trakta, digestovane forme konglutina iz kikirikija mogu biti relevantnije od njihovih

nedigestovanih formi. Samim time mogu u mnogome da posluže u razvoju analitičkih tehnika za ispitivanje prisustva alergena kikirikija u različitim *in vivo* stadijama digestije ili preuzimanja od strane ćelija imunog sistema kroz intestinalnu barijeru.

7. Literatura

1. Aaronson, R. M., Graven, K. K., et al. (1995). "Non-neuronal enolase is an endothelial hypoxic stress protein." J Biol Chem **270**(46): 27752-27757.
2. Arkestal, K., Sibanda, E., et al. (2011). "Impaired allergy diagnostics among parasite-infected patients caused by IgE antibodies to the carbohydrate epitope galactose-alpha 1,3-galactose." J Allergy Clin Immunol **127**(4): 1024-1028.
3. Arumugham, R. G., Hsieh, T. C., et al. (1986). "Structures of the asparagine-linked sugar chains of laminin." Biochim Biophys Acta **883**(1): 112-126.
4. 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.
5. Astwood, J. D., Leach, J. N., et al. (1996). "Stability of food allergens to digestion in vitro." Nat Biotechnol **14**(10): 1269-1273.
6. Baumert, J. L., Bush, R. K., et al. (2009). "Distribution of Intact Peanut Protein and Digestion-Resistant Ara h 2 Peptide in Human Serum and Saliva." Journal of Allergy and Clinical Immunology **123**(2, Supplement): S268.
7. Baumert, J. L., Peeters, K. A., et al. (2006). "Development of an ELISA for Digestion-Resistant Ara h 2 Peptide: Monitoring the Peptide in Body Fluids of Healthy Volunteers Who Consumed Peanut." Journal of Allergy and Clinical Immunology **117**(2, Supplement): S35.
8. Bax, M. L., Sayd, T., et al. (2013). "Muscle composition slightly affects in vitro digestion of aged and cooked meat: identification of associated proteomic markers." Food Chem **136**(3-4): 1249-1262.
9. Berin, M. C., Kiliaan, A. J., et al. (1998). "The influence of mast cells on pathways of transepithelial antigen transport in rat intestine." J Immunol **161**(5): 2561-2566.
10. Bernard, H., Ah-Leung, S., et al. (2014). "Peanut allergens are rapidly transferred in human breast milk and can prevent sensitization in mice." Allergy **69**(7): 888-897.
11. Bernard, H., Guillon, B., et al. (2014). "Allergenicity of peanut component Ara h 2: Contribution of conformational versus linear hydroxyproline-containing epitopes." J Allergy Clin Immunol.

12. 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.
13. Bernard, H., Paty, E., et al. (2003). "Serological characteristics of peanut allergy in children." Allergy **58**(12): 1285-1292.
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. Boyce, J. A., Assa'ad, A., et al. (2010). "Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel." J Allergy Clin Immunol **126**(6 Suppl): S1-58.
16. Boyce, J. A., Assa'ad, A., et al. (2010). "Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: Summary of the NIAID-Sponsored Expert Panel Report." J Allergy Clin Immunol **126**(6): 1105-1118.
17. Breiteneder, H. and Radauer, C. (2004). "A classification of plant food allergens." J Allergy Clin Immunol **113**(5): 821-830; quiz 831.
18. Bublin, M., Kostadinova, M., et al. (2013). "IgE cross-reactivity between the major peanut allergen Ara h 2 and the nonhomologous allergens Ara h 1 and Ara h 3." J Allergy Clin Immunol **132**(1): 118-124.
19. Bukantz, S. C. (2002). "Clemens von Pirquet and the concept of allergie." J Allergy Clin Immunol **109**(4): 724-726.
20. Burks, A. W., Williams, L. W., et al. (1992). "Allergenicity of peanut and soybean extracts altered by chemical or thermal denaturation in patients with atopic dermatitis and positive food challenges." J Allergy Clin Immunol **90**(6 Pt 1): 889-897.
21. Cabanos, C., Urabe, H., et al. (2011). "Crystal structure of the major peanut allergen Ara h 1." Mol Immunol **49**(1-2): 115-123.
22. Callery, M. P., Kamei, T., et al. (1989). "The effect of portacaval shunt on delayed-hypersensitivity responses following antigen feeding." J Surg Res **46**(4): 391-394.
23. Candiano, G., Bruschi, M., et al. (2004). "Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis." Electrophoresis **25**(9): 1327-1333.

24. Casale, T. B. and Stokes, J. R. (2011). "Future forms of immunotherapy." J Allergy Clin Immunol **127**(1): 8-15; quiz 16-17.
25. Ceuppens, J. L., Bullens, D., et al. (2009). "Immunotherapy with a modified birch pollen extract in allergic rhinoconjunctivitis: clinical and immunological effects." Clin Exp Allergy **39**(12): 1903-1909.
26. Chapman, M. D., Pomes, A., et al. (2007). "Nomenclature and structural biology of allergens." J Allergy Clin Immunol **119**(2): 414-420.
27. 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.
28. Chen, X., Wang, Q., et al. (2013). "Ara h 2 and Ara h 6 have similar allergenic activity and are substantially redundant." Int Arch Allergy Immunol **160**(3): 251-258.
29. Chung, C. H., Mirakhur, B., et al. (2008). "Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose." N Engl J Med **358**(11): 1109-1117.
30. Cirkovic, T., Gavrovic-Jankulovic, M., et al. (2002). "The influence of a residual group in low-molecular-weight allergoids of *Artemisia vulgaris* pollen on their allergenicity, IgE- and IgG-binding properties." Allergy **57**(11): 1013-1020.
31. Cirkovic, T. D., Bukilica, M. N., et al. (1999). "Physicochemical and immunologic characterization of low-molecular-weight allergoids of *Dactylis glomerata* pollen proteins." Allergy **54**(2): 128-134.
32. Codreanu, F., Collignon, O., et al. (2011). "A novel immunoassay using recombinant allergens simplifies peanut allergy diagnosis." Int Arch Allergy Immunol **154**(3): 216-226.
33. Commins, S. P., James, H. R., et al. (2011). "The relevance of tick bites to the production of IgE antibodies to the mammalian oligosaccharide galactose-alpha-1,3-galactose." J Allergy Clin Immunol **127**(5): 1286-1293 e1286.
34. Commins, S. P., James, H. R., et al. (2014). "Delayed clinical and ex vivo response to mammalian meat in patients with IgE to galactose-alpha-1,3-galactose." J Allergy Clin Immunol **134**(1): 108-115.
35. Commins, S. P. and Platts-Mills, T. A. (2010). "Allergenicity of carbohydrates and their role in anaphylactic events." Curr Allergy Asthma Rep **10**(1): 29-33.

36. Commins, S. P. and Platts-Mills, T. A. (2009). "Anaphylaxis syndromes related to a new mammalian cross-reactive carbohydrate determinant." J Allergy Clin Immunol **124**(4): 652-657.
37. Commins, S. P. and Platts-Mills, T. A. (2013). "Delayed anaphylaxis to red meat in patients with IgE specific for galactose alpha-1,3-galactose (alpha-gal)." Curr Allergy Asthma Rep **13**(1): 72-77.
38. Commins, S. P., Satinover, S. M., et al. (2009). "Delayed anaphylaxis, angioedema, or urticaria after consumption of red meat in patients with IgE antibodies specific for galactose-alpha-1,3-galactose." J Allergy Clin Immunol **123**(2): 426-433.
39. 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.
40. del Val, G., Yee, B. C., et al. (1999). "Thioredoxin treatment increases digestibility and lowers allergenicity of milk." J Allergy Clin Immunol **103**(4): 690-697.
41. Drouet, M., Sabbah, A., et al. (2001). "[Fatal anaphylaxis after eating wild boar meat in a patient with pork-cat syndrome]." Allerg Immunol (Paris) **33**(4): 163-165.
42. Echterbille, J., Quinton, L., et al. (2013). "Ion mobility mass spectrometry as a potential tool to assign disulfide bonds arrangements in peptides with multiple disulfide bridges." Anal Chem **85**(9): 4405-4413.
43. Eigenmann, P. A. (2002). "Anaphylaxis to cow's milk and beef meat proteins." Ann Allergy Asthma Immunol **89**(6 Suppl 1): 61-64.
44. Everett, M. L., Lin, S. S., et al. (2003). "The footprint of antibody bound to pig cells: evidence of complex surface topology." Biochem Biophys Res Commun **301**(3): 751-757.
45. Fiocchi, A., Bouygue, G. R., et al. (2004). "Clinical tolerance of processed foods." Ann Allergy Asthma Immunol **93**(5 Suppl 3): S38-46.
46. Fiocchi, A., Restani, P., et al. (2005). "Beef allergy in adults and children." Allergy **60**(1): 126.
47. Fiocchi, A., Restani, P., et al. (2000). "Beef allergy in children." Nutrition **16**(6): 454-457.

48. Fiocchi, A., Restani, P., et al. (1995). "Meat allergy: I--Specific IgE to BSA and OSA in atopic, beef sensitive children." J Am Coll Nutr **14**(3): 239-244.
49. Fischer, J., Hebsaker, J., et al. (2014). "Galactose-alpha-1,3-galactose sensitization is a prerequisite for pork-kidney allergy and cofactor-related mammalian meat anaphylaxis." J Allergy Clin Immunol **134**(3): 755-759 e751.
50. 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.
51. Fu, T. J. (2002). "Digestion stability as a criterion for protein allergenicity assessment." Ann N Y Acad Sci **964**: 99-110.
52. Fuentes, M. M., Palacios, R., et al. (2004). "Isolation and characterization of a heat-resistant beef allergen: myoglobin." Allergy **59**(3): 327-331.
53. Galili, U. (2005). "The alpha-gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy." Immunol Cell Biol **83**(6): 674-686.
54. Glaser, A. G., Menz, G., et al. (2008). "Auto- and cross-reactivity to thioredoxin allergens in allergic bronchopulmonary aspergillosis." Allergy **63**(12): 1617-1623.
55. Gronlund, H., Adedoyin, J., et al. (2009). "The carbohydrate galactose-alpha-1,3-galactose is a major IgE-binding epitope on cat IgA." J Allergy Clin Immunol **123**(5): 1189-1191.
56. Guo, B., Liang, X., et al. (2008). "Proteomic screening points to the potential importance of Ara h 3 basic subunit in allergenicity of peanut." Inflamm Allergy Drug Targets **7**(3): 163-166.
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. Hales, B. J., Bosco, A., et al. (2004). "Isoforms of the major peanut allergen Ara h 2: IgE binding in children with peanut allergy." Int Arch Allergy Immunol **135**(2): 101-107.
59. Hamsten, C., Starkhammar, M., et al. (2013). "Identification of galactose-alpha-1,3-galactose in the gastrointestinal tract of the tick *Ixodes ricinus*; possible relationship with red meat allergy." Allergy **68**(4): 549-552.

60. Hamsten, C., Tran, T. A., et al. (2013). "Red meat allergy in Sweden: association with tick sensitization and B-negative blood groups." J Allergy Clin Immunol **132**(6): 1431-1434.
61. Hazebrouck, S., Guillon, B., et al. (2012). "Trypsin resistance of the major peanut allergen Ara h 6 and allergenicity of the digestion products are abolished after selective disruption of disulfide bonds." Mol Nutr Food Res **56**(4): 548-557.
62. Hefle, S. L. (2001). "Hidden food allergens." Curr Opin Allergy Clin Immunol **1**(3): 269-271.
63. Hersey, S. J. and Sachs, G. (1995). "Gastric acid secretion." Physiol Rev **75**(1): 155-189.
64. Hurlburt, B. K., Offermann, L. R., et al. (2013). "Structure and function of the peanut panallergen Ara h 8." J Biol Chem **288**(52): 36890-36901.
65. Igea, J. M. (2013). "The history of the idea of allergy." Allergy **68**(8): 966-973.
66. Jacobs, J. F., Baumert, J. L., et al. (2011). "Anaphylaxis from passive transfer of peanut allergen in a blood product." N Engl J Med **364**(20): 1981-1982.
67. Jacquenet, S., Moneret-Vautrin, D. A., et al. (2009). "Mammalian meat-induced anaphylaxis: clinical relevance of anti-galactose-alpha-1,3-galactose IgE confirmed by means of skin tests to cetuximab." J Allergy Clin Immunol **124**(3): 603-605.
68. Jin, T., Guo, F., et al. (2009). "Crystal structure of Ara h 3, a major allergen in peanut." Mol Immunol **46**(8-9): 1796-1804.
69. Johansson, S. G. (2011). "The History of IgE: From discovery to 2010." Curr Allergy Asthma Rep **11**(2): 173-177.
70. Joseph, P., Suman, S. P., et al. (2012). "Proteomics of muscle-specific beef color stability." J Agric Food Chem **60**(12): 3196-3203.
71. King, N., Helm, R., et al. (2005). "Allergenic characteristics of a modified peanut allergen." Mol Nutr Food Res **49**(10): 963-971.
72. Klemans, R. J., Broekman, H. C., et al. (2013). "Ara h 2 is the best predictor for peanut allergy in adults." J Allergy Clin Immunol Pract **1**(6): 632-638 e631.
73. Klemans, R. J., Knol, E. F., et al. (2014). "The diagnostic accuracy of specific IgE to Ara h 6 in adults is as good as Ara h 2." Allergy **69**(8): 1112-1114.

74. Klemans, R. J., Liu, X., et al. (2013). "IgE binding to peanut components by four different techniques: Ara h 2 is the most relevant in peanut allergic children and adults." Clin Exp Allergy **43**(8): 967-974.
75. Klemans, R. J., van Os-Medendorp, H., et al. (2014). "Diagnostic accuracy of specific IgE to components in diagnosing peanut allergy: a systematic review." Clin Exp Allergy.
76. Koid, A. E., Chapman, M. D., et al. (2014). "Ara h 6 complements Ara h 2 as an important marker for IgE reactivity to peanut." J Agric Food Chem **62**(1): 206-213.
77. Konijnenberg, A., Butterer, A., et al. (2013). "Native ion mobility-mass spectrometry and related methods in structural biology." Biochim Biophys Acta **1834**(6): 1239-1256.
78. Koppelman, S. J., Bruijnzeel-Koomen, C. A., et al. (1999). "Heat-induced conformational changes of Ara h 1, a major peanut allergen, do not affect its allergenic properties." J Biol Chem **274**(8): 4770-4777.
79. 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.
80. 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.
81. Koppelman, S. J., Nieuwenhuizen, W. F., et al. (2005). "Reversible denaturation of Brazil nut 2S albumin (Ber e1) and implication of structural destabilization on digestion by pepsin." J Agric Food Chem **53**(1): 123-131.
82. 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.
83. Kulis, M., Chen, X., et al. (2012). "The 2S albumin allergens of *Arachis hypogaea*, Ara h 2 and Ara h 6, are the major elicitors of anaphylaxis and can effectively desensitize peanut-allergic mice." Clin Exp Allergy **42**(2): 326-336.
84. Kumar, S., Verma, A. K., et al. (2012). "Molecular mechanisms of IgE mediated food allergy." Int Immunopharmacol **13**(4): 432-439.

85. Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
86. Lammerts van Bueren, J. J., Rispens, T., et al. (2011). "Anti-galactose-alpha-1,3-galactose IgE from allergic patients does not bind alpha-galactosylated glycans on intact therapeutic antibody Fc domains." Nat Biotechnol **29**(7): 574-576.
87. Larche, M., Akdis, C. A., et al. (2006). "Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy." Nat Rev Immunol **6**(10): 761-771.
88. 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.
89. Lehrer, S. B., Ayuso, R., et al. (2002). "Current understanding of food allergens." Ann N Y Acad Sci **964**: 69-85.
90. Li, J., Shefcheck, K., et al. (2010). "Primary sequence and site-selective hydroxylation of prolines in isoforms of a major peanut allergen protein Ara h 2." Protein Sci **19**(1): 174-182.
91. Liang, X. Q., Luo, M., et al. (2006). "Storage protein profiles in Spanish and runner market type peanuts and potential markers." BMC Plant Biol **6**: 24.
92. Macher, B. A. and Galili, U. (2008). "The Galalpha1,3Galbeta1,4GlcNAc-R (alpha-Gal) epitope: a carbohydrate of unique evolution and clinical relevance." Biochim Biophys Acta **1780**(2): 75-88.
93. Maleki, S. J., Chung, S. Y., et al. (2000). "The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins." J Allergy Clin Immunol **106**(4): 763-768.
94. 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.
95. Mamikoglu, B. (2005). "Beef, pork, and milk allergy (cross reactivity with each other and pet allergies)." Otolaryngol Head Neck Surg **133**(4): 534-537.
96. Marsh, D. G., Lichtenstein, L. M., et al. (1970). "Studies on "allergoids" prepared from naturally occurring allergens. I. Assay of allergenicity and antigenicity of formalinized rye group I component." Immunology **18**(5): 705-722.

97. Martelli, A., De Chiara, A., et al. (2002). "Beef allergy in children with cow's milk allergy; cow's milk allergy in children with beef allergy." Ann Allergy Asthma Immunol **89**(6 Suppl 1): 38-43.
98. Mayorga, C., Gomez, F., et al. (2014). "Basophil response to peanut allergens in Mediterranean peanut-allergic patients." Allergy **69**(7): 964-968.
99. Mills, E. N. and Breiteneder, H. (2005). "Food allergy and its relevance to industrial food proteins." Biotechnol Adv **23**(6): 409-414.
100. Minekus, M., Alminger, M., et al. (2014). "A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus." Food Funct **5**(6): 1113-1124.
101. Moreno, F. J., Mackie, A. R., et al. (2005). "Phospholipid interactions protect the milk allergen alpha-lactalbumin from proteolysis during in vitro digestion." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(25): 9810-9816.
102. Moreno, F. J., Mellon, F. A., et al. (2005). "Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Bere 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion." FEBS J **272**(2): 341-352.
103. Morisset, M., Richard, C., et al. (2012). "Anaphylaxis to pork kidney is related to IgE antibodies specific for galactose-alpha-1,3-galactose." Allergy **67**(5): 699-704.
104. Morris, H. R., Pucci, P., et al. (1990). "Protein folding/refolding analysis by mass spectrometry. Scrambling of disulphide bridges in insulin." Biochem J **268**(3): 803-806.
105. Mueller, G. A., Gosavi, R. A., et al. (2011). "Ara h 2: crystal structure and IgE binding distinguish two subpopulations of peanut allergic patients by epitope diversity." Allergy **66**(7): 878-885.
106. Mueller, G. A., Maleki, S. J., et al. (2014). "The molecular basis of peanut allergy." Curr Allergy Asthma Rep **14**(5): 429.
107. Mullins, R. J., James, H., et al. (2012). "Relationship between red meat allergy and sensitization to gelatin and galactose-alpha-1,3-galactose." J Allergy Clin Immunol **129**(5): 1334-1342 e1331.
108. Nakamura, R. and Teshima, R. (2014). "Immunoproteomics analysis of food allergens." Methods Mol Biol **1072**: 725-735.
109. Nowak-Wegrzyn, A. and Sampson, H. A. (2011). "Future therapies for food allergies." J Allergy Clin Immunol **127**(3): 558-573; quiz 574-555.

110. Nunez, R., Carballada, F., et al. (2011). "Delayed mammalian meat-induced anaphylaxis due to galactose-alpha-1,3-galactose in 5 European patients." J Allergy Clin Immunol **128**(5): 1122-1124 e1121.
111. O'Keefe, A. W., De Schryver, S., et al. (2014). "Diagnosis and management of food allergies: new and emerging options: a systematic review." J Asthma Allergy **7**: 141-164.
112. O'Neil, B. H., Allen, R., et al. (2007). "High incidence of cetuximab-related infusion reactions in Tennessee and North Carolina and the association with atopic history." J Clin Oncol **25**(24): 3644-3648.
113. Oppenheimer, J. J., Nelson, H. S., et al. (1992). "Treatment of peanut allergy with rush immunotherapy." J Allergy Clin Immunol **90**(2): 256-262.
114. Orhan, F. and Sekerel, B. E. (2003). "Beef allergy: a review of 12 cases." Allergy **58**(2): 127-131.
115. Patterson, R., Suszko, I. M., et al. (1979). "Reduced allergenicity of high molecular weight ragweed polymers." J Allergy Clin Immunol **63**(1): 47-50.
116. Picariello, G., Mamone, G., et al. (2013). "Protein digestomics: Integrated platforms to study food-protein digestion and derived functional and active peptides." TrAC Trends in Analytical Chemistry **52**(0): 120-134.
117. 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.
118. 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.
119. Posthumus, J., James, H. R., et al. (2013). "Initial description of pork-cat syndrome in the United States." J Allergy Clin Immunol **131**(3): 923-925.
120. Prescott, S. and Allen, K. J. (2011). "Food allergy: riding the second wave of the allergy epidemic." Pediatr Allergy Immunol **22**(2): 155-160.
121. 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.
122. Ramos, M. L., Huntley, J. J., et al. (2009). "Identification and characterization of a hypoallergenic ortholog of Ara h 2.01." Plant Mol Biol **69**(3): 325-335.

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., Beretta, B., et al. (2002). "Cross-reactivity between mammalian proteins." Ann Allergy Asthma Immunol **89**(6 Suppl 1): 11-15.
125. Rimoldi, M. and Rescigno, M. (2005). "Uptake and presentation of orally administered antigens." Vaccine **23**(15): 1793-1796.
126. Saleh, H., Embry, S., et al. (2012). "Anaphylactic reactions to oligosaccharides in red meat: a syndrome in evolution." Clin Mol Allergy **10**(1): 5.
127. Sampson, H. A. (2004). "Update on food allergy." J Allergy Clin Immunol **113**(5): 805-819; quiz 820.
128. Savi, E., Rossi, A., et al. (2006). "Cat-pork syndrome: a case report with a three years follow-up." Eur Ann Allergy Clin Immunol **38**(10): 366-368.
129. Schmidt, H., Gelhaus, C., et al. (2009). "2-D DIGE analysis of the proteome of extracts from peanut variants reveals striking differences in major allergen contents." Proteomics **9**(13): 3507-3521.
130. Schnell, S. and Herman, R. A. (2009). "Should digestion assays be used to estimate persistence of potential allergens in tests for safety of novel food proteins?" Clin Mol Allergy **7**: 1.
131. Sen, M., Kopper, R., et al. (2002). "Protein structure plays a critical role in peanut allergen stability and may determine immunodominant IgE-binding epitopes." J Immunol **169**(2): 882-887.
132. Shevchenko, A., Tomas, H., et al. (2006). "In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes." Nat Protoc **1**(6): 2856-2860.
133. Shewry, P. R., Beaudoin, F., et al. (2002). "Plant protein families and their relationships to food allergy." Biochem Soc Trans **30**(Pt 6): 906-910.
134. Sicherer, S. H. (2011). "Food allergy." Mt Sinai J Med **78**(5): 683-696.
135. Sicherer, S. H. and Mahr, T. (2010). "Management of food allergy in the school setting." Pediatrics **126**(6): 1232-1239.
136. Sicherer, S. H., Munoz-Furlong, A., et al. (1999). "Prevalence of peanut and tree nut allergy in the US determined by a random digit dial telephone survey." J Allergy Clin Immunol **103**(4): 559-562.

137. 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.
138. Simecka, J. W. (1998). "Mucosal immunity of the gastrointestinal tract and oral tolerance." Adv Drug Deliv Rev **34**(2-3): 235-259.
139. 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.
140. Starkl, P., Felix, F., et al. (2012). "An unfolded variant of the major peanut allergen Ara h 2 with decreased anaphylactic potential." Clin Exp Allergy **42**(12): 1801-1812.
141. 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.
142. Takahashi, H., Chinuki, Y., et al. (2014). "Laminin gamma-1 and collagen alpha-1 (VI) chain are galactose-alpha-1,3-galactose-bound allergens in beef." Allergy **69**(2): 199-207.
143. Tanabe, S., Shibata, R., et al. (2004). "Hypoallergenic and T cell reactive analogue peptides of bovine serum albumin, the major beef allergen." Mol Immunol **41**(9): 885-890.
144. Taylor, S. L., Lemanske, R. F., Jr., et al. (1987). "Food allergens: structure and immunologic properties." Ann Allergy **59**(5 Pt 2): 93-99.
145. Teuber, S. S. (2002). "Hypothesis: the protein body effect and other aspects of food matrix effects." Ann N Y Acad Sci **964**: 111-116.
146. Thall, A. and Galili, U. (1990). "Distribution of Gal alpha 1----3Gal beta 1----4GlcNAc residues on secreted mammalian glycoproteins (thyroglobulin, fibrinogen, and immunoglobulin G) as measured by a sensitive solid-phase radioimmunoassay." Biochemistry **29**(16): 3959-3965.
147. Thall, A. D., Maly, P., et al. (1995). "Oocyte Gal alpha 1,3Gal epitopes implicated in sperm adhesion to the zona pellucida glycoprotein ZP3 are not required for fertilization in the mouse." J Biol Chem **270**(37): 21437-21440.

148. 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.
149. Toda, M., Reese, G., et al. (2011). "Protein unfolding strongly modulates the allergenicity and immunogenicity of Pru p 3, the major peach allergen." J Allergy Clin Immunol **128**(5): 1022-1030 e1021-1027.
150. Tordesillas, L., Goswami, R., et al. (2014). "Skin exposure promotes a Th2-dependent sensitization to peanut allergens." J Clin Invest **124**(11): 4965-4975.
151. Towbin, H., Staehelin, T., et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.
152. Vadas, P., Wai, Y., et al. (2001). "Detection of peanut allergens in breast milk of lactating women." JAMA **285**(13): 1746-1748.
153. Valenta, R. (2002). "The future of antigen-specific immunotherapy of allergy." Nat Rev Immunol **2**(6): 446-453.
154. van Beresteijn, E. C., Meijer, R. J., et al. (1995). "Residual antigenicity of hypoallergenic infant formulas and the occurrence of milk-specific IgE antibodies in patients with clinical allergy." J Allergy Clin Immunol **96**(3): 365-374.
155. van der Kleij, H. P. M., Smit, J., et al. (2011). "A Peanut Allergoid with Increased Safety and Maintained Immunogenicity." Journal of Allergy and Clinical Immunology **127**(2, Supplement): AB32.
156. Van Nunen, S. A., O'Connor, K. S., et al. (2009). "An association between tick bite reactions and red meat allergy in humans." Med J Aust **190**(9): 510-511.
157. Wang, Y., Fu, T. J., et al. (2013). "Crystal structure of peanut (*Arachis hypogaea*) allergen Ara h 5." J Agric Food Chem **61**(7): 1573-1578.
158. Werfel, S. J., Cooke, S. K., et al. (1997). "Clinical reactivity to beef in children allergic to cow's milk." J Allergy Clin Immunol **99**(3): 293-300.
159. 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.
160. Zhuang, Y. and Dreskin, S. C. (2013). "Redefining the major peanut allergens." Immunol Res **55**(1-3): 125-134.

8. Prilozi

8.1. Prilog A

Tabela A1. MS/MS identifikacija proteinskih tačaka iz 2D gela sa razdvojenim proteinima crvenog mesa.

# tačke	Pristupni Uniprot #	Ime proteina	Protein ski skor	Pokriven sot sekvence %	# Broj jedinstvenih peptida	# PSM	Mm (kDa); pI
1	NP_776342.1	Hemoglobin, subjedinica beta	638,26	95,86	4	152	15,9; 7,59
2	2QSP_C	Hemoglobin, lanac C	919,46	87,94	16	202	15,0; 8,44
3	NP_776306.1	Mioglobin	149,83	64,94	10	40	17,1; 7,46
4	NP_776306.1	Mioglobin	738,25	85,06	16	182	17,1; 7,46
5	NP_776306.1	Mioglobin	736,89	66,23	15	183	17,1; 7,46
6	NP_776306.1	Mioglobin	305,67	58,44	10	79	17,1; 7,46
7	NP_001028795.1	Fosfatidiletanola min-vezujući protein	380,88	84,95	21	95	20,8; 7,49
8	NP_001013600.1	Adenilat kinaza izoenzim 1	543,69	85,57	23	147	21,7; 8,32
9	NP_001013607.1	Triozofosfat izomeraza	747,60	89,96	21	193	26,7; 6,92
10	NP_001013607.1	Triozofosfat izomeraza	624,54	91,57	22	164	26,7; 6,92
11	DAA17264.1	Fosfoglicerat mutaza 2	453,72	79,84	23	127	28,7; 8,90
12	NP_001029609.1	Karbonska anhidraza 3	429,07	75,77	21	125	29,4; 7,84

13	NP_001095385.1	Fruktozo-bifosfat aldolaza B	230,47	72,80	16	61	39,4; 8,19
	NP_001091453.1	Fruktozo-bifosfat aldolaza C	43,52	16,76	2	10	39,4; 6,65
14	NP_001095385.1	Fruktozo-bifosfat aldolaza A	23,88	32,42	6	7	39,4; 6,65
15	NP_001095385.1	Fruktozo-bifosfat aldolaza A	621,66	83,79	21	152	39,4; 8,19
	BAA14170.1	Laktat dehidrogenaza A	13,96	13,31	3	4	35,6; 8,00
16	NP_001095385.1	Fruktozo-bifosfat aldolaza A	322,67	77,20	21	80	39,4; 8,19
	BAA14170.1	Laktat dehidrogenaza A	49,24	47,89	10	13	36,6; 8,00
	NP_001029609.1	Karbonska anhidraza 3	10,7	11,15	2	3	29,4; 7,84
17	NP_001095385.1	Fruktozo-bifosfat aldolaza A	349,95	71,15	17	90	39,4; 8,19
	NP_777198.2	Kreatin kinaza M- tip	20,96	23,10	6	6	43,0; 7,12
	P33097.3	Aspartat aminotransferaza	10,2	11,14	3	3	46,4; 7,49
18	NP_001095385.1	Fruktozo-bifosfat aldolaza A	165,44	76,10	20	40	39,4; 8,19
	P33097.3	Aspartat aminotransferaza	159,12	66,10	24	40	46,4; 7,49
	AAD30974.1	Kreatin kinaza M- tip	60,66	40,94	9	14	43,0; 7,12
19	NP_001029471.1	Phosphoglycerate kinase 1	436,10	69,78	25	110	44,5; 8,27
	NP_001029874.1	Beta-enolaza	23,04	26,04	6	6	47,1; 7,72
	NP_001095385.1	Fruktozo-bifosfat aldolaza A	10,3	16,21	3	3	39,4; 8,19
20	NP_777198.2	Kreatin kinaza M- tip	679,19	78,74	35	157	43,0; 7,12

21	NP_777198.2	Kreatin kinaza M-tip	685.20	74.80	30	170	43.0; 7.12
	P33097.3	Aspartat aminotransferaza	59.32	42.13	14	16	46.4; 7.49
	NP_001095385.1	Fruktozo-bifosfat aldolaza A	18.9	15.66	3	4	39.4; 8.19
	NP_001029471.1	Phosphoglycerate kinase 1	17.27	20.62	5	5	44.5; 8.27
22	NP_777198.2	Kreatin kinaza M-tip	257,15	50,39	16	49	43,0; 7,12
	P33097.3	Aspartat aminotransferaza	15,17	17,43	5	5	46,4; 7,49
	Q5EA88.3	Glicerol-3-fosfat dehidrogenaza [NAD(+)], citoplazmatska	12,74	12,32	3	4	37,6; 6,89
23	NP_777198.2	Kreatin kinaza M-tip	200,22	52,49	16	49	43,0; 7,12
	P33097.3	Aspartat aminotransferaza	10,32	10,41	3	3	46,4; 7,49
24	NP_001029874.1	Beta-enolaza	517,04	58,29	20	147	47,1; 7,72
	DAA21263.1	Alfa-enolaza	159,12	23,50	1	43	47,3; 6,80
	NP_777198.2	Kreatin kinaza M-tip	61,95	40,94	10	15	43,0; 7,12
	P33097.3	Aspartat aminotransferaza	19,96	20,58	6	6	46,4; 7,49
25	NP_001029874.1	Beta-enolaza	180,19	58,06	15	53	47,1; 7,72
	DAA21263.1	Alfa-enolaza	45,8	25,21	1	14	47,3; 6,80
	NP_777198.2	Kreatin kinaza M-tip	25,93	29,92	8	9	43,0; 7,12
26	NP_001029874.1	Beta-enolaza	408,27	63,13	19	111	47,1; 7,72
	DAA21263.1	Alfa-enolaza	122,18	28,57	1	32	47,3; 6,80
	P33097.3	Aspartat aminotransferaza	14,65	15,50	4	4	46,4; 7,49
	NP_777198.2	Kreatin kinaza M-tip	11,07	13,65	3	3	43,0; 7,12
27	NP_001029874.1	Beta-enolaza	884,45	67,51	25	233	47,1; 7,72
	DAA21263.1	Alfa-enolaza	272,51	29,72	2	72	47,3; 6,80
	P33097.3	Aspartat aminotransferaza	55,39	32,45	9	13	46,4; 7,49

28	CAA76847.1	Albumin	594,87	64,15	34	160	66,4; 5,86
	P54652.1	Heat shock 70 kDa protein 2	26,02	14,82	4	8	70,2; 5,92
29	CAA76847.1	Albumin	300.35	47.17	25	76	66.4; 5.86
	P54652.1	Heat shock 70 kDa protein 2	66.73	34.17	15	18	70.2; 5.92

BIOGRAFIJA AUTORA

Danijela Apostolović rođena 01. Novembra 1985 u Skoplju. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani biohemičar, upisala je 2004. godine a diplomirala je 2011. godine sa prosečnom ocenom 7,81 i ocenom 10 na završnom radu.

Na master studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer master biohemičar, se upisuje 2011 godine. Master rad je odbranila je 01. Oktobra 2012 godine sa ocenom 10 i prosečnom ocenom 9,0 čime jestekla zvanje master biohemičar. U toku master studija boravila je 5 meseci na studentskoj praksi u farmaceutskoj kompaniji „HAL Allergy“ Lajden, Holandija.

Danijela Apostolović je doktorske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Doktor biohemijskih nauka, upisala oktobra 2012. godine. Od juna 2012. godine bila je zaposlena kao stručni saradnik u Laboratoriji za CD i masenu spektrometriju na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu do jula 2013. U toku prve godine doktorata učestvuje u realizaciji međunarodnog projekta FP7-RegPot2010-5 FCUB-ERA “Reinforcement of the Faculty of Chemistry, University of Belgrade, towards becoming a center of excellence in the region of WB for molecular biotechnology and food research”, zahvaljujući kome boravi na „Karolinska Institutet”, Stokholm, Švedska (2 meseca). Aprila 2013 godine dobija prestižnu stipendiju od Evropske akademije za alergiju i kliničku imunologiju za istraživanje i boravak od godinu dana na „Karolinska Institutet”, Stokholm, Švedska.

Danijela Apostolović je koautor šest naučnih radova štampanih u vrhunskim časopisima međunarodnog značaja i 17 saopštenja na naučnim skupovima od nacionalnog i međunarodnog značaja. Član je Srpskog hemijskog društva, Biohemijskog društva Srbije, Kluba mladih hemičara i Evropske akademije za alergologiju i kliničku imunologiju.

Publikacije autora koje nisu uključene u tezu

1. Tantoush, Z., **Apostolovic D.**, Kravic B., Prodic I., Mihajlovic L., Stanic-Vucinic D., and Cirkovic Velickovic T. Green Tea Catechins of Food Supplements Facilitate Pepsin Digestion of Major Food Allergens, but Hampers their Digestion if Oxidized by Phenol Oxidase. *Journal of Functional Foods* 2012, 4 (3): 650-660. (M21, IF₂₀₁₁: 2.45);
2. Stanic-Vucinic, D., Prodic I., **Apostolovic D.**, Nikolic M., and Cirkovic Velickovic T. Structure and Antioxidant Activity of β -Lactoglobulin-Glycoconjugates obtained by High-Intensity-Ultrasound-Induced Maillard Reaction in Aqueous Model Systems Under Neutral Conditions. *Food Chemistry* 2013, 138 (1): 590-599. (M21, IF₂₀₁₂: 3.33);
3. Novaković, M., M. Stanković, I. Vučković, N. Todorović, S. Trifunović, **Apostolović D.**, B. Mandić, et al. Diarylheptanoids from Green Alder Bark and their Potential for DNA Protection. *Chemistry and Biodiversity* 2014, 11 (6): 872-885. (M22, IF₂₀₁₃: 1.804);
4. Ognjenović, J., Stojadinović M., Milčić M., **Apostolović D.**, Vesić J., Stambolić I., Atanasković-Marković M., Simonović M., and Velickovic. Interactions of Epigallo-Catechin 3-Gallate and Ovalbumin, the Major Allergen of Egg White. *Food Chemistry* 2014, 164: 36-43. (M21, IF₂₀₁₃: 3.259);
5. Vesic J., Stambolic I., **Apostolovic D.**, Milcic M., Stanic-Vucinic D. and Cirkovic Velickovic T. Complexes of green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, and 2S albumins of peanut. *Under revision_Food Chemistry*;
6. **Apostolovic D.**, Tran TAT., Sanchez-Viduarre S., Cirkovic Velickovic T., Starkhammar M., Hamsten C., van Hage M. Red meat allergic patients have a selective IgE response to the glycan α -Gal. *Manuscript submmited*;
7. Waden K., **Apostolovic D.**, Sanchez-Vidaurre S., Curin M., Grundström J., Gafvelin G., Cirkovic Velickovic T., Grönlund H., Thomas WR., Valenta R., Hamsten C., and van Hage M. The novel cat lipocalin Fel d 7 and its cross-reactivity with the dog lipocalin Can f 1: Structures, epitopes, and allergenicity. *Manuscript*.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана Данијела Апостоловић

број уписа ДБ21/2012

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Имунопротеомика алергена хране, модификованих

деривата алергена и алергених пептида резистентних на дигестију

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

Потпис докторанда

У Београду, 10.02.2015.


Danijela Apostolovic

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Данијела Апостоловић

Број уписа ДБ21/2012

Студијски програм доктор биохемијских наука

Наслов рада

**Имунопротеомика алергена хране, модификованих деривата алергена и
алергених пептида резистентних на дигестију**

Ментор Тања Ћирковић Величковић

Потписани Данијела Апостоловић

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

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

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

У Београду, 10.02.2015.

Потпис докторанда

Данијела Апостоловић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Имунопротеомика алергена хране, модификованих

деривата алергена и алергених пептида резистентних на дигестију

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 10.02.2015.



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

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

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

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

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

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