

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET

Jelena D. Mihailović

**Proteomika posttranslacionih i hemijskih
modifikacija proteina i interakcije
proteina od značaja u alergiji na hranu**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY

Jelena D. Mihailović

**Proteomics of post-translational and
chemical modifications of proteins and
interactions of proteins of importance in
food allergy**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

Komisija za odbranu doktorske disertacije

Tanja Ćirković Veličković, Mentor

Redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet
Dopisni član Srpske akademije nauka i umetnosti

dr Vladimir Beškoski

Vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

dr Jelena Radosavljević

Docent, Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

dr Katarina Smiljanić

Viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

dr Danijela Apostolović,

Postdoktorski istraživač - Postdoctoral researcher,
Department of Medicine Solna, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

Datum odbrane _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je urađena u laboratorijama prof. dr Tanje Ćirković Veličković na Univerzitetu u Beogradu – Hemijskom fakultetu, Katedri za biohemiju i pri Centru izuzetnih vrednosti za molekularne nauke o hrani. Disertacija je podržana projektima „Molekularna karakterizacija i modifikacije nekih respiratornih i nutritivnih alergena“ (OII172024, Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije) i „FoodenTwin“ Horizon2020 projektom 810752.

Zahvalnost na usmerenju, savetima i podršci dugujem mentoru – dr Tanji Ćirković Veličković i nezvaničnom ko-mentor dr Katarini Smiljanić.

Hvala svim kolegama koje su učinile da teški trenuci brzo prođu, a lepi ostanu u sećanju.

Najveću zahvalnost dugujem mom divnom mužu i mojoj divnoj porodici. Bez vaše ljubavi i podrške ne bih bila to što jesam i nijedan uspeh nema značaja ukoliko ga ne podelim sa vama.

Ovu disertaciju posvećujem mojoj maloj mami.

Spisak skraćenica

AA – akrilamid

ABC – amonijum-bikarbonatni pufer

ACN - acetonitril

AGE – proizvodi kasnog glikovanja (*engl.* Advanced glycation end products)

ak – aminoskiselina, aminokiselinski ostatak

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

AP – alkalna fosfataza

APC - antigen-prezentujuće ćelije

APS – amonijum-persulfat

BCA – bicinhoninska kiselina

BLG – β -laktoglobulin

BSA – goveđi serum albumin (*engl.* bovine serum albumin)

CID – disocijacija izazvana sudarima (*engl.* collision induced dissociation)

CBB – Coomassie Brilliant Blue

CD – cirkularni dihroizam

C-term. – C-terminus proteina ili peptida

DTT – ditionitrol

EGCG – epigalokatehin-3-galat

ESI – elektrosprej jonizacija (*engl.* Electrospray ionization)

FA – mravlja kiselina (*engl.* formic acid)

FDR – udeo statističke slučajnosti (*engl.* false discovery rate)

HM – hemijske modifikacije

HSA – humani serum albumin

GIT – gastrointestinalni trakt

HM – hemijske modifikacije proteina

hPro - hidrosilovani prolin

IAA – jodacetamid (*engl.* iodoacetamide)

IEDB – baza podataka imunoepitopa (*engl.* Immune Epitope Database)

Ig – imunoglobulin

ITC – izotermalna titraciona mikrokalorimetrija (*engl.* isothermal titration microcalorimetry)

konc. – koncentracija

LFQ – realtivna kvantifikacija proteina bez obeležavanja (*engl.* label free quantification)

LTQ – MS analizator tipa linearne jonske zamke (*engl.* linear trap quadrupole)

MALDI - matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija (*engl.* matrix-assisted laser desorption/ionization)

MHC – glavni kompleks tkivne podudarnosti (*engl.* major histocompatibility complex)

MS – masena spektrometrija

MS/MS – tandem masena spektrometrija

m/z – odnos mase i naelektrisanja jona detektovanih MS

NC – nitrocelulozna membrana

N-term., Nt – N-terminus proteina ili peptida

nLC-MS/MS – analiza tečnom hromatografijom veoma niskog protoka - tandem masenom spektrometrijom

NMR – nuklearna magnetna rezonanca

Neu5Gc - N-glikolilneuraminsku kiselinu

OVA – ovalbumin

PAA – poliakrilamid

PBS – fosfatom puferisan fiziološki rastvor

PBS-T – 0.5% Tween 20 u PBS-u

PTM – posttranslacione modifikacije

PVDF – polivinil-difluorid

SN – supernatant

SDS-PAGE – natrijum-dodecilsulfat elektroforeza na poliakrilamidnom gelu

SŽS – simulirani želudačni sok

TBS – trisom puferisan fiziološki rastvor

TBS-T – 0.1% Tween 20 u TBS-u

TEMED – *N,N,N',N'*-tetrametiletan-1,2-diamin

TG – tiroglobulin (goveđi)

TIC – ukupni jonski hromatogram (*engl.* total ion chromatogram)

TMB – tetrametilbenzidin

Tris – tris(hidroksimetil)aminometan

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

XIC – izdvojeni jonski hromatogram (*engl.* eXtracted ion chromatogram)

α -Gal – galaktozil- α -1,3-galaktoza

λ_{ex} – talasna dužina ekscitacije

λ_{em} – talasna dužina emisije

Sažetak

Alergija na hranu je reakcija preosetljivosti imunskog sistema na hranu koja dovodi do stvaranja IgE antitela. Ne postoji efikasan tretman i izbegavanje namirnica koje izazivaju simptome je jedini način za sprečavanje ozbiljnih posledica. Cilj ove teze je izučavanje posttranslacionih i hemijskih modifikacija (PTM i HM) i interakcija alergena hrane sa biološki aktivnim polifenolom biljnog porekla.

Alergija na crveno meso je novootkriveni tip odložene reakcije, sa PTM galaktozil- α -1,3-galaktozom (α -Gal) kao epitopom. Ispitani su podložnost model proteina - tiroglobulina (TG) digestiji pepsinom, prisustvo α -Gal na rezultujućim peptidima i pretpostavljeno mesto vezivanja α -Gal za TG. Pokazano je da je α -Gal celim tokom simulirane želudačne digestije vezan za nastale peptide TG, koji zadržavaju sposobnost da vežu IgE.

Alergija na kikiriki je među najopasnijim zbog učestalosti, postojanosti i ozbiljnosti simptoma. Postoje razlike u alergenosti između sirovog i pečenog kikirikija, koje mogu poticati od razlika u modifikacijama alergena. U ovoj disertaciji je proučena razlika u modifikacijama glavnih alergena iz sirovog i pečenog kikirikija. Detektovano je 27 modifikacija, od kojih 4 isključivo na proteinima pečenog kikirikija. Pokazane su razlike u profilima modifikacija proteina između ekstrakata, koje mogu uticati na alergenost.

2S albumini kikirikija su zbog kompaktne strukture otporni na delovanje digestivnih enzima, što se povezuje sa njihovom alergenošću. Ispitane su interakcije između njih i epigalokatehin-3-galata (EGCG), katehina zelenog čaja sa imunomodulatornim svojstvima koji pospešuje digestiju proteina pepsinom. Vezivanje EGCG-a za alergene izaziva promene u njihovoj strukturi (entalpijski povoljan proces), sa konstantama vezivanja reda veličine 10^4 M^{-1} .

Ključne reči: Alergija na hranu, alergeni hrane, kikiriki, crveno meso, α -Gal, EGCG, posttranslacione modifikacije, hemijske modifikacije, protein-ligand interakcije, proteomika

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

UDK broj:

Abstract

Food allergy is an immune system reaction to certain foods that results in IgE antibody generation. Efficient treatment does not exist, so avoidance of trigger foods is the only way to prevent serious consequences. The aim of this thesis was to study posttranslational and chemical modifications (PTM and CM) of food allergens and their interactions with biologically active plant polyphenol.

Red meat allergy is a newly discovered type of allergy with delayed symptoms and a PTM - galactose- α -1,3-galactose (α -Gal) as an epitope. Digestibility of a model protein - thyroglobulin (TG) by pepsin and presence of α -Gal on resulting peptides was studied, and the position of α -Gal containing glycan on TG was proposed. It was shown that throughout simulated gastric digestion α -Gal remains bound to IgE reactive TG peptides.

Peanut allergy is among most dangerous types of food allergies due to prevalence, persistence and symptom severity. Differences in allergenicity between raw and roasted peanuts were previously shown and might stem from differences in protein modifications. Differences in major allergen modifications between raw and roasted peanut were studied. Twenty-seven modifications were detected, 4 of which exclusively on allergens from roasted peanuts. Differences in modification profiling were found between the two protein preparations that can affect their allergenicity.

Peanut 2S albumins are compact digestion-resistant proteins, which attributes to their allergenicity. Their interactions with epigallocatechin-3-gallate (EGCG), an immunomodulatory green tea catechin that facilitates pepsin digestion of proteins were studied. The results show that binding of EGCG to these allergens induces conformational changes, and is enthalpy favorable with binding constants of 10^4 M^{-1} .

Key words: Food allergy, food allergens, peanut, red meat, α -Gal, EGCG, post-translational modifications, chemical modifications, protein-ligand interactions, proteomics

Scientific field: Chemistry

Subfield: Biochemistry

UDK number:

Sadržaj

1	Uvod	1
2	Opšti deo.....	4
2.1	Alergija na hranu	4
2.1.1	Mehanizam alergijske reakcije na hranu	4
2.1.2	Alergeni hrane i alergenost.....	6
2.1.3	Kikiriki	9
2.1.4	Crveno meso.....	12
2.2	Posttranslacione i hemijske modifikacije i njihov značaj za alergenost hrane	14
2.3	Pristupi za karakterizaciju i relativnu kvantifikaciju posttranslacionih i hemijskih modifikacija i njihovih efekata na funkcionalne osobine alergena hrane..	19
2.3.1	<i>In vitro</i> enzimski esej za procenu podložnosti alergena delovanju pepsina	19
2.3.2	Analiza uzoraka metodama proteomike	20
2.4	Interakcije alergena hrane i biološki aktivnih fenolnih jedinjenja.....	24
2.4.1	Katehini zelenog čaja.....	25
2.4.2.	Biološka aktivnost i interakcije epigalokatehin-3-galata (EGCG) sa proteinima.....	27
2.5.	Pristupi za proučavanje interakcija katehina zelenog čaja i alergena hrane	28
2.5.1.	Fluorescentna spektroskopija i gašenje fluorofora	28
2.5.2.	Spektroskopija cirkularnog dihiroizma (CD)	31
2.5.3.	Izotermalna titraciona mikrokalorimetrija.....	32
3	Ciljevi	33
4	Eksperimentalni deo	34
4.1.	Materijal.....	34
4.2.	Određivanje koncentracije proteina bicinoninskom metodom	35
4.2	<i>In vitro</i> enzimski esej – pepsinoliza.....	36

4.3.	SDS poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE).....	36
4.4.	Imunoblot.....	38
4.5.	Priprema uzoraka za proteomičku analizu.....	39
4.5.1.	Priprema uzoraka u rastvoru.....	39
4.5.2.	Priprema uzoraka isečenih iz gela.....	39
4.5.2.	Prečišćavanje uzorka na čvrstoj fazi C18.....	40
4.6.	Analiza tečnom hromatografijom veoma niskog protoka - tandem masenom spektrometrijom (nLC-MS/MS).....	41
4.7.	Analiza metodama proteomike - identifikacija i relativna kvantifikacija proteina i njihovih modifikacija.....	42
4.7.1.	Identifikacija proteina pretragom baza podataka.....	42
4.7.2.	Relativna kvantifikacija alergena hrane metodom bez obeležavanja – LFQ	42
4.7.3.	Identifikacija i profil posttranslacionih i hemijskih modifikacija.....	43
4.8.	Fluorescentna spektroskopija i gašenje fluorescencije.....	44
4.9.	Spektroskopija cirkularnog dihroizma (CD).....	44
4.10.	Izotermalna titraciona mikrokalorimetrija (ITC).....	45
4.11.	Računarske metode.....	45
4.11.2.	Preklapanje aminokiselinskih sekvenci i tercijskih struktura proteina	45
4.12.	Statistička analiza i izrada grafika.....	46
5.	Rezultati i diskusija.....	47
5.1.	α -Gal posttranslaciona modifikacija ostaje vezana za tiroglobulin i nakon pepsinske digestije.....	48
5.1.1.	Pepsinski peptidi tiroglobulina su nosioci α -Gal.....	48
5.1.2.	Analiza položaja α -Gal na pepsinskim peptidima TG-a primenom proteomike i bioinformatike.....	51

5.2. Komparativna studija posttranslacionih i hemijskih modifikacija glavnih alergena iz sirovog i pečenog kikirikija.....	57
5.2.1. Postoje razlike u proteinskim profilima između sirovog i pečenog kikirikija	57
5.2.2. Razlike u profilu modifikacija prisutnih na alergenima iz pečenog i sirovog kikirikija	59
5.2.2. Uporedna analiza modifikacija između sirovog i pečenog kikirikija <i>in silico</i> relativnom kvantifikacijom i imunoblotom sa antitelima specifičnim na modifikacije	73
5.3. 2S albumini kikirikija formiraju komplekse sa imunomodulatornim polifenolom iz zelenog čaja	81
5.3.1. Fluorescentna spektroskopija potvrđuje stvaranje kompleksa EGCG i Ara h 2	81
5.3.2. Vezivanje EGCG dovodi do promene u konformaciji i sekundarnim strukturama 2S albumina	89
5.3.3. Formiranje 2S albumin-EGCG kompleksa je praćeno egzotermnom promenom entalpije	91
6. Zaključci	94
6.1. Peptidi crvenog mesa nastali pepsinskom digestijom sadrže PTM koja je ujedno i IgE epitop - α -Gal.....	94
6.2. Pečenje kikirikija utiče na profil PTM i HM	94
6.3. EGCG u rastvoru formira kompleks sa alergenima kikirikija i utiče na njihovu konformaciju.....	96
7. Prilozi	98
7.1. Prilog 1 – proteini iz gela detektovani masenom spektrometrijom na poziciji koja odgovara Ara h 1	98
7.2. Prilog 2 – proteini iz gela detektovani masenom spektrometrijom na poziciji koja odgovara Ara h 2	99

7.3. Prilog 3 – proteini iz gela detektovani masenom spektrometrijom na pozicijama koje odgovaraju Ara h 3 kiseloj i baznoj subjedinici	100
7.4. Prilog 4 – proteini iz gela detektovani masenom spektrometrijom na poziciji koja odgovara Ara h 6	102
7.5. Prilog 5 - Proteini kikirikija i njihove modifikacije detektovane masenom spektrometrijom u ekstraktu sirovog kikirikija	103
7.6. Prilog 6 - Proteini kikirikija i njihove modifikacije detektovane masenom spektrometrijom u ekstraktu pečenog kikirikija	105
8. Literatura	107
Biografija autora	120
Изјава о ауторству	121
Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада	122
Изјава о коришћењу	123

1 Uvod

Alergija na hranu predstavlja reakciju preosetljivosti u kojoj imunski sistem reaguje na hranu koja dovodi do stvaranja IgE antitela. Alergijska reakcija izaziva simptome koji mogu biti blagi (npr. svrab, oticanje jezika i grla, rinitis), ali i veoma ozbiljni (anafilaksa) i mogu dovesti do smrti. Prema najnovijim procenama 4 – 8% svetske populacije pati od neke forme alergije na hranu (Kagan 2003), dok je u Evropi to 0,1–3,2% odraslih i 0,1–5,7% dece (Mazzucchelli, Holzhauser et al. 2018). Trenutno ne postoji efikasan tretman za alergije na hranu, te je izbegavanje hrane koja izaziva alergijsku reakciju jedini način za sprečavanje ozbiljnih posledica. Stoga je precizna i pravovremena dijagnostika nutritivnih alergija od neprocenjivog značaja (Pawankar, Walter et al. 2012). Rad u okviru ove disertacije predstavlja doprinos razumevanju posttranslacionih (PTM) i hemijskih (HM) modifikacija ključnih u alergijama na crveno meso i kikiriki, kao i u identifikaciji nekovalentnih interakcija između alergena i prirodnog fenolnog molekula epigalokatehin-3-galata (EGCG).

Alergija na crveno meso (govedina, jagnjetina i svinjetina) je novootkriveni tip odložene alergijske reakcije, sa simptomima koji se razvijaju 3 – 8 sati nakon unosa hrane (Saleh, Embry et al. 2012). Imunski sistem osoba alergičnih na crveno meso prepoznaje šećernu strukturu galaktozo-alfa-1,3-galaktozu (α -Gal) koja se nalazi na glikoproteinima i glikolipidima svih sisara osim primata (Commins and Platts-Mills 2013). Alergija na kikiriki je jedna od najopasnijih zbog svoje učestalosti, postojanosti i ozbiljnosti simptoma (Loza and Brostoff 1995). Kikiriki je široko rasprostranjena namirnica i u industriji se često koristi kao dodatak prehrambenim proizvodima. Do sada je identifikovano 17 proteina kikirikija koji izazivaju alergiju (Pomes, Davies et al. 2018). Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 i Ara h 6 se smatraju glavnim alergenima kikirikija jer izazivaju reakciju kod bar 50% pacijenata alergičnih na kikiriki (Mueller, Maleki et al. 2014).

Alergije predstavljaju veliki problem savremenog društva, a pronalaženje efikasnih pristupa za njihov tretman su izazov velikom broju naučnika. Nedovoljno izučena veza između strukture i funkcije potentnih alergena jedan je od razloga što, uprkos intenzivnim istraživanjima, za alergije još uvek ne postoji efikasan terapijski pristup. Uprkos napretku tehnologije i razvoju novih eksperimentalnih pristupa, detaljne strukturne karakteristike alergena nisu još uvek u potpunosti poznate. Nepoznanicu prvenstveno predstavljaju

posttranslacione i hemijske modifikacije na proteomima u biološkim sistemima, koje iako čine sledeći strukturni nivo nakon proteinske sekvence, su zanemarene, a one mogu bitno uticati na funkcionalne karakteristike alergena. Stoga su u okviru ove teze analizirane strukturne karakteristike alergena i veza sa funkcionalnim odgovorom koji podrazumeva i pokretanje alergijske reakcije na hranu.

Karakterizacija proteina koji izazivaju alergijske reakcije metodama proteomike i proučavanje njihovih modifikacija i interakcija sa drugim molekulima hrane doprinela bi razvoju strategija za prevenciju i lečenje alergijskih oboljenja. Nažalost, veza između tipova i pozicija modifikacija alergena i funkcionalnih osobina (poput podložnosti delovanju enzima digestivnog trakta, tolerabilnosti i alergenosti) nije u potpunosti ispitana.

Predmet istraživanja ove disertacije je detaljna karakterizacija alergena hrane. Urađena je proteomička analiza, kvantifikacija i analiza hemijskih (HM) i posttranslacionih modifikacija (PTM) alergena hrane. Pored toga, ispitane su i interakcije odabranih alergena sa značajnim biološki aktivnim molekulima, zastupljenim u ljudskoj ishrani.

Radi ispitivanja značaja koji ima α -Gal epitop u alergijskom odgovoru na crveno meso, korišćen je goveđi tiroglobulin (TG). Ovaj glikoprotein, koji se koristi u dijagnostici alergije na crveno meso, predstavlja pogodan model sistem jer sadrži 13 mesta u aminokiselinskoj sekvenci na kojima može da dođe do N-glikozilacije. Peptidi nastali u uslovima *in vitro* simulirane gastrične digestije TG su analizirani tečnom hromatografijom veoma niskog protoka - tandem masenom spektrometrijom (nLC-MS/MS) i pomoću PEAKS softverskog paketa (BSI Inc., Kanada) je provereno prisustvo α -Gal epitopa na njima. Na osnovu dobijenih podataka pretpostavljene su pozicije u aminokiselinskoj sekvenci proteina na kojima se nalazi ova modifikacija. Podaci o podložnosti/otpornosti glikoproteina na dejstvo pepsina i prisustvu/odsustvu α -Gal epitopa na oslobođenim peptidima daju bolji uvid u mehanizam alergijske reakcije odloženog tipa koja se javlja kod osoba alergičnih na crveno meso.

U okviru teze su analizirani i glavni alergeni ekstrahovani iz sirovog i termički obrađenog kikirikija. Ovi alergeni su digestovani tripsinom, što predstavlja jedan od koraka pripreme za nLC-MS/MS analizu. Dobijeni maseni spektri peptida su upoređeni sa predviđenim spektrima (dobijenim *in silico* tripsinskom digestijom proteina iz različitih proteinskih

baza) pomoću PEAKS softverskog paketa, radi identifikacije, kvantifikacije alergena i analize njihovih hemijskih i posttranslacionih modifikacija. Ovakav pristup je pokazao u kojoj meri termička obrada utiče na zastupljenost, osobine glavnih alergena kikirikija i profil modifikacija koje nose.

Spektroskopskim metodama - fluorescentna i spektroskopija cirkularnog dihroizma (CD), i metodom izotermalne titracione mikrokolorimetrije (ITC, *engl.* isothermal titration micro calorimetry) ispitane su nekovalentne interakcije koje se uspostavljaju između alergena kikirikija Ara h 2 i Ara h 6 i glavnog polifenola zelenog čaja epigalokatehin-3-galata (EGCG) i utvrđen je efekat koji vezivanje EGCG-a ima na strukturnu stabilnost ovih proteina.

Ukratko, rezultati ove teze daju uvid u: značaj koji glikozilacija α -Gal epitopom ima u otpornosti na pepsinsku digestiju; vrstu i zastupljenost modifikacija koje nose alergeni iz različito tretiranog kikirikija koje mogu biti od uticaja na nivo njihove alergenosti; i interakcije glavnih alergena kikirikija sa EGCG-om koji se povezuje sa povećanjem njihove podložnosti proteolizi u gastrointestinalnom traktu (GIT-u) i smanjenjem alergenosti.

2 Opšti deo

2.1 Alergija na hranu

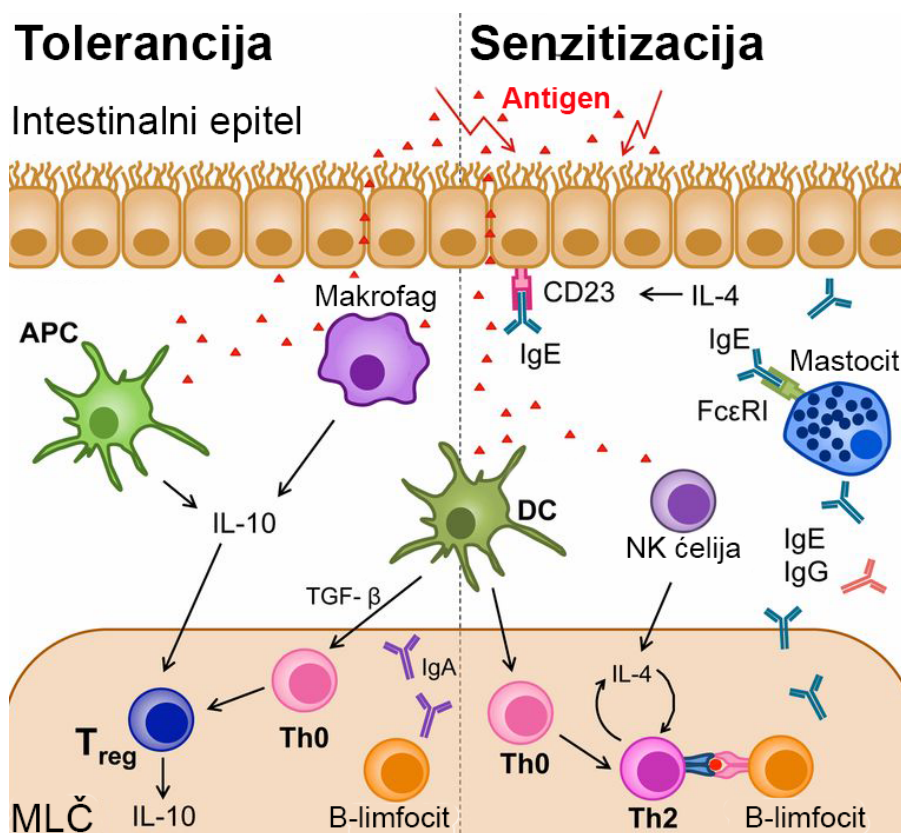
Alergija na hranu je zdravstveni problem koji pogađa značajan deo svetske populacije i nepovoljno utiče na kvalitet života. Novije studije procenjuju da ovaj tip poremećaja pogađa 0,1–3,2% odraslih i 0,1–5,7% dece u Evropi (Mazzucchelli, Holzhauser et al. 2018). Definiše se kao prekomerna i specifična reakcija imunog sistema do koje dolazi svaki put kada se unese određena hrana (Boyce, Assa'ad et al. 2010).

Simptomi koji prate IgE-posredovanu alergijsku reakciju na hranu mogu biti blagi (poput peckanja na jeziku, crvenila na koži, nadutosti i sl.), ali takođe mogu biti ozbiljni i opasni po život (oticanje grla, gušenje i anafilaktički šok). Alergije na hranu nisu zdravstveni problem za koji postoji trajnije rešenje poput leka, već se, savetuje izbegavanje hrane i prehrambenih proizvoda koji sadrže izvor alergena na koji je osoba preosetljiva ili se osoba upućuje na imunoterapiju. Mehanizmi dejstva imunoterapije i razlozi zbog kojih je kod nekih pacijenata uspešna, dok kod drugih nije i dalje nisu razjašnjeni (Satitsuksanoa, Jansen et al. 2018). Zbog toga je uveden niz mera predostrožnosti koje uključuju isticanje sastojaka koji su potencijalno alergeni na prehrambenim proizvodima. Prema evropskim odrednicama definisano je 14 izvora potentnih alergena hrane, čije prisustvo u proizvodima mora biti naznačeno i među njima su kikiriki, mleko, jaja, morski plodovi i mnogi drugi (Mazzucchelli, Holzhauser et al. 2018). Zbog svega navedenog je neophodno do detalja proučiti mehanizme koji dovode do razvoja ovog tipa imunskog odgovora, faktore koji doprinose njegovom razvoju i zbog čega procesi poput industrijske obrade ili pripreme hrane u domaćinstvima dovode do modulacije imunog odgovora.

2.1.1 Mehanizam alergijske reakcije na hranu

Do razvoja alergije na hranu dolazi u nekoliko etapa (Slika 1). Prvi korak jeste senzitivizacija koja predstavlja prvi susret imunskog sistema potencijalno alergične osobe sa alergenom hrane. Hrana dospeva do gastrointestinalnog trakta (GIT) gde potpuno ili parcijalno digestovan alergen preuzimaju antigen-prezentujuće ćelije (APC) (obično dendritične ćelije ili B-limfociti), koje ga obrađuju i u obliku peptida prezentuju na svojoj

površini vezanog za glavni kompleks tkivne podudarnosti, MHC-II (*engl.* major histocompatibility complex II). Prepoznavanje MHC-II koji nosi peptid i T-ćelijskog receptora je način na koji alergen biva prikazan naivnim T-limfocitima. Ukoliko na APC nisu eksprimirani ko-stimulatorni molekuli, prisustvo efektor (IL-10 i TGF- β) stimuliše proliferaciju regulatornih T-ćelija i modulaciju Th1/Th2 odgovora, te dolazi do razvoja tolerancije. Međutim, ako APC prikaže i ko-stimulatorne molekule na svojoj površini i ekspirira Th2 citokine dolazi do T-ćelijske aktivacije i promene klase antitela koju B-limfociti oslobađaju u IgE. Specifična antitela (sIgE) se vezuju za visokoafinitetne receptore (Fc ϵ RI) koji se nalaze na površini bazofila i mastocita, što omogućava brži imunski odgovor pri sledećem susretu sa alergenom hrane. U efektorskoj fazi dolazi do ponovnog susreta sa specifičnim alergenom, koji istovremeno vezuje više sIgE molekula. Vezivanje sIgE za Fc ϵ RI i unakrsno povezivanje preko molekula alergena, aktivira efektorske ćelije i proces degranulacije pri čemu se oslobađa histamin, hemokini, citokini i mnogi drugi molekuli čije prisustvo dovodi do upalnog procesa i oštećenja tkiva što se ispoljava kao simptomi alergijske reakcije (Valenta, Hochwallner et al. 2015).



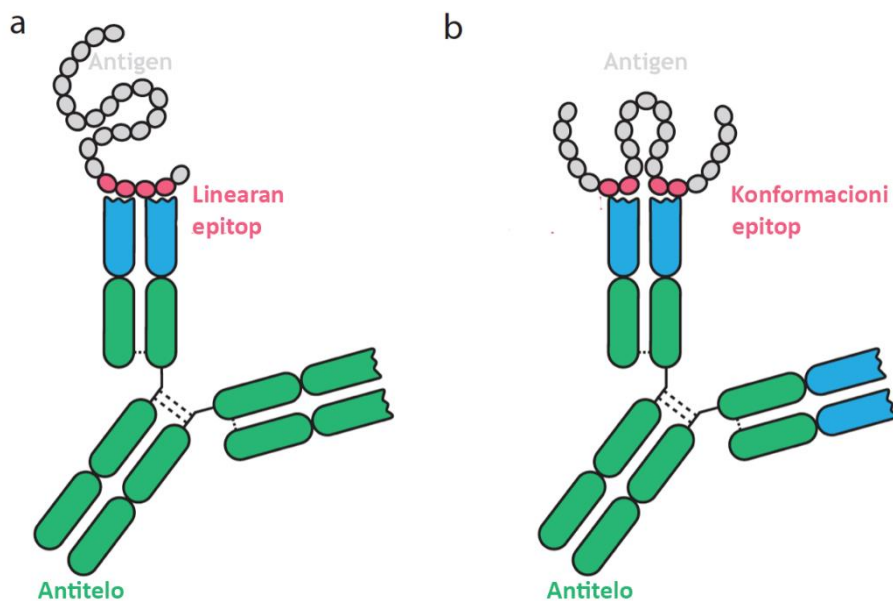
Slika 1. Mehanizmi i faze u razvoju tolerancije ili alergijskog odgovora na hranu. APC: antigen-prezentujuća ćelija, Treg: regulatorni T-limfocit, Th0: naivni T-limfocit, MLČ: mezenterični limfni čvor.

Adaptirano i preuzeto od (Johnston, Chien et al. 2014).

2.1.2 Alergeni hrane i alergenost

Učestalost alergija na različite izvore hrane je u porastu i procenjuje se da je najveća kada je u pitanju kravlje mleko (0,6%), zatim slede orašasti plodovi i soja (0,5% i 0,3%, redom), kikiriki i jaja (sa po 0,2% učestalosti) i pšenica, riba i morski plodovi (po 0,1%) (Satitsuksanoa, Jansen et al. 2018). Alergenost ili alergeni potencijal predstavlja sposobnost alergena da veže specifično IgE antitelo i izazove reakciju imunskog sistema alergične osobe.

Deo alergena za koji se veže IgE se naziva epitop i oni mogu biti proteinski i neproteinski tzv. haptan. Proteinski epitopi su nešto bolje proučeni i dele se na (i) kontinuirane ili linearne – antitelo prepoznaje primarnu strukturu proteina, odnosno određen redosled aminokiselina koji se nalazi u kontinuiranom nizu (Slika 2.A) i (ii) diskontinuirane ili konformacione – ovi epitopi se sastoje od aminokiselina koje nisu u kontinuiranom nizu u aminokiselinskoj sekvenci, ali kada je protein pravilno uvijen u tercijarnu strukturu nalaze se u neposrednoj blizini i formiraju vezivno mesto koje prepoznaje antitelo (Slika 2.B) (Forsström 2014). Neproteinski epitopi su obično šećerna ili lipidna komponenta, vezana za proteine, koji bivaju prepoznati od strane imunskog sistema i izazivaju alergijsku reakciju (Pomés, Chruszcz et al. 2015).



Slika 2. Šematski prikaz vezivanja antitela za linearni (A) i konformacioni epitop (B).
Adaptirano i preuzeto od (Forsström 2014).

Postoji niz faktora koji se dovode u vezu sa modulacijom alergnosti, međutim nije lako predvideti na koji način će isti uticati na alergeni potencijal (Satitsuksanoa, Jansen et al. 2018). Jedan od takvih faktora je termička obrada, koja može uticati na mogućnost ekstrakcije alergena i na njegove strukturne osobine. Schmitt i kolege su opsežno proučavali vezu između strukturne stabilnosti i IgE reaktivnosti kod kikirikija koji je prošao termičku obradu (kuvanje, prženje i pečenje) i došli do zabljučka da rastvorljivost i samim tim ekstraktabilnost proteina opada u slučaju svih izučavanih načina termičke obrade (u odnosu na sirovi kikiriki) i dovodi do agregacije proteina (Schmitt, Nesbit et al. 2010). Interesantno je da kuvani i prženi kikiriki imaju nižu IgE reaktivnost nego što je slučaj na pečenim (Beyer, Morrow et al. 2001). Smanjenje IgE reaktivnosti Ara h 1 u slučaju prženog i kuvanog kikirikija može se pripisati nižoj količini ekstrahovanog proteina (Beyer, Morrow et al. 2001). Međutim, Ara h 2 i Ara h 3 takođe slabije vezuju IgE nakon kuvanja ili prženja, nego nakon pečenja, iako nema značajne promene u količini ekstrahovanih proteina između pečenog, kuvanog i prženog kikirikija (Beyer, Morrow et al. 2001). Moguće je da dolazi do strukturnih promena (poput denaturacije, agregacije ili uvođenja modifikacija) usled kojih može doći do narušavanja konformacionih epitopa ili zaklanjanja linearnih epitopa uvođenjem novih funkcionalnih grupa, te je mogućnost vezivanja IgE umanjena (Schmitt, Nesbit et al. 2010). Slično

kikirikiju, do smanjenja imureaktivnosti dolazi i pri termičkoj obradi jaja. Glavni alergeni jajeta su ovalbumin (OVA), koji lako agregira prilikom termičkog tretmana i termostabilniji ovomukoid (Gal d 1), čija sposobnost vezivanja IgE opada nakon termičke obrade (Bloom, Huang et al. 2014). Sa druge strane, alergeni poreklom iz zglavkara iskazuju jaču IgE reaktivnost nakon kuvanja, nego što je to slučaj kada su sirovi (Abramovitch, Lopata et al. 2017).

U teoriji, podložnost proteina digestiji proteolitičkim enzimima bi trebalo da je obrnuto srazmerna njegovoj alergnosti. Što manji peptidi nastaju delovanjem pepsina i tripsina u GIT, to bi trebalo da je manja šansa za vezivanje više IgE molekula i njegovog povezivanja sa FcεRI koje započinje alergijsku reakciju. Pokazano je da peptidi β-laktoglobulina (BLG) iz mleka manji od 3,5 kDa nisu imunoreaktivni (Bøgh, Barkholt et al. 2013). Međutim mnogi alergeni (poput glavnih alergena kikirikija) su otporni na proteolitičku digestiju u GIT-u i kao takvi se mogu zadržati u krvotoku i do 24 sata nakon obroka (Apostolovic, Stanic-Vucinic et al. 2016). Podložnost proteolizi digestivnim enzimima je jedna od osobina alergena na koju se donekle može uticati, u cilju razvoja hipoalergenih prehrambenih proizvoda. Jedan od načina za povećanje digestibilnosti alergena hrane jeste dodavanje ekstrakta zelenog čaja, što dovodi do formiranja kompleksa između katehina i proteina, čime bi se mogao smanjiti i alergeni potencijal (Tantoush, Apostolovic et al. 2012).

Još jedan od faktora koji utiče na alergnost su modifikacije proteina – posttranslacione, hemijske i dr, nastale prirodnim putem ili tokom obrade hrane. Pojava modifikacija može strukturno izmeniti epitope, uticati na rastvorljivost alergena i uticati na otpornost na dejstvo proteolitičkih enzima. Za sada najbolje proučena modifikacija jeste glikacija koja se dešava tokom pečenja kikirikija, čiji je rezultat vezivanje redukujućih šećera za proteine kikirikija. Ovakva modifikacija doprinosi strukturnoj stabilnosti, otpornosti na digestiju (Mondoulet, Paty et al. 2005) i smatra se da je ovo razlog jačeg vezivanja IgE-a za proteine pečenog nego za proteine kikirikija koji je termički obrađen na neki drugi način (Chung and Champagne 2001). Proteini crvenog mesa na sebi nose galaktozil-α-1,3-galaktozu (α-Gal), posttranslacionu modifikaciju koja je zapravo epitop u slučaju ove forme alergije na hranu (Apostolovic, Krstic et al. 2017). Sukcinilacija glicinina iz soje utiče na promenu strukture u toj meri da dolazi do smanjenja temperaturne stabilnosti i sprečavanja agregacije ovih alergena tokom termičke obrade (Wan, Liu et al. 2018).

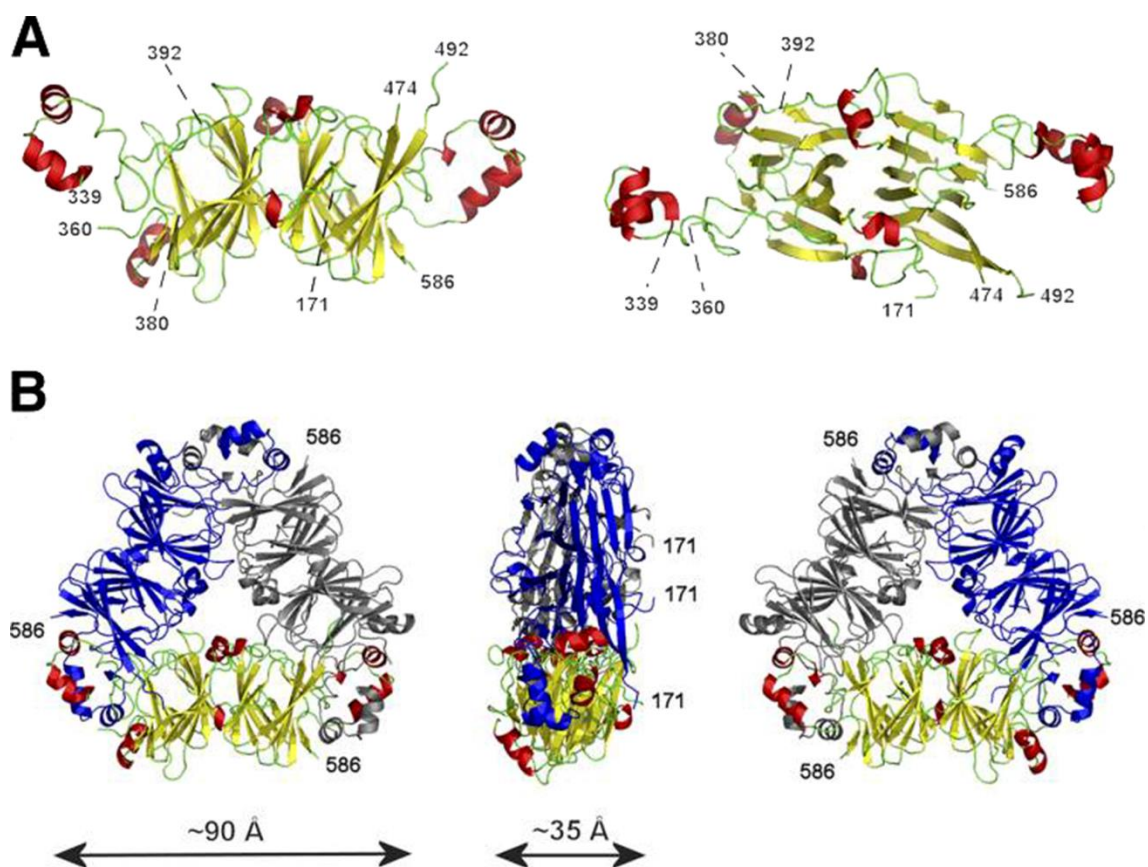
Nitrirovani BLG izaziva pojačan anafilaktički odgovor kod miševa, u odnosu na BLG koji ne nosi ovu modifikaciju, za razliku od ovomukoida iz jajeta (Diesner, Schultz et al. 2015). Paleta proteinskih modifikacija je široka i mnoge od njih mogu uticati na osobine proteina i izmeniti njihov alergeni potencijal. Štaviše, ista modifikacija može imati različit uticaj na različite alergene. Ovo je neistražena oblast, kojoj treba posvetiti pažnju i za početak, otkriti koje su to modifikacije prisutne u svežoj hrani, a koje u tretiranoj i u kojoj meri.

2.1.3 Kikiriki

Kikiriki je široko rasprostranjena namirnica, koja se koristi samostalno, kao dodatak jelima i kao aditiv u raznim oblicima u prehrambenoj industriji. Međutim kikiriki spada među veoma alergene namirnice i stoga se nalazi na evropskoj listi 14 najsnažnijih izvora alergena hrane (Mazzucchelli, Holzhauser et al. 2018) i alergija na kikiriki je okarakterisana kao jedna od najopasnijih zbog svoje učestalosti, postojanosti i ozbiljnosti simptoma (Loza and Brostoff 1995). Pod-komitet nomenklature alergena Internacionalne Unije Imunoloških Društava (ANSCUIS, *engl.* Allergen Nomenclature Sub-committee of the International Union of Immunological Societies) navodi 17 alergena kikirikija, imenovanih Ara h 1-17 (dostupno na URL http://www.allergen.org/search.php?allergen_source=Arachis+hypogaea). Alergeni kikirikija se prema strukturi mogu svrstati u 7 proteinskih familija: kupine (Ara h 1 i 3), prolamine (Ara h 2, 6, 7, 9, 16, 17), profiline (Ara h 5), proteine srodne Bet v-1 (Ara h 8), oleozine (Ara h 10, 11, 14) i defenzine (Ara h 12, 13) (Mueller, Maleki et al. 2014). Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 i Ara h 6 se smatraju glavnim alergenima kikirikija jer izazivaju reakciju kod bar 50% pacijenata alergičnih na kikiriki (Mueller, Maleki et al. 2014), te je eksperimentalni rad u okviru ove disertacije bio fokusiran baš na ove alergene.

Kupini su superfamilija proteina koji, iako ne dele sličnost u aminokiselinskoj sekvenci, imaju karakterističnu strukturu koja se sastoji pretežno od β -pločica koje formiraju β -bure na osnovu čega je familija i dobila ime (*engl.* cupin od *lat.* Cupa - bure) (Dunwell, Purvis et al. 2004). Ovoj superfamiliji pripadaju Ara h 1 (vicilin ili 7 S globulin) i Ara h 3 (legumin, ili 11 S globulin) (Chruszcz, Maleki et al. 2011). Ara h 1 je protein od 65 kDa koji se sastoji od 2 domena (2 β -bureta, oivičena α -heliksima) i formira trimer (Slika 3),

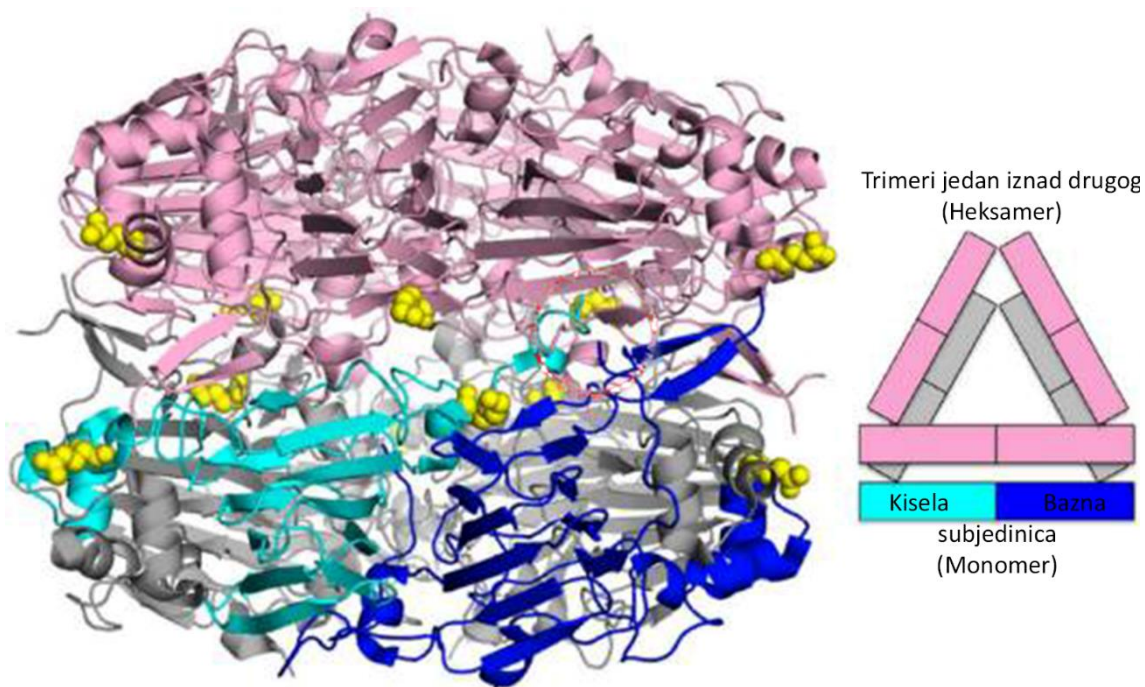
uz mogućnost formiranja i većih oligomera. Pri termičkoj obradi Ara h 1 oligomeri se dodatno stabilizuju (Maleki, Chung et al. 2000). Studija rađena na Ara h 1 prečišćenom iz kikirikija nagoveštava da ovaj alergeni nije otporan na dejstvo digestivnih enzima, te već nakon 4 minuta simulirane želudačne digestije daje fragmente manje od 25 kDa (Chruszcz, Maleki et al. 2011). Čak i u slučaju digestije proteinskog ekstrakta kikirikija, Ara h 1 ostaje celovit nakon 2 sata simulirane želudačne digestije (Prodic, Stanic-Vucinic et al. 2018). Iako se Ara h 1 lako hidrolizuje u GIT, on vezuje IgE iz seruma 90% pacijenata alergičnih na kikiriki (Burks, Cockrell et al. 1995, Zhou, Wang et al. 2013).



Slika 3. Struktura Ara h 1 monomera (A) i trimera (B). U slučaju monomera β-pločice su prikazane žutom bojom, dok su α-heliksi crvenom. U slučaju trimera svaki monomer je prikazan drugom bojom – plavom, sivom i kombinacijom žute i crvene.

Adaptirano i preuzeto od (Chruszcz, Maleki et al. 2011).

Ara h 3, poznat i kao 11 S globulin ili legumin je inicijalno identifikovan kao protein veličine 14 kDa, iako je zapravo mnogo kompleksniji (Koppelman, Hefle et al. 2010). Ovaj je protein veličine približno 60 kDa i gradi heksamere, tako što formira trimere u ravni, koji se u prirodi nalaze jedan iznad drugog. Ara h 3 monomer se sastoji od 2 podjedinice: (i) baznog N-terminusa i (ii) kiselog C-terminusa (Slika 4) koje su povezane disulfidnim mostovima. Međutim, prečišćeni Ara h 3 na elektroforezi daje set traka usled *in vivo* delovanja proteolitičkih enzima u kikirikiju – 3 trake se nalaze na 42-45 kDa, jedna na ~25 kDa i trake nešto slabijeg intenziteta na 12-18 kDa (Piersma, Gaspari et al. 2005). Slično Ara h 1 i Ara h 3 podleže pepsinskoj hidrolizi u uslovima simulirane želudačne digestije (Koppelman, Hefle et al. 2010). Nivo specifičnih IgE antitela na ovaj alergen je kod američkih pacijenata nešto niži od onih na Ara h 1 ili Ara h 2 (Vereda, van Hage et al. 2011).



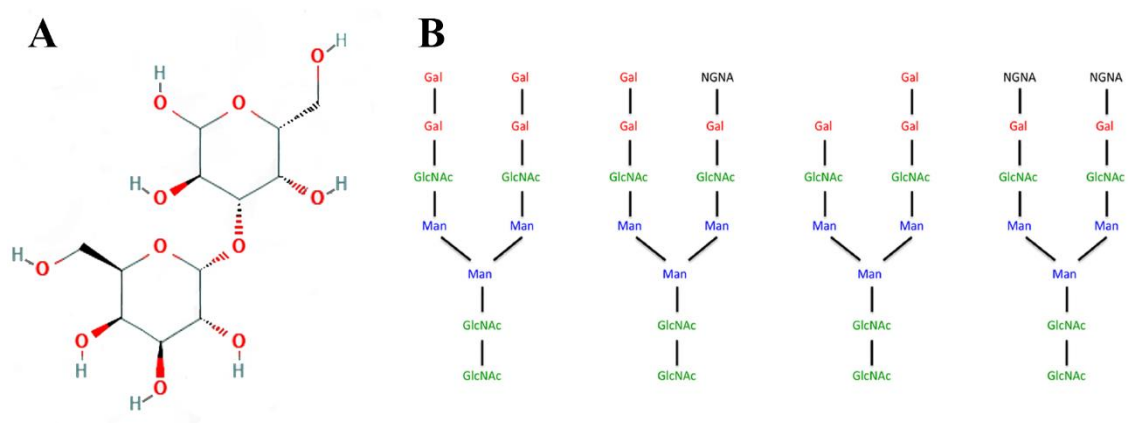
Slika 4. Model (levo) i geometrija (desno) Ara h 3 heksamera. Trimer na vrhu je prikazan roze bojom, dok se trimer na dnu sastoji od 2 sivo prikazana monomera i jednog dvobojnog, tako da je kisela subjedinica prikazana tirkiznom, a bazna plavom bojom. Mesta glikozilacije su prikazana žutom bojom.
Adaptirano i preuzeto od (Chruszcz, Maleki et al. 2011).

Prolamini su proteinska superfamilija kojoj pripadaju preostala dva glavna alergena kikirikija - Ara h 2 i Ara h 6 (Kulis, Chen et al. 2012). Pored 2 S albumina (među koje se svrstavaju i Ara h 2 i 6), ovoj superfamiliji pripadaju i inhibitori tripsina i nespecifični proteini za transfer lipida (Chruszcz, Maleki et al. 2011). 2S albumini kikirikija su proteini koji se skladište u semenima i jedna od zajedničkih karakteristika im je prisustvo 8 do 10 cisteina u aminokiselinskoj sekvenci (Breiteneder and Radauer 2004). Ara h 2 i Ara h 6 među sobom dele relativno visok stepen strukturne homologije (Chruszcz, Maleki et al. 2011) i ukršteno su reaktivni (Kulis, Chen et al. 2012). Ara h 2 i Ara h 6 dele 59% sličnosti u ak sekvenci, dok je ovaj udeo još viši u slučaju sekundarnih struktura (75%) (Chruszcz, Maleki et al. 2011). Ara h 6 (15 kDa) se u prirodi nalazi kao monomer, kompaktne strukture koja se sastoji od 6 α -heliksa, stabilizovane sa 5 disulfidnih mostova, što je pokazano metodom nuklearne magnetene rezonance (NMR) (Lehmann, Schweimer et al. 2006). Ara h 2 je protein prisutan u četiri genske izoforme Ara h 2.0101, Ara h 2.0102, Ara h 2.0201, Ara h 2.0202. Ara h 2.01 izoforme (16 kDa) se razlikuju od Ara h 2.02 izoformi (18 kDa) jer im nedostaje sekvenca od 12 aminokiselina koja se nalazi između α -heliksa H2 i H3 (Burks, Williams et al. 1992). Struktura Ara h 2, koja je rešena kristalografijom, sastoji se od 5 α -heliksa, koji su povezani sa 4 disulfidna mosta (Mueller, Gosavi et al. 2011). Kompaktna struktura 2 S albumina doprinosi njihovoj stabilnosti i otpornosti prema digestivnim enzimima, što doprinosi očuvanju imunodominantnih IgE epitopa u fiziološkim uslovima poput onih u GIT (Sen, Kopper et al. 2002). Pored toga, jedna od poznatih funkcija Ara h 2 jeste inhibicija tripsina koja se pojačava nakon pečenja kikirikija (Maleki, Viquez et al. 2003). Ara h 2 i Ara h 6 se smatraju najpodesnijim proteinima za predviđanje ozbiljnosti alergijske reakcije na kikiriki (Kukkonen, Pelkonen et al. 2015).

2.1.4 Crveno meso

Alergija na crveno meso (govedinu, svinjetinu, jagnjetinu) je novootkriveni tip alergije, za koji je karakterističan kasna pojava simptoma. Dok se u drugim slučajevima alergija na hranu simptomi pojavljuju 5 – 30 min nakon unosa (Hourihane, Kilburn et al. 1997), (Hansen and Bindslev-Jensen 1992), (Moneret-Vautrin 1999), kod alergije na crveno

meso se simptomi javljaju nakon 3 – 6 sati (Commins, Satinover et al. 2009). Mehanizam ovog tipa alergije nije potpuno razjašnjen, ali se smatra da je ovaj tip alergije posredovan specifičnim IgE antitelima koja prepoznaju šećernu posttranslacionu modifikaciju galaktozil- α -1,3-galaktozu, koja se nalazi na glikoproteinima i glikolipidima svih sisara osim primata (Commins and Platts-Mills 2013). α -Gal jedinica (Slika 5A) se obično nalazi vezana za protein u okviru oligosaharidne komponente koja može biti kombinacija različitih monosaharida (Slika 5B) (Steinke, Platts-Mills et al. 2015). Za sada nije poznato da li α -Gal modifikacija ostaje vezana nakon gastrointestinalne digestije za fragmente proteina koji ih sadrže. Kod proteina koji se izučavaju kao modeli za alergiju na crveno meso (Thall and Galili 1990, Hamsten, Tran et al. 2013) nije poznata pozicija α -Gal, niti da li ova modifikacija ostaje vezana za protein.



Slika 5. A. Struktura galaktozil- α -1,3-galaktoze (α -Gal). **B.** Primer struktura oligosaharida u čijem se sastavu nalazi α -Gal (Gal-Gal). Gradivni elementi: galaktoza (crveno), manozna (plavo), N-acetil-glukozamin (zeleno) i N-glikolilneuraminska kiselina (crno). Adaptirano i preuzeto ^Asa (Information 2007) i ^Bod (Steinke, Platts-Mills et al. 2015).

2.2 Posttranslacione i hemijske modifikacije i njihov značaj za alergičnost hrane

Posttranslacione modifikacije (PTM) predstavljaju izmenu proteina, obično (ali ne nužno) enzimskim putem tokom ili nakon biosinteze. Hemijske modifikacije (HM) proteina hrane nastaju tokom starenja (ili sazrevanja), pod uticajem faktora iz okoline, procesa pripreme, poput termičke obrade i sl. Modifikacije koje nastaju tokom starenja hrane se dešavaju na najreaktivnijim bočnim ostacima aminokiselina i između ostalih, uključuju procese oksidacije, redukcije, nukleofilne i elektrofilne supstitucije (Feeney, Yamasaki et al. 1982). Među najčešće modifikovane ostatke spadaju hidroksilne grupe Ser i Thr, fenolna grupa Tyr, ϵ -amino grupa Lys, guanidino grupa Arg, tiolna grupa cisteina, karboksilna grupa Asp i Glu, kao i N- i C-terminusi proteina. N-glikani se često vezuju za protein preko asparagina (Asn) (Boyer 2006). Bočnim lancima aminokiselina se posttranslaciono ili hemijski može dodati čitav niz različitih grupa – od malih (fosfo-, acetil-, metil-grupe) do većih (šećerna, lipidna komponenta i sl.).

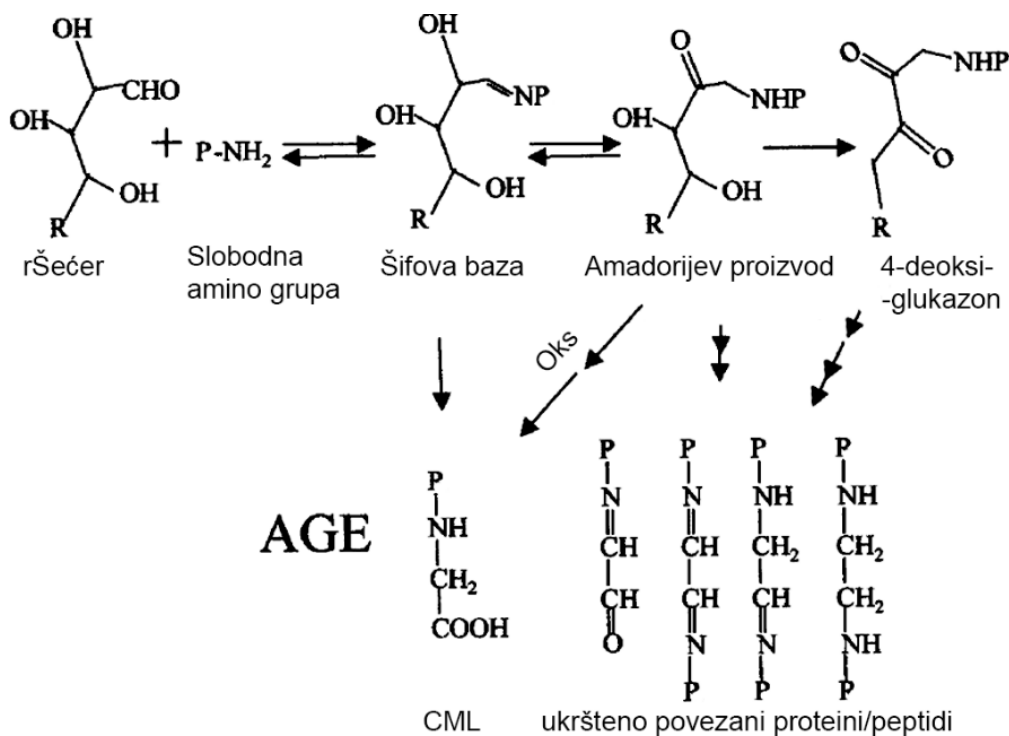
Modifikacije koje nastaju na bočnim ostacima aminokiselina mogu uticati na strukturu proteina, interakcije koje uspostavlja, stabilnost, podložnost dejstvu digestivnih enzima, alergični potencijal i mnoge druge funkcionalne osobine. Višestruka acetilacija se povezuje sa povećanjem uređenosti u sekundarnim strukturama proteina, smanjenjem ukupnog naelektrisanja proteina i povećanjem hidrofobnosti (Winogradoff, Echeverria et al. 2015). Izostanak hidroksilacije prolina kod linearnih epitopa Ara h 2 dovodi do slabijeg vezivanja IgE (Bernard, Guillon et al. 2015). Stvaranje izo-aspartata, usled npr., deamidacije Asn, dovodi se u vezu sa povećanjem spontane degradacije proteina (Aswad, Paranandi et al. 2000).

Glikozilacija je među najrasprostranjenijim PTM i utiče na mnoge funkcije proteina. Kod alergična na hranu N-glikani vezani za glikoproteine mogu predstavljati IgE epitope (van Ree 2002) i jedan takav je galaktozil- α -1,3-galaktoza (α -Gal) u slučaju alergična na crveno meso. Mnogi α -Gal sadržavajući proteini koji mogu da vežu IgE pacijenata alergičnih na crveno meso su termostabilni i zadržavaju imunoreaktivnost i nakon termičkog tretmana (Apostolovic, Tran et al. 2014, Hilger, Fischer et al. 2016). Poznato je da mnogi alergični hrane ne podležu hidrolizi digestivnim enzimima, što se smatra da doprinosi njihovoj alergičnosti (Astwood, Leach et al. 1996, Moreno 2007, Prodic, Stanic-Vucinic et al.

2018). Posttranslacione modifikacije mogu imati uticaj na podložnost proteolizi proteina hrane. Nakon deglikozilacije ovomukoid postaje podložniji simuliranoj digestiji i kod većine alergičnih pacijenata slabije vezuje IgE (Benede, Lopez-Fandino et al. 2013).

Goveđi tiroglobulin je često korišćen model protein u studijama alergije na crveno meso zbog toga što sadrži veliki broj α -Gal i N-glikolil-neuraminske kiseline (sialinska kiselina ili Neu5Gc) (Thall and Galili 1990, Hamsten, Tran et al. 2013). Tiroglobulin se u prirodi nalazi u formi dimera (660 kDa) i na sebi sadrži 13 mesta glikozilacije (Mercken, Simons et al. 1985, Rawitch, Pollock et al. 1993). Glikani su preko N-acetilglukozamina (GlcNAc) vezani glikozidnom vezom za asparagin tiroglobulina. Tri vrste glikana su vezane za TG – kompleksni, hibridni i oligosaharidi sa visokim sadržajem manoze (Spiro and Bhoyroo 1984, Zhang, Zhao et al. 2004). Smatra se da se α -Gal vezan za TG nalazi u sastavu složenih i/ili hibridnih glikana, ali nije poznato da li to utiče na odlaganje alergijskog odgovora.

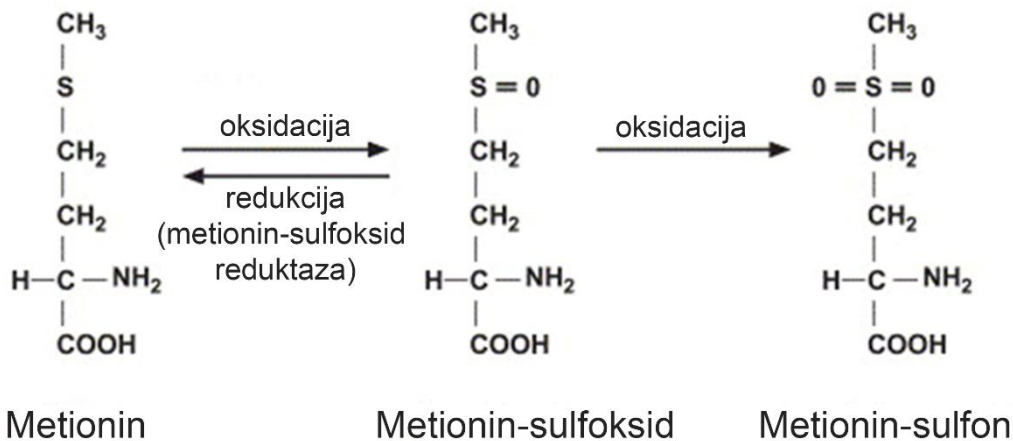
Tokom termičke obrade hrane dolazi do oksidacije proteina, kao i do formiranja Majarovih (Maillard-ovih) proizvoda. Majarova reakcija je proces koji se odvija na bilo kojoj temperaturi, ali na povišenim, pogotovo prilikom suvog pečenja, dolazi do ubrzavanja ove neenzimske reakcije između redukujućih šećera i slobodne amino-grupe (Lys, N-terminus) ili guanidino-grupe (Arg) proteina. Na ovaj način nastaje N-supstituisani glikozilamin, tzv. Šifova (Schiff-ova) baza, koja nakon rearanžmana daje Amadorijev proizvod. Daljim premeštanjem, reakcijama ciklizacije i dehidratacije nastaje niz krajnjih proizvoda glikacije (AGE, *engl.* Advanced glycation end products) i dolazi do povezivanja proteina/peptida (Slika 6). Među najčešće AGE proteina hrane spadaju karboksi-metil-lizin (CML), karboksi-etil-lizin (CEL), piralin (pirol-aldehid) i pentozidin (Poulsen, Hedegaard et al. 2013).



Slika 6. Mehanizam Majarove reakcije - formacija krajnjih proizvoda glikacije (AGE) i ukršteno povezivanje proteina/peptida (P). Adaptirano i preuzeto od (Maleki, Chung et al. 2000).

Ukršteno povezivanje proteina i prisustvo ove vrste modifikacija na ostacima Lys i Arg može otežati razgradnju proteina u GIT, zbog prostornog zaklanjanja mesta sečenja digestivnih enzima (Salazar-Villanea, Butré et al. 2018). Prisustvo Majarovih proizvoda se kod proteina mleka povezuje sa povećanom alergenošću (Kaminogawa, Kumagai et al. 1984). Pečeni kikiriki izaziva jači alergeni odgovor nego što je slučaj sa sirovim i smatra se da AGE doprinose ovoj razlici (Maleki, Chung et al. 2000).

Oksidativne modifikacije poput oksidacije metionina (Met, M), prolina (Pro, P) i deamidacije asparagina (Asn, N) i glutamina (Gln, Q) na proteinima hrane mogu nastati tokom dugog skladištenja ili procesa obrade. Aminokiseline koje sadrže sumpor (Met i Cys) su čak i u blagim uslovima veoma podložne oksidaciji u prisustvu reaktivnih kiseoničnih vrsta (Berlett and Stadtman 1997). Metionin se može oksidovati u dve faze (i) do metionin-sulfoksida, koji se delovanjem metionin-sulfoksid reduktaze može redukovati nazad do Met u ćeliji i (ii) do metionin-sulfona (Slika 7.)



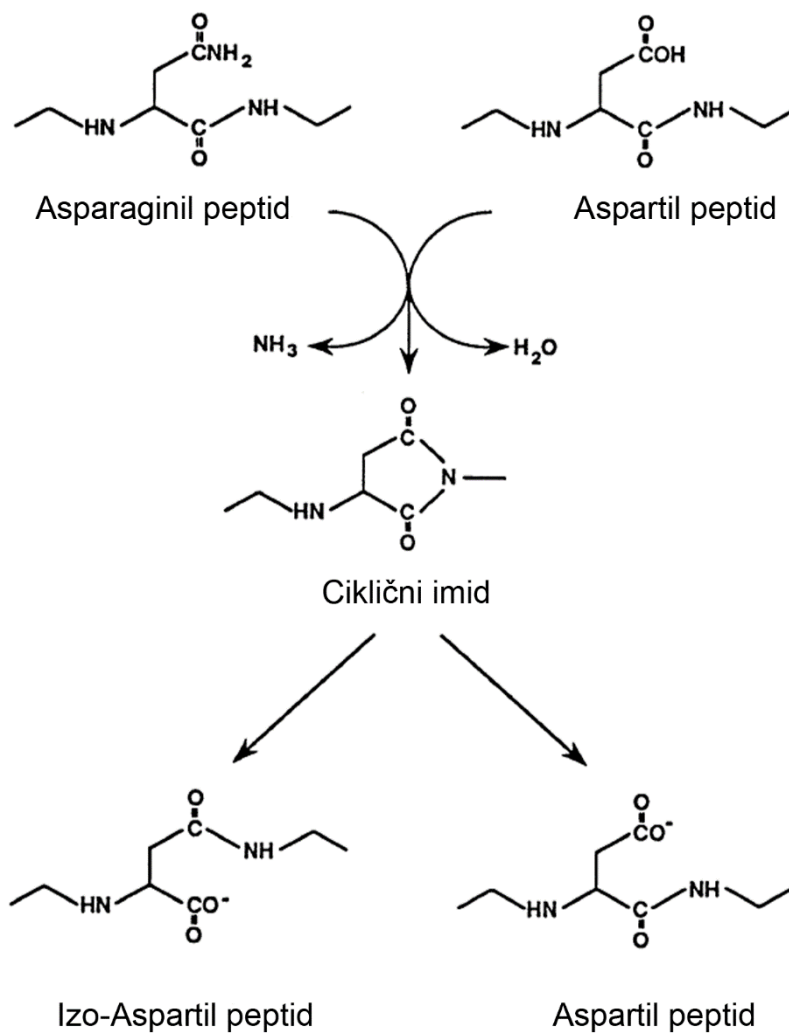
Slika 7. Faze u reakciji oksidacije metionina. Adaptirano i preuzeto od (Weissbach, Resnick et al. 2005).

Prolin se ubraja među aminokiselinske ostatke koji lako podležu oksidaciji. Prolin se u prisustvu reaktivnih kiseoničnih vrsta oksiduje do pirolidona i može dovesti do raskidanja peptidne veze, uz nastanak peptida koji na svom C-terminusu sadrži pirolidon (Slika 8) (Berlett and Stadtman 1997).



Slika 8. Reakcija formiranja pirolidona od prolina uz raskidanje peptidne veze, u prisustvu reaktivnih kiseoničnih vrsta ($\cdot\text{OH}$, $\text{HO}_2\cdot$). R1, R2 – N- i C- terminalne aminokiselinske sekvence. Adaptirano i preuzeto od (Berlett and Stadtman 1997).

Deamidacija je modifikacija kod koje dolazi do zamene amino grupe hidroksilnom grupom kod asparagina i glutamina. Bočni ostaci ovih amino kiselina se u blagim uslovima preko cikličnog imida transformišu u smešu aspartata i izo-aspartata (Slika 9), odnosno glutamata i izo-glutamata. Izo-aspartat (samim tim i aspartat) su podložniji deamidaciji nego glutamin. Ova vrsta modifikacije se povezuje sa neenzimskom degradacijom peptida i proteina u blagim uslovima (Aswad, Paranandi et al. 2000).



Slika 9. Faze u reakciji deamidacije asparagina. Adaptirano i preuzeto od (Aswad, Paranandi et al. 2000).

2.3 Pristupi za karakterizaciju i relativnu kvantifikaciju posttranslacionih i hemijskih modifikacija i njihovih efekata na funkcionalne osobine alergena hrane

2.3.1 *In vitro* enzimski esej za procenu podložnosti alergena delovanju pepsina

Jedna od osobina koja je zajednička mnogim alergenima hrane jeste otpornost na delovanje pepsina u uslovima simulirane digestije u želucu. Nakon delimične digestije pepsinom u želucu, nastali fragmenti alergena hrane sa očuvanim lineranim i/ili konformacionim epitopima dospevaju do tankog creva gde preko mukoze mogu biti apsorbovani, nakon čega izazivaju kaskadu koja dovodi do simptoma alergijske reakcije (Astwood, Leach et al. 1996). Kod pacova je pokazano da peptidi BLG nastali delovanjem digestivnih enzima imaju značajno nižu IgE, IgA i IgG1 reaktivnost nego nedigestovan BLG (Bogh, Barkholt et al. 2013). Protein iz heljde od 16 kDa, otporan na dejstvo pepsina izaziva ozbiljne simptome poput anafilakse kod alergičnih osoba (Tanaka, Matsumoto et al. 2002). Nakon simulirane želudačne digestije proteina iz bakalara, IgE reaktivnost je opala za preko 10.000 puta (Untersmayr, Poulsen et al. 2005). Stoga je veoma bitno istražiti podložnost alergena hrane delovanju digestivnih enzima i izučiti očuvanost epitopa na rezultujućim peptidima.

Kod osoba alergičnih na crveno meso IgE antitela se ne vezuju za aminokiselinski epitopp, već za α -Gal glikan vezan za protein (Apostolovic, Tran et al. 2015). Za sada nije poznato da li peptidi nastali delovanjem pepsina na sebi nose α -Gal modifikaciju, ili ona u tim slučajevima nije prisutna. Sposobnost ove modifikacije da ostane vezana sa peptid nastao dejstvom pepsina je od presudnog značaja u alergiji na crveno meso.

In vitro enzimski esej se radi tako što se imitiraju uslovi u želudcu, uz odnos količine enzim : supstrat koji je približan fiziološkom (1:20, w/w) (Moreno, Mellon et al. 2005). Reakciona smeša se inkubira na 37 °C i tokom reakcije se uzimaju alikvoti u različitim vremenskim intervalima. Nakon 2 sata reakcija se zaustavlja podizanjem pH smeše do 7,5 jer u ovim uslovima pepsin nije aktivan.

2.3.2 Analiza uzoraka metodama proteomike

Proteomika predstavlja pristupe koji mogu istovremeno da istraže i okarakterišu sve proteine i njihove modifikacije pojedinih ekstrakata ćelija, tkiva ili organizma, odnosno, njihovih proteoma. Ovaj tip analize se sastoji od tri osnovne faze: (i) pripreme uzorka, (ii) analize masenim spektrometrom (najbolje sa visokom rezolucijom zbog detekcije modifikacija) uz fragmentaciju i (iii) obrade dobijenih MS/MS spektara softverskim paketima i algoritmima za identifikaciju, relativnu kvantifikaciju proteina i analizu modifikacija koje nose.

2.3.3.1. Faza I - Priprema uzoraka za analizu metodama proteomike

Pre analize masenom spektrometrijom proteinski ekstrakt (proteom) mora proći pripremne korake tokom koje se proteini digestuju do peptida adekvatne veličine radi lakše analize i kasnije identifikacije proteina i uklanjaju se nečistoće koje bi mogle da otežaju bilo koji od koraka u snimanju MS/MS spektara. Priprema može i ne mora uključivati elektroforetsko razdvajanje uzorka, tako da se dalji koraci enzimske digestije odvijaju u gelu ili rastvoru, redom. Uzorak mora proći proces redukcije disulfidnih mostova i zaštitu slobodnih tiolnih grupa da ne bi došlo do njihove izmene. Ovim koracima se omogućava delimično razvijanje proteina, što olakšava tripsinu da dopre do specifičnih mesta sečenja peptidnih veza (C-terminus Arg i Lys). Tripsin specifično seče proteine iza lizina (Lys, K) i arginina (Arg, R), osim kada im prethodi prolin (Pro, P). Delovanjem tripsina nastaju peptidi dužine 10 – 20 aminokiselinskih (ak) ostataka, koji na sebi nose bar dva pozitivna naelektrisanja. Uzorci dobijeni na ovaj način prolaze korak prečišćavanja na čvrstoj fazi (obično reverzno-fazni matriks C18) tokom kog se uklanjaju soli, šećeri, lipidni molekuli ili zaostali komadići gela (u slučaju pripreme u gelu) (Shevchenko, Tomas et al. 2006). Ovakvi peptidi lako jonizuju i efikasno ulaze u maseni spektrometar gde se odvija sledeća faza proteomičke analize.

2.3.3.2. Faza II – analiza tandem masenom spektrometrijom visoke rezolucije

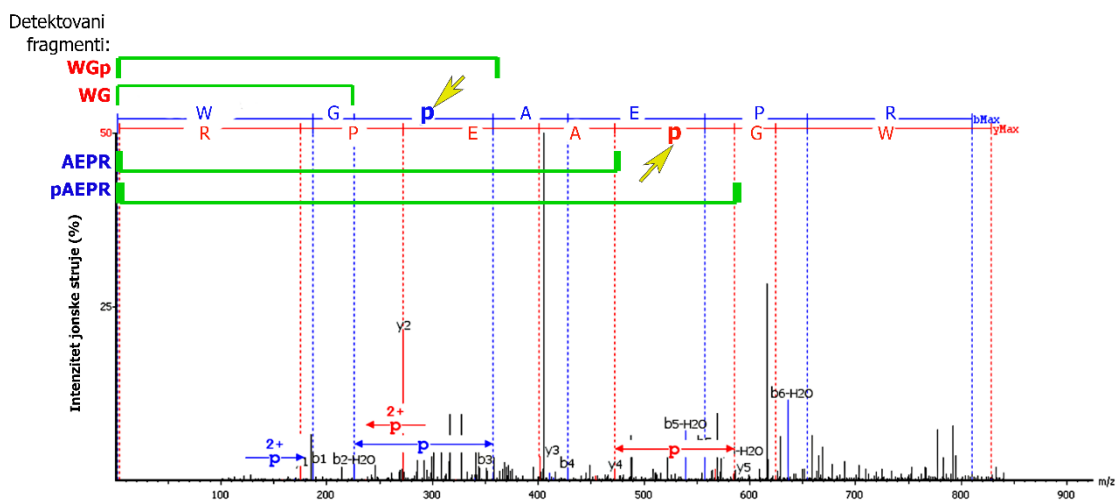
Masena spektrometrija (MS) je metoda koja je poslednjih decenija veoma uznapredovala i smatra se nezaobilaznom kada je u pitanju identifikacija i karakterizacija proteina, modifikacija koje nose i protein-protein interakcija. Tok MS analize se uopšteno sastoji od nekoliko koraka: (i) jonizacije uzorka, (ii) analize jonizovanih molekula na osnovu odnosa masa/naelektisanje (m/z) uz ili bez fragmentacije, (iii) detekcije jonske struje jonizovanih molekula i (iv) snimanja masenih spektara. Postoji više vrsta jonizacije, ali se najčešće koriste dva meka tipa jonizacije - matricom potpomognuta laserska desorpcija/jonizacija (MALDI, *engl.* matrix-assisted laser desorption/ionization) i elektro sprej jonizacija (ESI, *engl.* electrospray ionization). ESI je pogodnija metoda zbog toga što se jonizacija odigrava u rastvoru, te je moguća pre-frakcionacija uzorka tečno-hromatografski i zbog toga što ne postoji mogućnost kontaminacije jonima iz matrice, kao što je slučaj kod MALDI-a. Metode fragmentacije koje se uobičajeno primenjuju radi dobijanja tandem MS spektara (MS/MS) su disocijacija izazvana sudarima (CID, *engl.* collision induced dissociation), disocijacija izazvana sudarima visoke energije (HCD, *engl.* high energy collision induced dissociation), disocijacija uz premeštanje elektrona (ETD, *engl.* electron transfer dissociation). CID je u slučaju detekcije modifikacija korisna metoda zbog toga što dovodi do fragmentacije na mestu peptidne veze, tako da malo utiče na bočne ak ostake koji su nosioci modifikacija. Po potrebi se navedene metode fragmentacije mogu kombinovati za postizanje bolje pokrivenosti proteinske sekvence i detekciju specifičnih modifikacija (Silva, Vitorino et al. 2013). Maseni analizatori koji se u poslednje vreme primenjuju su tipa kvadrupola, jonske zamke i oni sa jon ciklotronskom rezonancijom ili FTMS (*engl.* Fourier transform mass spectrometry). Sve je češća primena tzv. hibridnih instrumenata koji se sastoje od dva analizatora, jer se time kombinuju pozitivne osobine oba. Primer je hibridni maseni spektrometar LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific Inc., Nemačka) koji kombinuje mogućnost brze analize, filtracije jona i CID fragmentacije u lineranoj jonskoj zamci tipa kvadrupol i analize visoke rezolucije u jonskoj zamci tipa orbitrap (Kalli, Smith et al. 2013). Stoga je u daljem tekstu opisana strategija prikladna za karakterizaciju proteina i njihovih modifikacija primenom hibridnog masenog spektrometra, jonizacijom tipa ESI i CID fragmentacijom, uz prethodno hromatografsko razdvajanje uzorka.

Nakon koraka opisanih u prethodnom odeljku (*faza I*) tripsinki digest se dalje analizira tandem masenom spektrometrijom visoke rezolucije uz prethodno razdvajanje tečnom hromatografijom pri izuzetno niskom protoku (nLC-MS/MS). Uzorak se hromatografski razdvaja u reverzno-faznom sistemu sa dve kolone: (i) pretkolona koja funkcioniše kao filter i uklanja eventualno zaostale nečistoće i (ii) analitička kolona koja razdvaja smešu peptida na osnovu hidrofobnosti. Razdvojeni peptidi bivaju jonizovani metodom elektro sprej jonizacije, nakon čega ulaze u maseni spektrometar. Maseni spektrometar detektuje frekvenciju kretanja jona, na osnovu koje se izračunava jonska struja koja se Furijeovom (Fourier-ovom) transformacijom preračunava u odnos masa/naelektrisanje (m/z) u zavisnosti od vremena, iscrtavajući jonski hromatogram. Maseni spektrometar prvo snima spektre visoke rezolucije roditeljskih jona (nefragmentisanih peptida), a zatim se oni fragmentišu CID metodom i snimaju se fragmentacioni spektri nešto niže rezolucije (Sun, Zhu et al. 2013). Ovako nastaje dokument koji se sastoji od više hiljada spektara analiziranog uzorka, koji se dalje obrađuje adekvatnim algoritmima u okviru softverskih paketa.

2.3.3.3. Faza III – Identifikacija, relativna kvantifikacija proteina i analiza modifikacija na osnovu masenih spektara

Algoritmi za analizu masenih spektara, identifikaciju i karakterizaciju proteoma su dostupni ili samostalno (poput Mascot/Matrixscience (Brosch, Swamy et al. 2008), X!Tandem (Brosch, Swamy et al. 2008) i MaxQuant (Cox and Mann 2008)) ili u okviru programskih paketa poput PEAKS Studio (Tran, Qiao et al. 2019) ili Proteome Discoverer (Xiao, Zhang et al. 2016). U sastav programskih paketa ulazi veći broj algoritama specijalizovanih za različite funkcije. PEAKS DB (u okviru PEAKS Studio) i Sequest (u okviru Proteome discoverer) algoritmi na osnovu dobijenih masenih spektara (peptida i njihovih fragmenata) pretražuju proteinsku bazu podataka i na osnovu poklapanja identifikuju proteine prisutne u uzorku. PEAKS PTM algoritam na osnovu razlike u m/z odnosu prisutne kako u okviru spektra peptida tako i u okviru fragmentacionih spektara identifikuje post-translacione i druge modifikacije. Tačna pozicija date modifikacije se određuje na osnovu fragmentacionih spektara. Slika 10 daje primer fragmentacionog spektra peptida WG**p**AEPR, koji pripada alergenu kikirikija Ara h 1, sa hidrosilovanim prolinom u sredini sekvence (prikazan malim slovom **p**).

Primenom CID metode peptid je fragmentisan tako da je dao fragmente koji u svom sastavu sadrže hidroksilovani Pro na C-terminusu (WGp) i na N-terminusu (pAEPR), kao i fragmente nastale prekidom peptidne veze sa N-terminalne (WG) i sa C-terminalne strane modifikovane amino kiseline (Slika 10). Time se uklanja sumnja da prolin koji se nalazi bliže C-terminusu peptida nosi hidroksilaciju.



Slika 10. Fragmentacioni spektar peptida ak sekvence WGpAEPR, gde p označava hidroksilovani prolin. Žute strelice označavaju poziciju modifikacije, na osnovu detektovanih fragmenata koji su obeleženi zelenom uglastom linijom.

Nakon koraka opisanih u prethodnom odeljku (*faza II*) dobijeni dokument sa masenim spektrima se učitava u programski paket za pretragu proteinskih baza podataka i proteomičku analizu. Programu se zadaje proteinska baza podataka koja se obično sastoji od proteinskih sekvenci poreklom od jednog organizma, odnosno roda, familije ili reda ukoliko je organizam slabo okarakterisan. Pored baze unose se i parametri pretrage – korišćeni MS instrument, dozvoljene greške merenja, tip fragmentacije, korišćeni enzim (tripsin), broj dozvoljenih grešaka enzima i statičke i dinamičke modifikacije. Na osnovu unetih parametara algoritam *in silico* digestuje svaki protein iz baze podataka i generiše teorijske MS/MS spektre. Spektre dobijene eksperimentalnim putem program poredi da teorijskim i na osnovu njih daje informaciju o identifikaciji proteina. Program prvo identifikuje fragmentacione spektre, na osnovu kojih identifikuje peptide, koje onda uklapa u sekvencu proteina. Samo proteini identifikovani sa bar jednim jedinstvenim

peptidom i sa ograničenjem udela statističke slučajnosti (*engl.* false discovery rate, *FDR*) do maksimalno 1%, bivaju uzeti u obzir u daljoj analizi (Tran, Rahman et al. 2016). Svaki, na ovaj način identifikovani protein, je okarakterisan pripadajućim peptidima, pokrivenošću aminokiselinske sekvence i modifikacijama koje nosi.

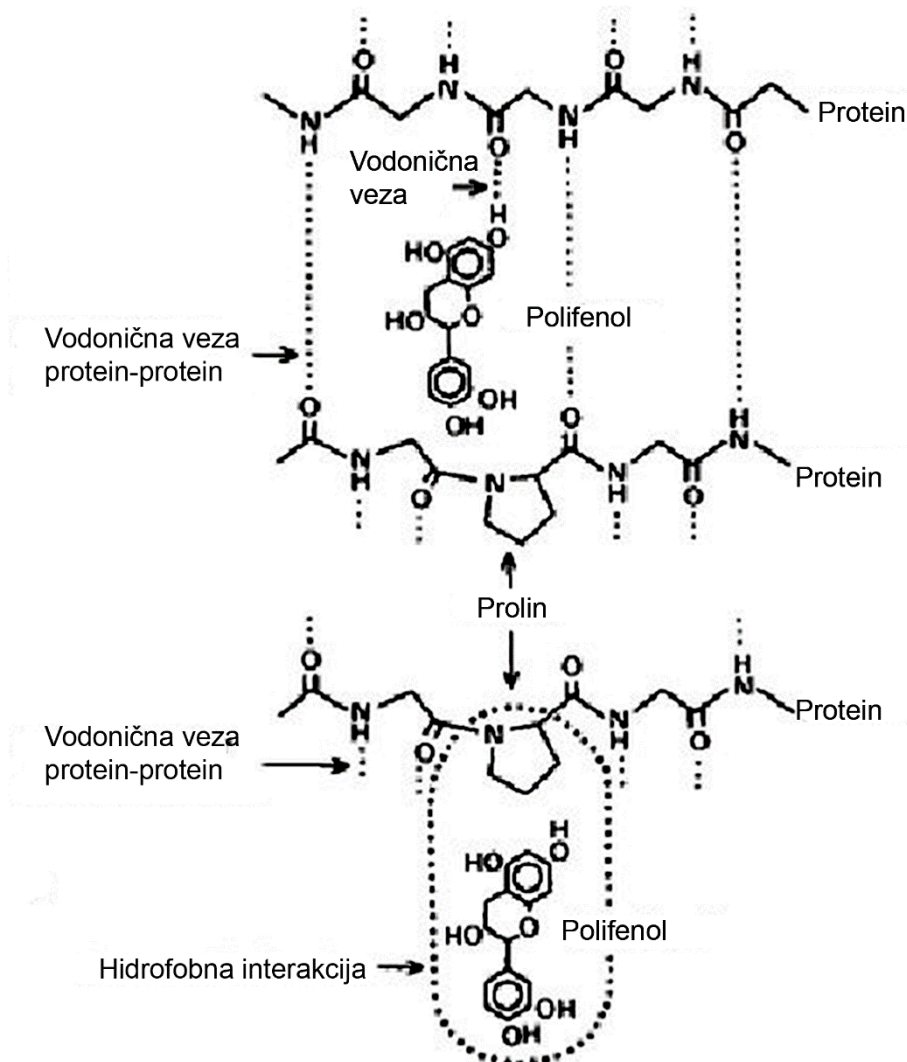
Moguće je na osnovu površina hromatogramskih pikova peptida uporediti količine prisutnih proteina u dva različito tretirana uzorka. Relativna kvantifikacija proteina bez obeležavanja (LFQ, *engl.* Label free quantification) se postiže odabirom tri reprezentativna peptida za svaki protein, čime se obezbeđuje ravnopravna procena zastupljenosti. Kada bi se zastupljenost proteina računala na osnovu svih sopstvenih peptida, količina proteina koji se sastoje od peptida koji lakše jonizuju ili se lakše spiraju sa reverzno-fazne kolone bi bila precenjena. LFQ takođe omogućava procenu zastupljenosti i njeno poređenje u slučaju modifikovanih peptida između različito tretiranih uzoraka. Stoga je moguće ispratiti promene u udelu modifikacije na osnovu zastupljenosti modifikovanih peptida i površine njihovih hromatogramskih pikova (Tran, Rahman et al. 2016).

2.4 Interakcije alergena hrane i biološki aktivnih fenolnih jedinjenja

Fenolna jedinjenja uspostavljaju interakcije sa proteinima, koje mogu uticati na biološke i funkcionalne osobine proteina hrane. Pokazalo se da polifenolna jedinjenja, između ostalih, pokazuju i hipoalergena svojstva. Formiranjem polifenol-protein interakcija dolazi do smanjenja IgE vezivanja za proteine ekstrakta kikirikija po dodatku polifenola poreklom iz čaja i soka od brusnice (Plundrich, Kulis et al. 2014).

Interakcije koje polifenolna jedinjenja uspostavljaju sa proteinima su uglavnom nekovalentnog tipa i najčešće uključuju hidrofobne interakcije i vodonične veze (Slika 11) kao što je to u slučaju β -laktoglobulina (Stojadinovic, Radosavljevic et al. 2013), ovalbumina (Ognjenovic, Stojadinovic et al. 2014) i proteina lešnika (Labuckas, Maestri et al. 2008). Kod vodoničnog vezivanja i protein i polifenol mogu biti i donor i akceptor. Na primer, vodonik iz peptidne veze proteina može uspostaviti interakciju sa kiseonikom polifenola, ili vodonik hidroksilne grupe polifenola može uspostaviti vodoničnu vezu sa kiseonikom peptidne veze. Hidrofobne interakcije se najčešće uspostavljaju između

prstenova polifenola i aminokiselinskih ostataka koje sadrže aromatični ili heterociklični prsten (Phe, Pro, His) kada se prstenovi nađu paralelno jedan u odnosu na drugi.

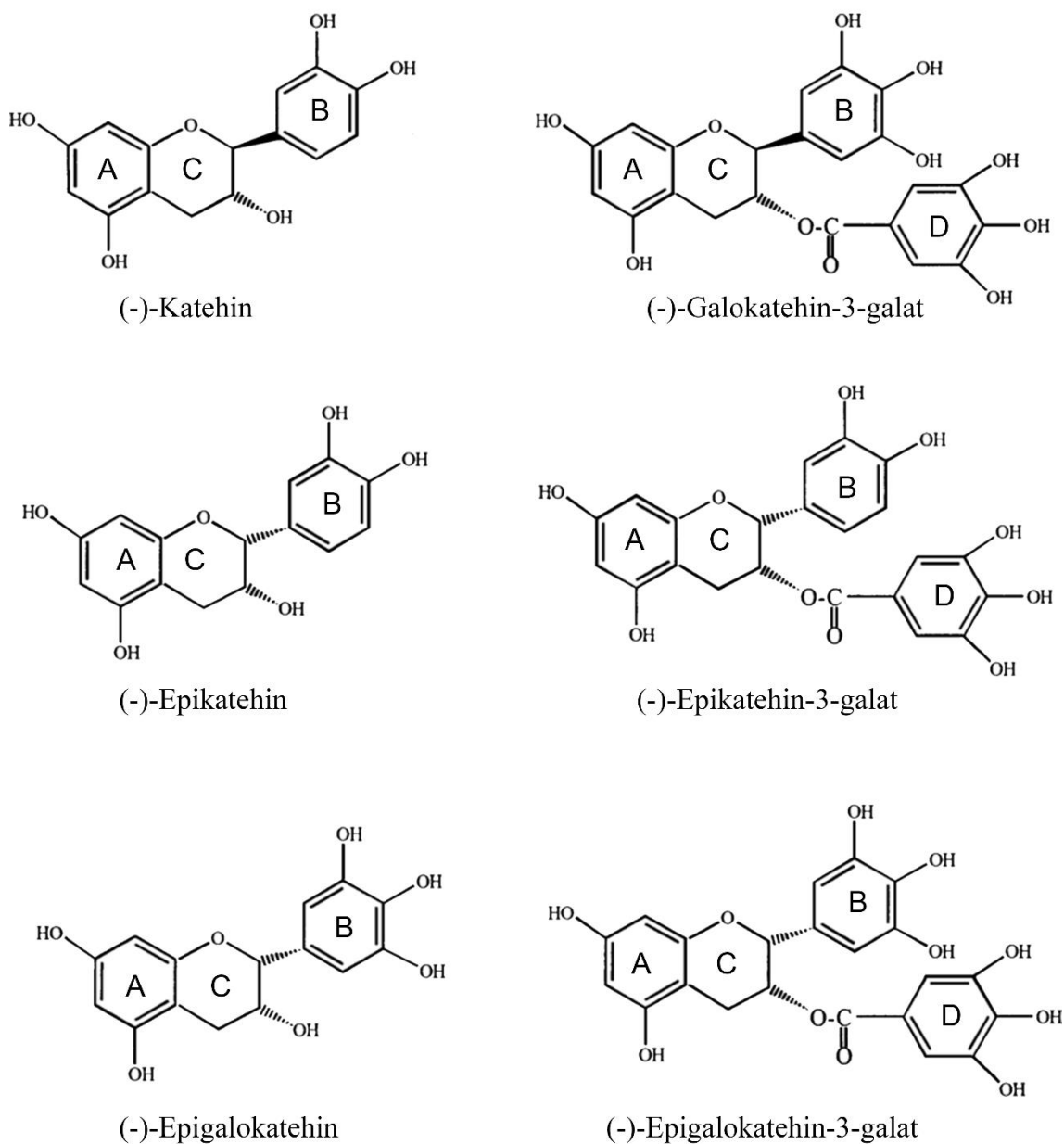


Slika 11. Uspostavljanje vodoničnih veza i hidrofobnih interakcija između polifenola i proteina. Adaptirano i preuzeto od (Asano, Shinagawa et al. 1982).

2.4.1 Katehini zelenog čaja

Zeleni čaj je jedan od najbogatijih izvora antioksidanasa, bogat katehinima – biološki veoma bitnom potklasom fenolnih jedinjenja. Katehini spadaju u flavan-3-ole koji se sastoje od aromatičnih prstenova za koje su vezane hidroksilne grupe (Slika 12). Flavan-3-oli se sastoje od dva kondenzovana prstena, vezanih za treći (B). Heterociklični, benzopiranski prsten (C) je kondenzovan sa aromatičnim prstenom (A) i za njega je vezan

fenil-prsten (B). A-prsten može sadržati 2 ili 3 hidroksilne grupe, dok ih B-prsten može imati 1-3. Katehin i epikatehin kao epimeri, su strukturno najjednostavniji članovi ove grupe. Epigalokatehin-3-galat (EGCG) je estar epigalokatehina i galne kiseline (prsten D) (Braicu, Pilecki et al. 2011).



Slika 12. Hemijska struktura predstavnika katehina zelenog čaja. Adaptirano i preuzeto od (Goodman, Yeretziyan et al. 2013).

2.4.2. Biološka aktivnost i interakcije epigalokatehin-3-galata (EGCG) sa proteinima

Među katehinima jedan od najproučavanijih i biološki najpotentnijih jeste epigalokatehin-3-galat (Bode and Dong 2009) (slika 12). EGCG poseduje niz bioloških aktivnosti – antioksidativnu i antiinflamatornu (Cavet, Harrington et al. 2011), kao i anti-alergijske efekte koji ispoljava na procese degranulacije mastocita, oslobađanje histamina i preuzimanje proteina od strane monocita (Fujimura, Tachibana et al. 2002). Štaviše, pokazano je da EGCG obogaćeni polifenolni ekstrakt zelenog čaja pospešuje proces pepsinske digestije nekoliko alergena hrane, koji nisu u potpunosti podložni digestiji (Tantoush, Apostolovic et al. 2012).

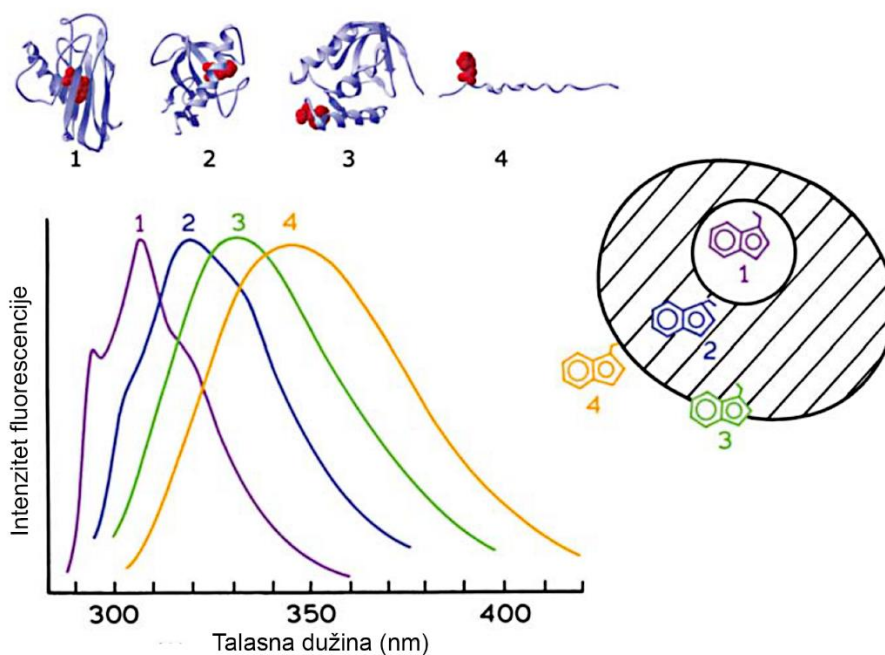
Interakcije između polifenola i proteina su u najvećem broju slučajeva slabe interakcije. EGCG uspostavlja veze sa humanim serum albuminom (HSA) (Maiti, Ghosh et al. 2006), lipazom (Wu, He et al. 2013), ovalbuminom (Ognjenovic, Stojadinovic et al. 2014) i β -kazeinom (Jobstl, Howse et al. 2006). Ovakva vrsta povezivanja nije samo korisna po protein, već i po EGCG zbog toga što slobodan lako oksiduje u fiziološkim uslovima, te stvaranje kompleksa sa proteinima kao što je to slučaj sa β -laktoglobulinom može uticati na očuvanje njegovih korisnih osobina (Shpigelman, Cohen et al. 2012).

U ovoj tezi su primenjene metode fluorescentne spektroskopije i cirkularnog dihroizma (CD), izotermalne titracione mikrokalorimetrije (ITC) i računarskog modelovanja da bi se proučile interakcije između EGCG i 2 S albumina kikirikija i uticaj koje bi one mogle imati na konformaciju potentnih alergena kikirikija. Pored pomenutih anti-alergenih svojstava koje EGCG ispoljava, moguće je da uticajem na strukturu alergena tokom interakcija izmeni konformacione epitope i na taj način utiče na sposobnost vezivanja specifičnih IgE antitela.

2.5. pristupi za proučavanje interakcija katehina zelenog čaja i alergena hrane

2.5.1. Fluorescentna spektroskopija i gašenje fluorofora

Molekuli koji u sebi sadrže fluorofore su u stanju da apsorbuju foton, pređu u pobuđeno (ekscitovano) stanje, nakon čega emituju energiju pri povratku u osnovno stanje. Talasna dužina na kojoj dolazi do emisije je duža od one na kojoj se fluorofore ekscituju. Kod proteina fluorofore su aminokiselinski ostaci Phe, Tyr i Trp, međutim u praksi se prati fluorescencija poslednja dva zbog toga što Phe emituje fotone niže energije. Pri talasnoj dužini od 280 nm i Tyr i Trp bivaju pobuđeni, dok na 295 nm je to slučaj samo sa Trp. Emisionim spektrima proteina najviše doprinosi triptofan, koji apsorbuje na većim talasnim dužinama i ima veći ekstinkcioni koeficijent. Fluorescencija triptofana je osetljiva na promene u neposrednoj okolini (polarnost), te je na osnovu emisionih spektara moguće pratiti konformacione promene, spajanje subjedinica, vezivanje supstrata/liganada ili denaturaciju. Emisionim maksimum Trp koji se nalazi u hidrofobnoj sredini (npr. u središtu proteina) je na nižoj talasnoj dužini u odnosu na Trp koji je u kontaktu sa rastvaračem (npr. na površini proteina) (Slika 13) (Lakowicz 1999).



Slika 13. Uticaj polarnosti okoline Trp na fluorescentnu emisiju proteina: apoazurin Pfl (1), ribonukleaza T1 (2), stafilokokna nukleaza (3) i glukagon (4). Modeli proteina su

prikazani plavom bojom, dok je Trp crvenom. Adaptirano i preuzeto iz (Lakowicz 1999).

Gašenje fluorescencije je proces pri kom usled interakcija između molekula koji fluoresciraju dolazi do smanjenja intenziteta emisije. Postoje dva opšta mehanizma gašenja: (i) dinamički (kolizioni) i (ii) statički (formiranje kompleksa). Kod dinamičkog gašenja molekul koji gasi difunduje do pobuđene fluorofore, kada dođe do interakcije ona se vraća u osnovno stanje bez emisije energije. Dinamičko gašenje mora da se odigra u okviru vremena tokom kog je fluorofora pobuđena, odnosno za vreme poluživota fluorescencije (τ_0) i ovaj proces je vremenski zavisin. Kod statičkog mehanizma dolazi do formiranja kompleksa između fluorofore i liganda u nepobuđenom stanju. Kada kompleks apsorbuje energiju, vraća se u osnovno stanje bez emisije fotona. Pošto u oba slučajja da bi došlo do gašenja fluorescencije mora doći do kontakta između fluorofore i prigušivača ova metoda se može primeniti za proučavanje interakcija između proteina (nosioci fluorofora) i biološki aktivnih polifenolnih jedinjenja (Albani 2004).

Radi karakterizacije vezivanja između proteina i polifenola na osnovu eksperimenata gašenja fluorescencije primenjena su 4 matematička modela opisana u produžetku.

Stern–Volmerov model (SV) (Liang, Tajmir-Riahi et al. 2008)

Stern-Volmerov model opisan je jednačinom:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \times [Q]$$

gde F_0 i F predstavljaju intenzitet fluorescencije pre i nakon dodatka prigušivača; K_{sv} je Stern–Volmer-ova konstanta gašenja i $[Q]$ je koncentracija prigušivača.

Ovaj matematički model se može primeniti i u slučaju statičkog i dinamičkog mehanizma gašenja. Kod dinamičkog mehanizma K_{sv} predstavlja konstantu disocijacije, a kod statičkog asocijacije.

Ukoliko je regresiona analiza prema SV modelu linearnog tipa moguće je odrediti i konstantu brzine gašenja fluorescencije k_q prema formuli:

$$K_{sv} = k_q \times \tau_0 \text{ (Lakowicz 1999)}$$

gde je τ_0 poznata vrednost poluživota fluorescencije ostatka triptofana (Trp) unutar biopolimera, kada nije prisutan agens koji guši fluorescenciju i iznosi 10 ns (Lakowicz 1999, Wang, Yin et al. 2013). Sa poznatim vrednostima τ_0 i K_{sv} je moguće izračunati k_q i ukoliko je ona viša od vrednosti za gašenje fluorescencije u vodi ograničenog difuzijom ($\sim 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Gudgin, Lopez-Delgado et al. 1981) gašenje se odvija po statičkom mehanizmu, odnosno uz formiranje kompleksa.

Ukoliko se gašenje odvija uz formiranje kompleksa moguće je primeniti Lererov (Lehrer-ov), logaritamski i Langmjuerov (Langmoir-ov) matematički model radi dalje karakterizacije mesta vezivanja.

Lererov model (Lehrer 1971, Keppler, Stuhldreier et al. 2014)

Lererov model je prikazan jednačinom:

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{[Q] \times fa \times K_Q} + \frac{1}{fa}$$

Iz ove jednačine (ili tzv. modifikovane SV jednačine) mogu se izračunati konstanta gašenja fluorofore (K_Q) i udeo fluorofore dostupan rastvaraču (fa).

Logaritamski model (Lakowicz 1999)

Logaritamski model je opisan jednačinom:

$$\log \left[\frac{F_0 - F}{F} \right] = \log K_a + n \times \log [Q]$$

U slučajevima kada se radi o statičkom gašenju fluorofore moguće je izračunati konstantu vezivanja (K_a) - predstavlja nagib prave i broj mesta vezivanja prigušivača za protein (n) – odsečak prave.

Langmjuerov model (Keppler, Stuhldreier et al. 2014)

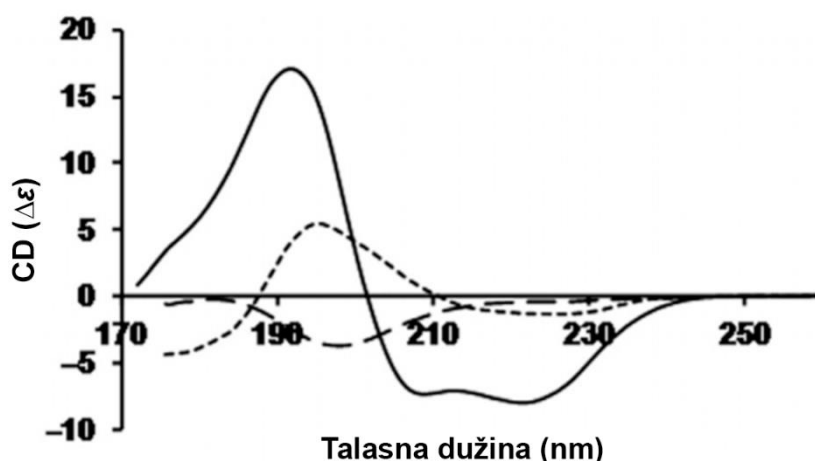
Langmjuerov model je predstavljen formulom:

$$F_0 - F = \frac{(F_0 - F_\infty) \times [Q]}{K'_d + [Q]}$$

Na osnovu Langmjuerove izoterme se mogu dobiti informacije o konstanti disocijacije kompleksa (K'_d) i maksimalne razlike u intenzitetu emisije ($F_0 - F_\infty$).

2.5.2. Spektroskopija cirkularnog dihiroizma (CD)

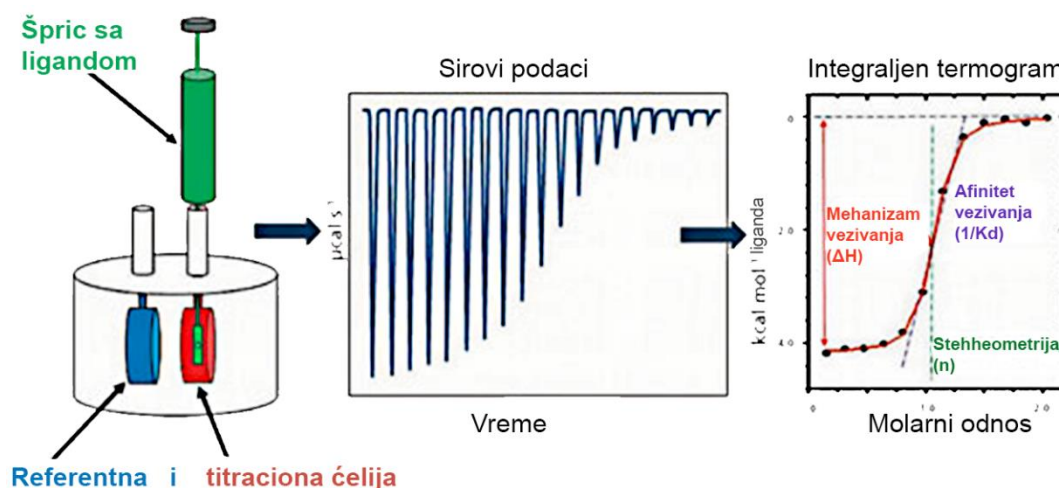
Spektroskopija cirkularnog dihiroizma (CD) je metoda kojom se može odrediti konfiguracija molekula na osnovu razlika u apsorpciji levo i desno cirkularno polarizovane svetlosti od strane optički aktivnih molekula. CD spektrometri mere navedenu razliku u apsorpciji, koja se često izražava kao elipticitet (θ). CD spektri snimani u bliskom UV opsegu (260 – 300 nm) potiču od signala Trp, Tyr i Phe, na osnovu kojih se mogu pratiti izmene u tercijarnoj strukturi proteina (Miles, Whitmore et al. 2005). Procena sekundarnih struktura kod proteina se dobija na osnovu CD spektara snimljenih u dalekoj UV oblasti (260 – 170 nm). Za prisustvo α -heliksa je uobičajeno prisustvo minimuma na 222 i 208 nm i maksimuma na 193 nm. Proteine sa β -pločicama karakterišu spektri sa minimalnim elipticitetom na 218 nm i maksimumom na 195 nm. Proteini sa neuređenim strukturama imaju nizak elipticitet na 210 nm i blag negativan 195 nm. Primeri CD spektara u dalekoj UV oblasti su prikazani na Slici 14. Promene u sekundarnim strukturama do kojih može doći usled uspostavljanja interakcija između proteina i liganda se odražavaju i u CD spektrima, te je ovu metodu moguće primeniti za izučavanje interakcija (Miles, Whitmore et al. 2005).



Slika 14. CD spektri proteina sa većinski α -heliksima (mioglobin, puna linija), β -pločicama (lektin iz sočiva, -----) i neuređenim strukturama (Micro Exon Gene 14 (MEG-14), - - -). Adaptirano i preuzeto od (Miles, Whitmore et al. 2005).

2.5.3. Izotermalna titraciona mikrokalorimetrija

Izotermalna titraciona mikrokalorimetrija je metoda koja meri toplotnu energiju koja se oslobađa ili apsorbuje kao rezultat interakcija između proteina i liganda. Instrument se sastoji od dve ćelije – referentne i titracione u kojoj se nalazi rastvor proteina. Rastvoru proteina se dodaju precizno odmereni alikvoti liganda i sa svakim dodatkom se meri energija potrebna za održavanje temperature titracionog suda jednakom temperaturi referentnog (Pierce, Raman et al. 1999). Na osnovu dobijenih podataka se konstruiše termogram u okviru kog svaki pik predstavlja uloženu energiju pri dodatku jednog alikvota liganda (Slika 15., srednji panel), dok se nakon integracije dobija kriva koja predstavlja odnos energije po molu liganda (kcal mol^{-1}), koja se oslobađa ili troši tokom titracije i molarnog odnosa proteina i liganda (slika 15).



Slika 15. Shematski prikaz mikrokalorimetra za izotermalnu titracionu mikrokalorimetriju i primer termograma konstruisanog na osnovu sirovih i podataka nakon integracije. Adaptirano i preuzeto sa URL:

<http://www.biopharminternational.com/using-microcalorimetry-accelerate-drug-development>.

Na osnovu termograma nakon integracije i promene energije po molu liganda tokom reakcije se može zaključiti da li je reakcija entalpijski povoljna ili nije. Afinitet vezivanja i broj vezivnih mesta liganda na proteinu se određuje iz linearnog dela krive.

3 Ciljevi

U ovoj disertaciji smo se posvetili detaljnoj karakterizaciji alergena hrane iz dva izvora:

- kikirikija – dobro poznat izvor alergena, sa dobro okarakterisanim proteinskim epitopima
- crvenog mesa – novootkrivena forma alergije, kod koje imunitet pacijenata reaguje na N-glikanski epitop vezan za gliko-proteine

istražujući razlike u njihovim kvalitativnim i kvantitativnim PTM, HM i proteinskim profilima, termički tretirane i sveže hrane, kako bismo omogućili dalja istraživanja o značaju i ulozi modifikacija njihovih alergena kao novi istraživački izazovi koji su se nakon ove doktorske disertacije pojavili. Takođe istraživali smo i interakcije alergena hrane sa biološki aktivnim polifenolnim jedinjenjima kao važan deo procesa modulacije alergnog odgovora.

Cilj rada je razumevanje povezanosti između (1) modifikacija i interakcija koje uspostavljaju specifični alergeni hrane i (2) njihovih funkcionalnih karakteristika bitnih za uspostavljanje alergijskog odgovora (podložnosti delovanju digestivnih enzima, imunoreaktivnost i sl.). Radi ostvarenja navedenog cilja, u okviru doktorske teze formulisano je nekoliko istraživačkih zadataka:

- 1) Analiza glikopeptida od značaja u alergiji na crveno meso i njihovih PTM imunoblotom i masenom spektrometrijom;
- 2) Kvalitativna i kvantitativna široko opsežna karakterizacija posttranslacionih i hemijskih modifikacija glavnih alergena kikirikija nastalih tokom termičkog tretmana;
- 3) Ispitivanje interakcija bioaktivnih molekula hrane sa glavnim alergenima kikirikija Ara h 2 i Ara h 6 i njihovog uticaja na strukturu alergena.

4 Eksperimentalni deo

4.1. Materijal

Kikiriki (*lat. Arachys hypogea* L.) sa crvenom ljuskom (sorta *runner*) je nabavljen u lokalnoj prodavnici. Kikiriki je pečen u retni 20 min na 170 °C prema (Beyer, Morrow et al. 2001). Pečeni (nakon hlađenja) i sirovi kikiriki su samleveni u blenderu, a zatim i dodatno usitnjeni u avanu sa tučkom. Kikiriki prah je odmašćen sa jednakom zapreminom (w/v) petrol-etra, koji je uklonjen centrifugiranjem (13400 rpm, 10 min) i ceđenjem kroz gazu. Nakon sušenja, proteini su ekstrahovani desetostrukom zapreminom fosfatom pufersanog fiziološkog rastvora (PBS) (1:10 (w/v)) sa dodatkom koktela inhibitora proteaza (P2714, 1 mg/mL, Sigma, Nemačka) 1,5 h na 4 °C. Supernatant (SN) odvojen centrifugiranjem (13400 rpm, 15 min), je dodatno odmašćen dihloretrenom (1:2 (v/v)) i sakupljen je donji (proteinski) sloj kome je određena koncentracija proteina, i elektroforetski i proteomički karakterisan kao što je opisano niže.

Alergeni kikirikija (Ara h 2 i Ara h 6) su iz proteinskog ekstrakta izolovani prema (Radosavljevic, Dobrijevic et al. 2010). Prvi korak je bio frakcionisanje ekstrakta gel filtracijom na Superdex 200 XK 16/100 koloni na ÄKTA Purifier 10 sistemu (Amersham Biosciences, Švedska). U sledećem koraku su iz frakcija koje sadrže proteine mase 14 – 20 kDa izolovani pojedinačni alergeni reverzno-faznom hromatografijom na Discovery BIO Wide Pore C5 koloni (10 cm × 4,6 cm) (Supelco/Sigma-Aldrich, Nemačka). Za eluciju su korišćene 2 faze: A) 0,1% trifluorosirćetna kiselina (TFA) i B) 0,1% TFA u acetonitrilu (ACN) u pri linearnom gradijentu 0 – 100% B od 10 zapremina kolone uz praćenje apsorbance na 280 i 215 nm.

Sekvence linearnih epitopa alergena kikirikija su preuzete iz baze podataka imunoepitopa (IEDB, *engl.* Immune Epitope Database, dostupne na URL www.iedb.org) (Vita, Mahajan et al. 2019).

Goveđi tiroglobulin (TG) i serum albumin (BSA), pepsin (P-6887) i tripsin (Proteomic Grade, BioReagent, Dimethylated) su nabavljeni od Merck (ranije Sigma-Aldrich, Nemačka). Korišćena su komercijalno dostupna antitela čiji su proizvođači navedeni: mišje anti-humano IgE-HRP antitelo (B3102E8, Abcam, UK), monoklonsko anti- α -Gal

IgM antitelo iz miša (M86, Enzo Life Science Inc, SAD) i kozje anti-mišje IgM antitelo povezano sa AP (Southern Biotech, SAD). Za deglikozilaciju je korišćen enzimski PNGase F (New England BioLabs, SAD).

4.2. Određivanje koncentracije proteina bicinoninskom metodom

Prvi korak u analizi proteina, bilo da su prečišćeni ili da je u pitanju pun ekstrakt jeste određivanje njihove koncentracije. U ovoj disertaciji koncentracija proteina je određivana tzv. bicinoninskom ili metodom po *Smith*-u (Smith, Krohn et al. 1985). Ova metoda spada u kolorimetrijske i nakon inkubacije proteinskog rastvora sa radnim reagensom tokom 30 min na 37 °C dolazi do formiranja kompleksa ljubičaste boje čiji intenzitet absorbance na 562 nm (A_{562}) odgovara koncentraciji proteina. Obojeni kompleks nastaje usled (i) redukcije jona Cu^{2+} iz bakar(II)-sulfata do Cu^{1+} u prisustvu peptidne veze, nakon čega (ii) dva molekula bicinoninske kiseline (BCA) formiraju ljubičasti kompleks sa svakim jonom Cu^{1+} . Opseg koncentracije proteina koji pokriva ova metoda je 0,5 $\mu\text{g/mL}$ – 1,5 mg/mL . Koncentracija proteina u uzorku se određuje primenom jednačine dobijene na osnovu standardne prave koja predstavlja funkciju vrednosti A_{562} u zavisnosti od koncentracije proteina ($A_{562} = f(\text{konc.})$). Standardna prava se konstruiše merenjem A_{562} serije standardnih rastvora goveđeg serum albumina (BSA, *engl.* bovine serum albumin) u opsegu koncentracija od 0,1 do 2,0 mg/mL prethodno inkubiranih sa radnim rastvorom. Radni rastvor se dobija mešanjem reagensa A i reagensa B (Tabela 1) u odnosu 50:1.

Tabela 1. Recept za pripremu BCA reagenasa A i B.

	Komponenta	Količina
Reagens A	BCA	0,1 g
	$\text{Na}_2\text{CO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$	0,2 g
	Na-tartarat $\times 2\text{H}_2\text{O}$	0,016 g
	NaOH	0,04 g
	NaHCO_3	0,095 g
	Podesiti pH na 11,25	
	dH_2O	Dopuniti do 10 mL
Reagens B	$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,02 g
	dH_2O	Dopuniti do 0,5 mL

U bunaru ELISA pločice se meša 10 μ L proteinskog uzorka ili standardnog rastvora sa 200 μ L radnog rastvora. Nakon inkubacije (30 min, 37 °C) A_{562} se meri na čitaču mikroploča Rayto 990-BV4/6 (Rayto Life and Analytical Sciences Co., Kina).

4.2 *In vitro* enzimski esej – pepsinoliza

In vitro simulirana želudačna digestija goveđeg tiroglobulina, nosioca α -Gal modifikacije i model proteina za alergiju na crveno meso rađena je slično prethodno publikovanim studijama (Moreno, Mellon et al. 2005, Koppelman, Hefle et al. 2010). Pepsinska aktivnost je prethodno proverena prema uputstvu proizvođača. Tiroglobulin koncentracije 5,55 mg/mL je rastvoren u simuliranom želudačnom soku (SŽS: 0.15 M NaCl, pH podešeno na 2,5 jednomolarnom hlorovodoničnom kiselinom). Nakon 15 min inkubacije na 37 °C, smeši je dodat rastvor 0,32% pepsina (w/v u SŽS), tako da je odnos enzim : supstrat bio približan fiziološkom (1:20, w/w), odnosno 0,2 U pepsina po 1 μ g proteina. Reakciona smeša je održavana na 37 °C, uz konstantno mešanje do 120 min i alikvoti su uzimani u različitim vremenskim intervalima (0', 0,5', 1', 2', 5', 10', 30', 60', 120'). Aktivnost pepsina je zaustavljena dodatkom 200 mM amonijum bikarbonata (ABC), tako da je pH vrednost smeše iznosila 7,5. Digestija je na isti način urađena i sa dodatkom 1 U i 10 U pepsina po μ g proteina. Alikvoti su analizirani elektroforetski i imunoblotom kao što je niže opisano.

4.3. SDS poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

SDS poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) rađena je u redukujućim uslovima, prema Laemmli (Laemmli 1970) na Hoefer Scientific (Amersham Biosciences, SAD) ili BioRad MiniProtean II cell (Bio-Rad, Nemačka) sistemu. Proteinski uzorci su analizirani ili na komercijalno dostupnim TGX gradijentnim gelovima 4-20% poliakrilamid (Bio-Rad Laboratories, Inc., SAD), ili na gelovima pripremljenim u laboratoriji koji su se sastojali od 4% gela za koncentrovanje i 12% ili 16% gela za razdvajanje (Tabela 2). Sastav pripremanih gelova je prikazan niže:

Tabela 2. Sastav izlivanih poliakrilamidnih gelova (AA – akrilamid)

Komponenta	Gel za razdvajanje		Gel za koncentrovanje 4% AA
	12% AA	16% AA	
Monomerni rastvor AA (30% T, 2,7% C)	4,00 mL	5,33 mL	0,50 mL
1,5 M Tris pH 8,8	2,50 mL	2,50 mL	/
0,5 M Tris pH 6,8	/	/	0,94 mL
dH ₂ O	3,33 mL	2,00 mL	2,25 mL
10% SDS	0,10 mL	0,10 mL	38 µL
TEMED	4 µL	4 µL	2 µL
10% amonijum persulfat (APS)	50 µL	50 µL	25 µL
Ukupna zapremina	10 mL	10 mL	4 mL

Odmah nakon dodavanja APS-a u gel za razdvajanje, rastvor se sipa između dve staklene ploče (20 x 10 x 0,3 cm ili 20 x 20 x 0,3 cm) i nadslojava rastvorom *n*-butanola zasićenog vodom. Nakon polimerizacije površina donjeg gela se ispira vodom i naliva se gel za koncentrovanje u koji se uranja češalj u cilju formiranja bunara za nanošenje uzoraka.

Uzorci za SDS-PAGE su mešani sa puferom za pripremu uzoraka (60 mM Tris pH=6,8, 25% glicerol, 2% SDS, 14,4 mM β-merkaptetanol, 0,1% bromfenol plavo) u odnosu 1:4 (v/v). Pripremljeni uzorci su kuvani 5 minuta na 95 °C i nakon hlađenja nanošeni u bunare polimerizovanog gela za elektroforezu. Proteinski markeri za elektroforezu (Thermo Fisher Scientific, SAD) su nanošeni u količini od 7 µL. Elektroforeza je trajala 2 h pri konstantnom naponu od 150 V u kadi sa puferom za elektroforezu (0,025 M Tris pH 8,3, 0,192 M glicin, 0,1% SDS).

Elektroforeza je završena kada boja iz pripremljenog uzorka brom fenol plavo dođe do kraja gela. Gel je bojen rastvorom CBB (*coomassie brilliant blue*) R-250 (0,1% CBB, 50% metanol, 10% sirćetna kiselina) do 30 min. Gel je obezbojen u 7% rastvoru sirćetne kiseline do uočavanja obojenih proteinskih traka na transparentnoj pozadini gela.

4.4. Imunoblot

Proteinski uzorci su elektroforetski razdvojeni, a zatim sa poliakrilamidnog gela (PAA) prenešeni strujom na nitroceluloznu ili PVDF membranu (0,2 μm , Bio Rad, Nemačka) uz pomoć BlueFlash™ Semi-Dry Blotter (Serva, Nemačka) prema protokolu Towbin-a i saradnika (Towbin, Staehelin et al. 1979). Membrana je blokirana rastvorom 1% BSA u TTBS-u i inkubirana sa komercijalno dostupnim antitelima na modifikacije. Korišćena IgG antitela na modifikacije poreklom iz zeca, njihova razblaženja i proizvođači su prikazani u Tabeli 3.

Tabela 3. Antitela na PTM

Specifičnost antitela	Primenjeno razblaženje	Kataloški broj	Proizvođač
Acetillizin	1:1000	ab42789	Abcam, SAD
Hidroksiprolin	1:1000	ab37067	Abcam, SAD
Karbamillizin	1:1000	STA-078	Cell biolabs, SAD
Metilovani lizin	1:1000	NB600-824	Novus Biologicals, SAD
Metionin-sulfoksid	1:200	600160	Cayman chemical, SAD
Piroglutaminska kiselina	1:1000	ABIN5662172	Antibodies online, SAD
Propionillizin (Lizil-propinamid)	1:1000	PTM-201	PTM Biolabs, SAD

Sva primarna antitela iz Tabele 3 su razblažena u 0,5% BSA u TTBS-u, koji je ujedno korišćen kao i kontrola primarnog antitela. Imunoblot je razvijen sa anti-zečjim IgG antitelima (poreklom iz kože) konjugovanim sa AP (111-055-045, Jackson ImmunoResearch, SAD) kao sekundarnim antitelom, razblaženim 1:1000.

Za detekciju α -Gal, membrana je inkubirana 3 h na sobnoj temperaturi sa mišjim anti- α -Gal IgM (M86, Enzo Life Science Inc, SAD) u razblaženju 1:3, a zatim 1 h na sobnoj temperaturi sa anti-mišjim IgM antitelom, za koji je vezana AP (Southern Biotech, SAD) koje je razblaženo 3000 puta.

Za detekciju je korišćen 5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat (BCIP) i „nitroblue tetrazolium“ (NBT) sistem.

Za detekciju N-glikolilneuraminske kiseline (Neu5Gc) membrana je blokirana 1% HSA u PBS-T na sobnoj temperaturi tokom 3 sata. Neu5Gc je detektovana pomoću kokošjeg

antitela, izotip IgY (Poly21469, BioLegend, SAD), razblaženog 1:1000, uz inkubaciju preko noći. Kao sekundarno antitelo je korišćeno antitelo na kokošji IgY iz magarca, obeleženo peroksidazom iz rena (SA1-72004, Thermo Fisher Scientific Inc., Nemačka), u razblaženju od 1:7500, inkubirano tokom 1 časa na sobnoj temperaturi. Za detekciju je korišćen supstrat za hemiluminiscenciju (1705061, BioRad, Nemačka) i ChemiDoc sistem (BioRad, Nemačka).

4.5. Priprema uzoraka za proteomičku analizu

4.5.1. Priprema uzoraka u rastvoru

Proteinski uzorci sa do 300 µg proteina, su rastvoreni u 25 mM amonijum bikarbonatnom puferu (ABC), pH 8. Ovom rastvoru je dodato 30 µL 6M uree, koja je denaturišući agens i omogućava razvijanje proteina u rastvoru što čini efikasijim dalje korake. Potom je dodato 1,5 µl 200 mM ditionitrola (DTT), radi redukcije disulfidnih mostova i reakciona smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi, zaštićena od svetla tokom 60 min. U sledećem koraku je smeši dodato 6 µL 200 mM jodacetamida (IAA) i reakcija acetilacije se odvija na sobnoj temperaturi tokom 30 min i zaustavljena je dodatkom 6 µL 200 mM DTT-a. Koncentracija uree u smeši se smanjuje dodatkom 5 puta veće zapremine 25 mM ABC. Tripsin (proteomics grade, Merck, Nemačka) se dodaje u 50 puta manjoj količini u odnosu na prisutnu količinu proteina i reakcija se odvija na 37 °C, tokom 18 časova. Dejstvo tripsina se stopira zakišeljavanjem rastvora, dodatkom mravlje kiseline (FA, *engl. formic acid*) tako da njena finalna koncentracija iznosi maksimalno 1%.

4.5.2. Priprema uzoraka isečenih iz gela

Kao u slučaju proteina u rastvoru i elektroforetski razdvojeni proteini moraju proći kroz sličnu proceduru pripreme za proteomičku analizu. Nakon bojenja CBB bojom, iz gela su isečene obojene proteinske trake i digestovane prema protokolu Shevchenko i saradnika (Shevchenko, Tomas et al. 2006). Ukratko, digestija proteina u gelu je kompatibilna sa MS karakterizacijom ovako dobijenih peptida.

Prvi korak je isecanje traka od interesa iz gela skalpelom. Nakon ispiranja traka u 25 mM amonijum-bikarbonatnom puferu, zatim u rastvoru 50% acetonitrila i 25 mM ABC radi uklanjanja zaostale boje iz gela, trake su tretirane 10 mM DTT radi redukcije disulfidnih veza. Nakon toga, trake su tretirane 55 mM jodacetamidom.. Proteini u trakam gela su digestovani preko noći na 37 °C primenom 10-20 µL 15 ng/µL tripsina (proteomics grade, Merck, Nemačka) po traci, zavisno od njene veličine (površina isečenih traka se kretala u opsegu 5 – 10 mm²). Oslobođeni peptidi difunduju iz gela u rastvor i može se pristupiti sledećem koraku pripreme za MS analizu koji je opisan u sledećem odeljku.

4.5.2. Prečišćavanje uzorka na čvrstoj fazi C18

Peptidi nastali delovanjem tripsina bilo u rastvoru bilo u gelu su prošli još jedan korak prečišćavanja, u vidu zip tip metode koja prethodi MS analizi. Zip tip je tehnika kojom se ne-proteinske komponente uklanjaju iz peptidnih uzoraka, koja se odigrava u nastavku za pipete koji sadrži C18 reverzno fazni (RP *od engl. Reverse phase*) materijal – Hypersep tip C18, 10-200 µL (60109-209, Thermo Fisher Scientific Inc., Nemačka). Tokom postupka C18 nastavak se nalazi na pipeti koja odmerava do 200 µL. Svaki od u daljem tekstu navedenih koraka podrazumeva da se rastvor više puta uvuče u nastavak (prođe kroz C18 fazu) i izbaci, bar po 5 puta. Prvi korak je kvašenje C18 materijala 70% ACN sa 0.1% FA, zatim se čvrsta faza ekvilibriše vodom sa 0.1% FA, nakon toga se peptidi vezuju za C18 (ovde se pipetira 20 puta). Sledi korak spiranja ne-peptidnih komponenti vodom sa 0.1% FA – ovim korakom se ispira urea (u slučaju digestije u rastvoru) i eventualan višak soli. Peptidi se eluiraju sa C18 matriksa, 70% ACN sa 0.1% FA u tube od specijalne plastike koja slabo vezuje proteine (*engl. low binding tubes*) (Eppendorf, Nemačka). Ovako pripremljeni uzorci se uparavaju na vakuum koncentratoru i resuspenduju u 0.1% FA. Na ovaj način spremljeni uzorci su prečišćeni od interferirajućih agenasa (višak uree, soli, zaostali parčići PAA gela i sl.) i adekvatni za MS analizu.

4.6. Analiza tečnom hromatografijom veoma niskog protoka - tandem masenom spektrometrijom (nLC-MS/MS)

Proteinski uzorci koji su digestovani tripsinom (u rastvoru ili u gelu) su analizirani tandem masenom spektrometrijom, kojoj je prethodilo razdvajanje tečnom hromatografijom sa nano litarskim protokom (nLC-MS/MS) u 2 do 3 analitička ponovka. Peptidi su hromatografski razdvojeni pomoću EASY-nLC II sistema sa 2 kolone: zaštitnom ili pretkolonom (C18-A1, 2 cm) i analitičkom kolonom PepMap (C18, 15 cm x 75 μm , veličinom čestica od 3 μm i pora od 100 Å) (sve navedeno Thermo Fisher Scientific Inc., Nemačka). Korišćen je sistem sa 2 mobilne faze, A: 0,1% FA u vodi i B: 0,1% FA u ACN. Svi korišćeni rastvarači su visoke čistoće (*engl.* MS grade) (Sigma Aldrich, Nemačka). Uzorci su razdvojeni hromatografski, gradijentom u trajanju od 80 min, pri protoku od 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. Gradijent se sastojao od šest faza: i) 0–5 min 5% B, (ii) 5–55 min, 5–70% B, (iii) 55–60 min 70–95% B, (iv) 60–70 min 95% B, (v) 70–75 min 95–5%B, (vi) 75–80 min 5%B.

Analiza peptida je obavljena LTQ Orbitrap XL masenim spektrometrom u pozitivnom polaritetu, u zavisnom MS/MS podešavanju (*engl.* data dependent acquisition) sa naponom izvora od 1,9 kV i 110 V na cevastom sočivu, temperaturom kapilare od 275 °C. Spektri su snimani Top10 metodom - u ciklusima tako što je prvo snimljen spektar visoke rezolucije (R 30000 na m/z 400) Orbitrap analizatorom u masenom opsegu m/z 300 to 2000. Sa ovako snimljenog spektra je instrument odabrao 10 jona sa najvišim intenzitetom signala, izolovao ih pojedinačno i fragmentisao ih u linearnoj jonskoj zamci (LTQ, *engl.* linear trap quadrupole) metodom disocijacije izazvane sudarima (CID, *engl.* collision induced dissociation) sa normalizovanom kolizionom energijom od 35% i aktivacionim vremenom od 30 ms. Primenjena je dinamička ekskluzija sa isključenjem tokom 10 s nakon jednog ponavljanja (svakih 10 s).

4.7. Analiza metodama proteomike - identifikacija i relativna kvantifikacija proteina i njihovih modifikacija

4.7.1. Identifikacija proteina pretragom baza podataka

Identifikacija proteina je rađena softverskim paketom PEAKS Studio X (Bioinformatics Solutions Inc., Kanada) (Tran, Rahman et al. 2016) i SEQUEST algoritmom (Diament and Noble 2011) kroz Proteome discoverer platformu (Thermo Fisher Scientific Inc., Nemačka). Specifični fragmentacioni (MS/MS) spektri peptida su pretraživani i upoređivani sa proteinskim bazama podataka iz UniProtKB (URL adresa <http://www.uniprot.org/>) PEAKS DB i SEQUEST algoritmima, uključujući i pretragu putem lažne ili mamac databaze (*engl.* decoy database) da bi se minimizovala mogućnost slučajne identifikacije peptida. Proteinske baze koje su korićene su preuzete sa UniProt sajta i sastojale su se od (i) proteina kikirikija (98975 sekvenci, pristupljeno bazi 10/07/2018), (ii) sekvenci tiroglobulina (447 sekvenci, pristupljeno bazi 08/05/2016) ili sa GPM sajta (www.thegpm.org), odakle je preuzeta baza kontaminišućih proteina – (*engl.* common repository of adventitious proteins – cRAP) (115 sekvenci, pristupljeno bazi 08/05/2016). Parametri pretrage su, ukratko uključivali (i) modifikacije: karbamidometilacija Cys (kao fiksna), acetilacija N-terminusa peptida, oksidacija Met i deamidacija Gln, Asn (kao varijabilne), (ii) ograničenje verovatnoće statističke slučajnosti (*engl.* false discovery rate, FDR) na 0,1 – 5%. Uzeti su u obzir svi peptidi nastali delovanjem tripsina sa 2 do 4 preskočena mesta sečenja. Greška merenja je u slučaju peptida je iznosila ± 0.8 Da, dok je u slučaju proteina ± 10 ppm. Rezultati su filtrirani tako da su prihvatani samo proteini sa ocenom višom od 20, identifikovani sa bar jednim jedinstvenim peptidom za dati protein.

4.7.2. Relativna kvantifikacija alergena hrane metodom bez obeležavanja – LFM

Algoritam u okviru PEAKS X softverskog paketa pod nazivom PEAKS Q (Bioinformatics Solutions Inc., Kanada) (Tran, Qiao et al. 2019) je korišćen za relativnu kvantifikaciju alergena kikirikija ekstrahovanih iz sirovog i pečenog kikirikija. Nakon identifikacije proteina, algoritam za svaki alergen bira 3 najpogodnija peptida (svaki

peptid mora biti jedinstven za taj protein, mora biti okarakterisan kvalitetnim setom MS i MS/MS spektara i biti prisutan u oba ekstrakta) kojima određuje površinu pika sa jonskog hromatograma (XIC, *engl. extracted ion chromatogram*). Svaka od vrednosti XIC površina ova 3 peptida (tzv. Top3 metoda) se normalizuju u odnosu na površine ispod krivih ukupnih jonskih hromatograma (TIC, *engl. total ion chromatogram*) da bi se uzelo u obzir razlike u jonizaciji između analitičkih ponovaka. Ovako procenjena zastupljenost svakog od alergena u sirovom ekstraktu kikirikija je poređena sa onom iz termički tretiranog ekstrakta.

4.7.3. Identifikacija i profil posttranslacionih i hemijskih modifikacija

Nakon inicijalne pretrage PEAKS DB algoritmom i identifikacije proteina, pristupljeno je pretrazi modifikacija PEAKS PTM algoritmom. Pokrenuta je još jedna pretraga čiji su parametri uključivali sve gore navedene parametre pretrage uz dodatan parametar – provera prisustva 313 najčešće prisutnih posttranslacionih i hemijskih modifikacija među kojima su i fosforilacija, ubikvitinacija, metilacija, karbonilacija, karbamoilacija, hidroksilacija i sl.

Rezultati pretrage su dalje filtrirani tako da je svaki protein identifikovan na osnovu prisustva makar jednog njemu jedinstvenog peptida i da je verovatnoća da se svaka od detektovanih modifikacija nalazi baš na određenoj poziciji aminokiselinske sekvence (tzv. Ascore) veća od 50.

Za svaki od peptida koji na sebi nosi modifikaciju se određuje XIC površina, kao i za nemodifikovani oblik određenog peptida. Na osnovu ovih vrednosti je moguće napraviti PTM/HM profil za svaki alergen i izraziti udeo modifikovanih peptida u ukupnom setu detektovanih peptida (modifikovanih i nemodifikovanih).

Mesta N-glikozilacije su određena na osnovu podataka dostupnih na veb strani [www.uniprot.org](http://uniprot.org). Peptide calculator (<http://pepcalc.com/>) (Lear and Cobb 2016) je korišćen za određivanje teoretske mase peptida, dok je za procenu mesta sečenja pepsinom korišćen Peptide Cutter u okviru ExPASy servera [77].

4.8. Fluorescentna spektroskopija i gašenje fluorescencije

Emisioni spektri proteina i protein-EGCG kompleksa su snimani na FluoroMax-4 spektrofluorimetru (Horiba Scientific, Japan). Spektri su snimani u kivetu od 3,5 mL, na 25 °C. Preliminarni spektri Ara h 2 (50 μ M, u 50 mM fosfatnom puferu pH=8,0) su snimani na dve ekscitacione talasne dužine (λ_{ex}) 280 nm i 295 nm, dok je emisija snimana u opsegu (λ_{em}) 290 nm (ili 305 u slučaju λ_{ex} 295 nm) – 445 nm. U slučaju Ara h 6 (50 μ M, u 50 mM fosfatnom puferu pH=8,0) primenjeni su sledeći parametri: λ_{ex} 275 nm, λ_{em} 285 - 500 nm.

Eksperimenti gašenja fluorescencije Ara h 2 (25 μ g/mL) EGCG-om (2.5 mg/mL) su rađeni u 20 mM fosfatnom puferu pH 7,2, koji je ujedno korišćen kao slepa proba. Ara h 2 je titrovan alikvotima EGCG-a (11 x 1 μ L i 4 x 1,25 μ L) i nakon svakog dodatka je sniman spektar pri uslovima: λ_{ex} 280 nm, λ_{em} 290 - 500 nm. Kao slepa proba puferski rastvor je titrovan pod istim uslovima. Pre izrade grafika i primene opisanih matematičkih modela (SternVolmerov, Langmjuerov, Lererov i logaritamski) za izračunavanje parametara vezivanja polifenola za protein, od intenziteta emisije kompleksa protein-EGCG u datom λ_{em} opsegu je oduzimana odgovarajuća vrednost slepe probe. Svi spektri su snimljeni u triplikatu i za izračunavanja su korišćene srednje vrednosti sa standardnim devijacijama. Analiza spektara je rađena u OriginPro softverskom paketu (OriginLab, SAD).

4.9. Spektroskopija cirkularnog dihiroizma (CD)

Strukturna analiza alergena kikirikija (1 mg/mL u u 25 mM natrijum-fosfatnom puferu pH 7,2) sa i bez dodatka epigalokatehin-3-galata (EGCG) u molarnim odnosima 1:1, 1:1,5 i 1:10 rađena je pomoću spektroskopije cirkularnog dihiroizma (CD). Spektri su snimani na JASCO J-815 spektropolarimetru (JASCO, Tokio, Japan). Sistem je kalibrisan 0,6 g/l amonijum d-10-kamfor-sulfonatom čiji je elipticitet poznat (+190.4 mdeg na 290.5 nm). Spektri alergena hrane i njihovih modifikata su snimani na 20 °C u dalekoj ultraljubičastoj oblasti (190-260 nm) u kivetu sa dužinom optičkog puta od 0,5 mm. Spektri su snimani u atmosferi N₂, brzinom od 100 nm/min u inkrementima od 0,1 nm. Svaki spektar je snimljen 4 puta i uzeta je njihova srednja vrednost. Rezultati su predstavljeni kao srednji molarni elipticitet ($[\theta]$) ak ostataka proteina:

$$[\theta] = \frac{\theta}{10 \times n \times C \times d}$$

gde je θ izmereni elipticitet, n je broj aminokiselinskih ostataka u proteinu, C je molarna koncentracija proteina u uzorku, a d je dužina optičkog puta u kivetu. Za izračunavanje udela sekundarnih struktura u procentima korišćeni su CONTIN softver i SP29 set proteina, dostupni u okviru CDPro softverskog paketa (Colorado State University, SAD).

4.10. Izotermalna titraciona mikrokalorimetrija (ITC)

Izotermalna titraciona mikrokalorimetrijska merenja (ITC) su izvedena na uređaju MicroCal iTC200 (GE Lifesciences, SAD). Alergeni kikirikija, Ara h 2 i Ara h 6 (30 μ M, u 20 mM fosfatnom puferu, pH 7,2) su titrovani u ćeliji zapremine 1,4 mL, 20 alikvota od 10 μ L EGCG (370 μ M) iz injekcionog šprica. Radi ekvibracije je pravljena pauza od 1 min između dodavanja alikvota i sadržaj titracione ćelije je mešan brzinom od 100 rpm. Sirovi podaci se dobijaju u formi oslobođene toplote (μ cal/sec) u funkciji vremena (min), a nakon integracije daju promenu entalpije po molu titranta (EGCG) (Δ Hobs, kcal/mol) u funkciji molarnog odnosa titranda i titranta. Kao slepa proba korišćen je puferasti rastvor koji je titrovao u istim uslovima. Analiza podataka je rađena u MicroCal ITC data analysis programu

4.11. Računarske metode

4.11.2. Preklapanje aminokiselinskih sekvenci i tercijarnih struktura proteina

Sekvence proteina su u FASTA formatu preuzete sa UniProtKB sajta (<https://www.uniprot.org/>) i njihovo preklapanje radi procene sličnosti je na istom sajtu rađeno uz pomoć alatke align kroz program ClustalOmega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Soding 2005).

Strukture proteina su preuzete iz RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>) i to Ara h 2 (PDB ID 3OB4) i Ara h 6 (PDB ID 1W2Q). Strukturno preklapanje je rađeno pomoću Swiss PDB Viewer algoritma (Guex and Peitsch 1997).

4.12. Statistička analiza i izrada grafika

Za potrebe statističke obrade podataka i crtanje grafika su korišćeni Excel (Microsoft, SAD), Origin (OriginLab, SAD) i GraphPadPrism (GraphPad Software Inc., SAD) za potrebe analize metodama proteomike, spektroskopije (fluorescentne i CD) i ITC. Kao test statističke značajnosti je korišćen neupareni t-test, uz prag značajnosti od 0,05 (alpha 0,05).

5. Rezultati i diskusija

U ovoj tezi smo težili da modifikacije koje nose alergeni hrane i interakcije koje uspostavljaju sa bioaktivnim polifenolima dovedemo u vezu sa funkcionalnim osobinama značajnim za uspostavljanje alergijskog odgovora (struktura, podložnost delovanju digestivnih enzima i sl.).

Prvi deo istraživanja se bavi posttranslacionim i hemijskim modifikacijama koje nose alergeni hrane. Za početak je na model proteinu za alergije na crveno meso izučena N-glikanska posttranslaciona modifikacija koja je ujedno IgE epitop – α -Gal. Primenom enzimskog eseja i imunoblota je potvrđeno da nakon dejstva pepsina nastaju TG peptidi koji nose na sebi α -Gal modifikaciju i nakon 2 sata digestije su adekvatne veličine za izazivanje IgE odgovora. Nakon toga je okarakterisan ukupan profil PTM i HM koje su vezane za glavne alergene kikirikija iz sirovog i pečenog zrna. Uočene su razlike u ekstraktabilnosti proteina između sirovog i pečenog kikirikija, i razlike u modifikacijama alergena koje su prisutne u kvalitativnom i u kvantitativnom smislu.

U drugom delu je pažnja posvećena interakcijama i kompleksima koje dva najznačajnija alergena kikirikija grade sa katehinom zelenog čaja čija se biološka aktivnost, između ostalog povezuje sa slabijim alergijskim odgovorom i povećanom podložnošću dejstvu digestivnih enzima. Formiranje kompleksa prate povoljni energetske uslovi uz vezivanje jednog molekula polifenola po proteinu i opuštanje 3D strukture. Moguće je da, sa vezivanjem EGCG i strukturnim promenama koje se dešavaju, dolazi do remećenja konformacionih epitopa, što bi moglo da objasni anti-alergijski efekat. Takođe je moguće da je ovim olakšan prilaz enzima mestima sečenja, što bi potpomoglo digestiju.

5.1. α -Gal posttranslaciona modifikacija ostaje vezana za tiroglobulin i nakon pepsinske digestije

Alergija na crveno meso je alergija kod koje je epitop za koji se vezuju IgE antitela alergičnih pacijenata zapravo posttranslaciona modifikacija, šećer α -Gal. Upravo činjenica da je modifikacija na proteinu ujedno i epitop za IgE ukazuje na značaj posttranslacionih modifikacija za proteine i njihove osobine, gde u ovom slučaju ne bi bilo alergijske reakcije da ona nije prisutna. U ovom delu studije je proučavana pepsinoliza goveđeg tiroglobulina (TG), peptida koji nastaju tim putem, prisustvo i pozicija α -Gal na njima.

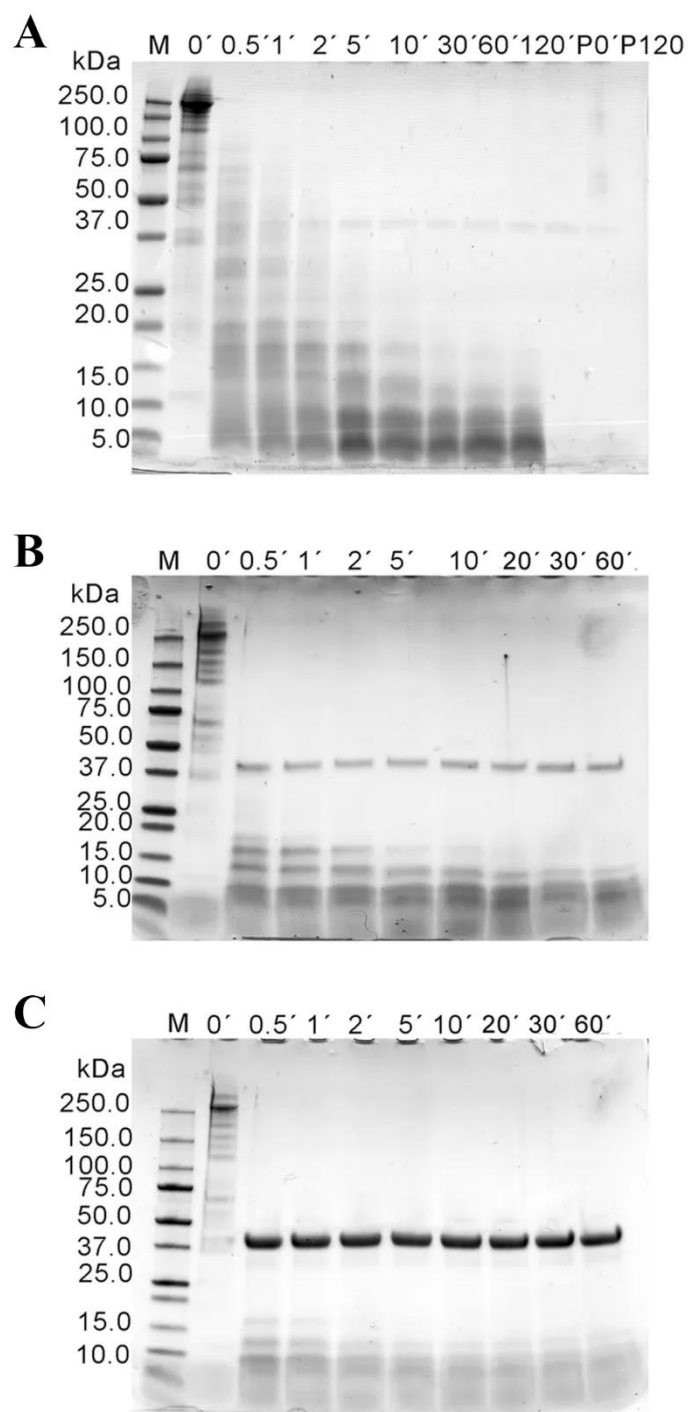
5.1.1. Pepsinski peptidi tiroglobulina su nosioci α -Gal

Hrana bogata α -Gal izaziva odloženi tip alergije na hranu, te je verovatno neophodno da hrana prođe kroz procese obrade u gastrointestinalnom traktu da bi došlo do razvoja simptoma. Pokazalo se da je α -Gal alergeni epitop prisutan u hrani i ima izuzetan klinički značaj i proučavanje njegovih osobina, poput otpornosti na digestiju hidrolitičkim enzimima je bitan aspekt za procenu njegove alergenosti.

Goveđi tiroglobulin u redukujućim uslovima nakon elektroforetskog razdvajanja daje traku na 270 kDa, uz prisustvo traka nižih molekulskih masa koje su rezultat redukcije disulfidnih mostova ili potiču od nečistoća prisutnih u komercijalnom preparatu. TG pri ovim uslovima brzo podleže digestiji pepsinom, te već nakon 30 s nestaje glavna proteinska traka i u prvih 5 min vidljiv je niz traka nižih masa od 100, 75, 50 i 40 kDa (Slika 16A). U 10. minutu se na gelu vide peptidi veličine ~15 kDa, koji opstaju do 60. min. Pepsinoliza je ponovljena uz primenu 5 i 20 puta veće koncentracije pepsina i u oba slučaja napreduje znatno brže. Peptidi od 15 kDa su uočljivi već nakon 2 min digestije i opstaju do 30 min kada se primeni 1 U pepsina po μ g proteina (Slika 16B), dok u slučaju koncentracije pepsina od 10 U/ μ g proteina ova traka nestaje već nakon 2 min (Slika 16C).

Peptidi manji od 15 kDa opstaju u vremenskom okviru u kom je proučavana hidroliza pepsinom. TG deglikozilovan enzimskim putem (Apostolovic, Tran et al. 2015) nije rastvoran u kiseloj sredini, pa nije bilo moguće ispitati njegovu podložnost pepsinolizi. Ovo znači da glikozilacija, ako izostane kao PTM značajno utiče na još jednu osobinu

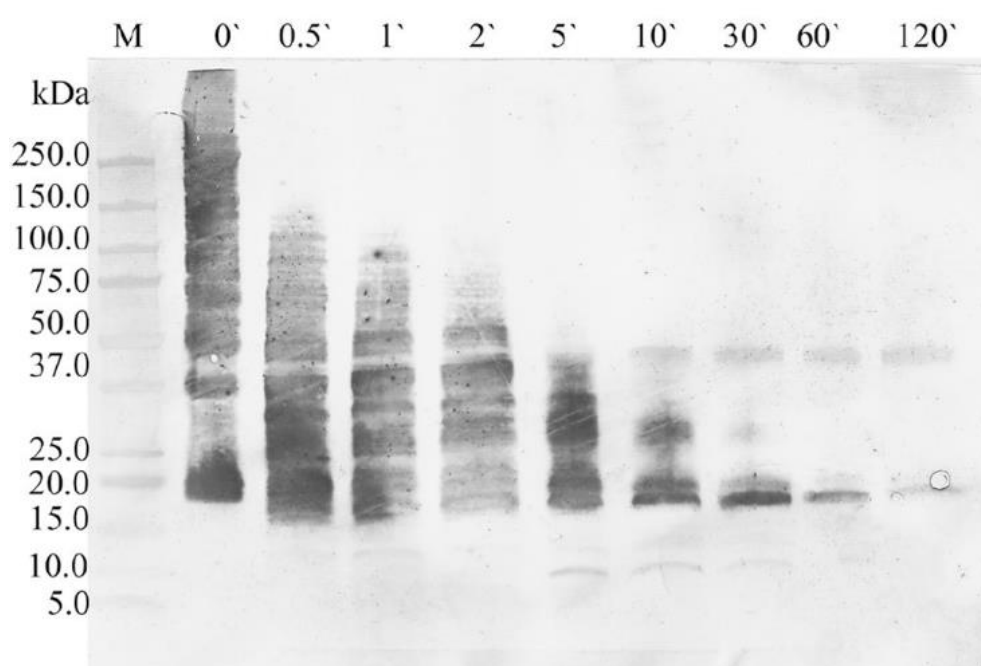
proteina – rastvorljivost na niskim pH vrednostima što znači da je takav TG otporan na pepsinsku digestiju.



Slika 16. Elektroforetska analiza simulirane želudačne digestije govedeg tiroglobulina, nosioca α -Gal. A. 0,2 U pepsina po μ g proteina; B. 1 U pepsina po μ g proteina; C. 10 U pepsina po μ g proteina. Vreme digestije (u minutima) je naznačeno iznad svake slike.

P0' i P120' su kontrolni rastvori koji sadrže samo pepsin nakon 0 i 120 min digestije.

Prisustvo α -Gal modifikacije na TG i peptidima nastalim njegovom digestijom je provereno pomoću imunoblota sa komercijalno dostupnima monoklonskim antitelom na α -Gal (Slika 17). U toku pepsinolize ova PTM je prisutna na svim peptidima – peptidi nastali i nakon 2 sata delovanja pepsina sadrže α -Gal.

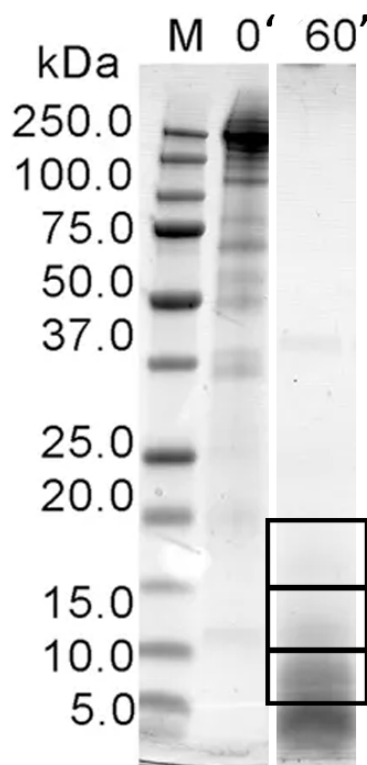


Slika 17. Detekcija α -Gal peptida imunoblotom. TG i njegovi peptidi nastali *in vitro* digestijom pepsinom (0,2 U/ μ g proteina) sa vremenom digestije naznačenim iznad slike u minutima

U ovoj studiji je pokazano da TG podleže digestiji pepsinom u prethodno publikovanim uslovima (Thomas, Aalbers et al. 2004) i da deglikozilovan TG nije rastvorljiv u kiseloj sredini (i samim tim je otporan na gastričnu digestiju). Ispitali smo tok hidrolize TG koristeći protokol Moreno i saradnika (Moreno, Mellon et al. 2005) i uočili da nakon 10 min delovanja pepsina nastaju peptidi veličine 14-17 kDa, koji opstaju do kraja simulirane želudačne digestije. Prisustvo α -Gal na ovim peptidima je potvrđeno imunoblotom sa komercijalno dostupnim antitelom na ovu modifikaciju.

5.1.2. Analiza položaja α -Gal na pepsinskim peptidima TG-a primenom proteomike i bioinformatike

Peptidi nastali nakon jednog sata pepsinske hidrolize su elektroforetski razdvojeni, isečeni iz gela i analizirani tandem masenom spektrometrijom nLC-MS/MS. Isečene su i analizirane tri trake niskih molekulskih masa: 5-10, 10-15 i 15-20 kDa (Slika 18) i podvrgnute redukciji, alkilaciji i digestiji tripsinom kao pripremnim koracima za MS analizu. Pokazano je da peptidi TG nastali delovanjem pepsina u datom opsegu masa zadržavaju IgE reaktivnost (Apostolovic, Krstic et al. 2017), te su zato baš one izabrane za dalju analizu. Peptidi manji od 5 kDa ređe vezuju IgE (Bøgh, Barkholt et al. 2013), dok su oni od preko 20 kDa u rangu veličine nekih intaktnih proteina, te iz tih razloga nisu analizirani.



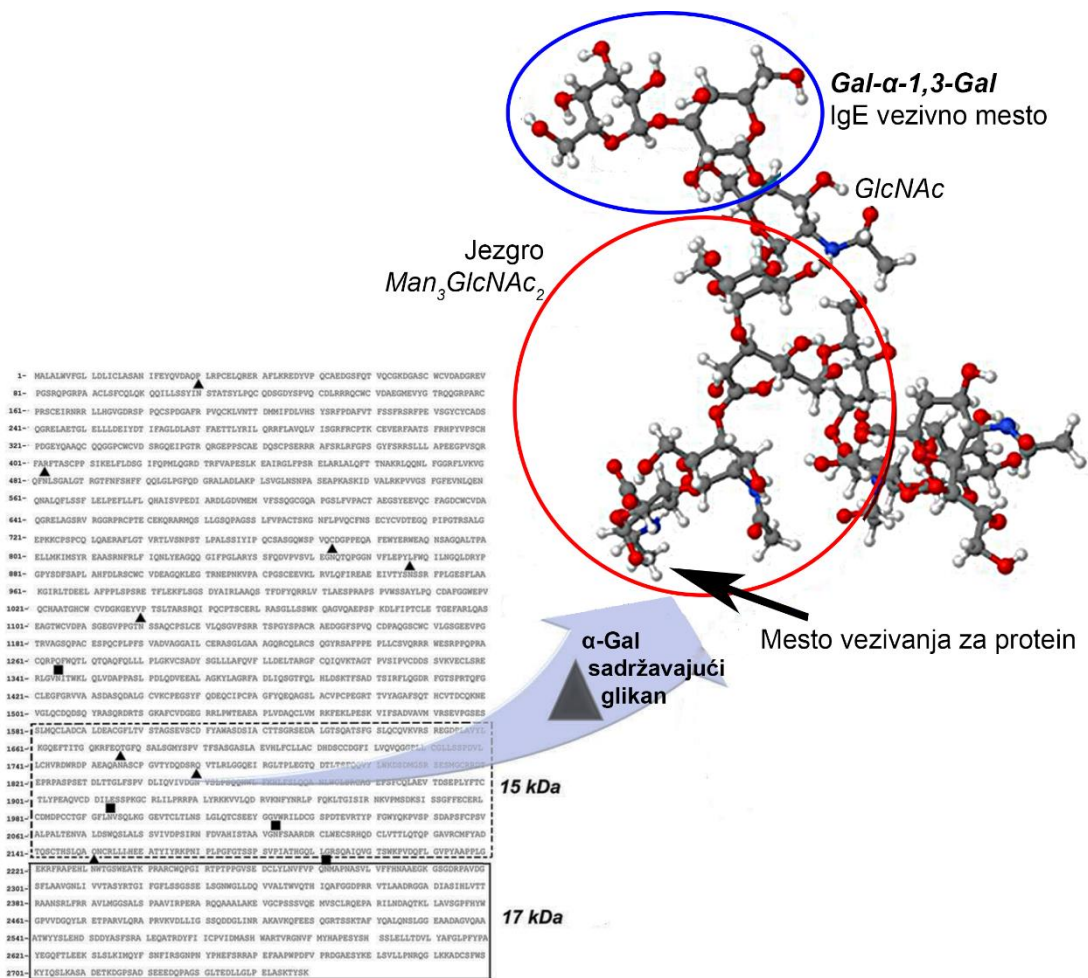
Slika 18. Trake isečene iz PAA gela radi LC-MS/MS analize peptida goveđeg TG nastalih nakon 60 min simulirane želudačne sa 0,2 U pepsina po μ g proteina

Peptidi TG nastali nakon 60 min pepsinske digestije detektovani masenom spektrometrijom su prikazani u Tabeli 4. Na slici 19 je prikazana sekvenca TG, na kojoj su obeležena poznata mesta N-glikozilacije (složeni ili hibridni tip glikana je označen

trouglovima, a tip sa visokim sadržajem manoze kvadratima). Pepsinski peptid veličine 17 kDa se nalazi na C-terminusu TG i na Slici 19 je uokviren punom linijom. Ovaj region ima dva mesta glikozilacije: (i) na poziciji Asn2272 - sa visokim sadržajem manoze i (ii) složenog ili hibridnog tipa, na Asn2231. Glikani sa visokim sadržajem manoze ne sadrže α -Gal, te ovaj peptid nosi α -Gal isključivo na poziciji Asn2231. Peptidi detektovani u traci gela koja odgovara masama od 10 do 15 kDa se nalaze bliže jezgru TG, u delu ak sekvence od Arg1626 do Asn2169 (Slika 19, deo sekvence uokviren isprekidanom linijom). U ovom regionu su vezana dva glikana složenog/hibridnog tipa, na pozicijama Asn1756 i Asn1850, stoga postoji mogućnost da oba sadrže Gal- α -1,3-Gal.

Tabela 4. Peptidi goveđeg tiroglobulina detektovani iz gela masenom spektrometrijom visoke rezolucije. Brojevi na početku i kraju svake peptidne sekvence predstavljaju redni broj aminokiseline u sekvenci TG (UniProt: P1027), # Spek. – broj identifikovanih spektara datog peptida, z – naelektrisanje detektovanog peptidnog jona, Prot. Masa – masa protonovanog peptida, RT – retenciono vreme.

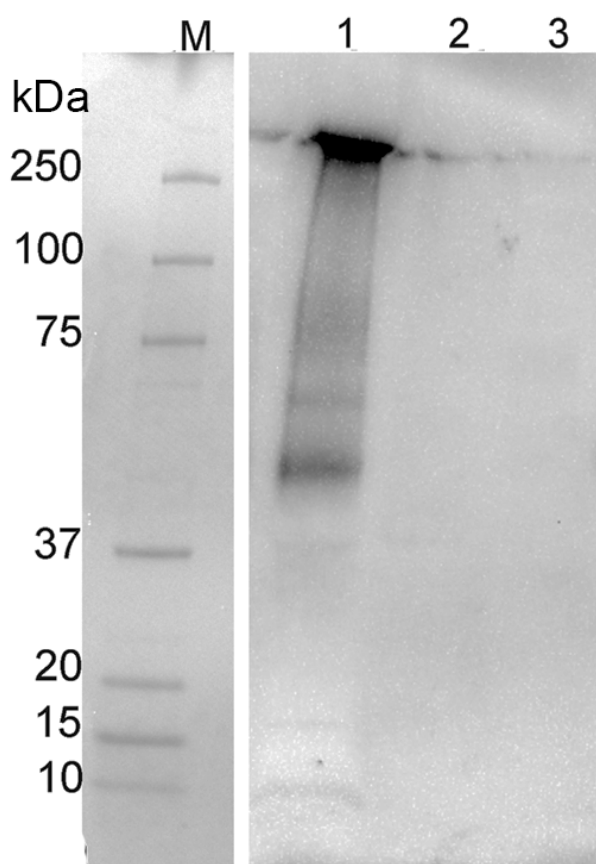
#	Aminokiselinska sekvenca	# Spek.	z	Prot. masa [Da]	RT [min]
Maseni opseg 15 – 20 kDa					
1	²⁴⁸⁵ VDLLIGSSQDDGLINR ²⁵⁰¹	6	3	1715,8835	23,68
2	²²⁴⁴ ARCWQPGIR ²²⁵²	1	2	1144,5590	20,04
Maseni opseg 10 - 15 kDa					
3	²²⁹¹ GSGDRPAVDGSFLAAVGNLIVVTAS ²³¹⁹	1	3	2692,4073	39,17
4	²¹³¹ CLWECSR ²¹³⁷	1	2	1010,4180	27,36
5	²¹²⁹ DRCLWECSR ²¹³⁷	1	2	1281,5469	26,38
6	²⁰²⁰ GGEVTCLTNSLGLQTCSEEYGGVWR ²⁰⁴⁵	2	3	2886,3376	35,44
7	¹⁹⁸¹ NKVPMSDKSISSGFFECER ¹⁹⁹⁹	2	4	2218,0257	28,64
8	¹⁹⁸⁸ SISSGFFECER ¹⁹⁹⁹	1	2	1318,5736	30,23
9	¹⁶⁴⁷ SEDALGTSQATSFGLQCQVK ¹⁶⁶⁷	2	2	2214,0349	30,75
10	¹⁵⁸¹ VIFSADVAVMVR ¹⁵⁹²	1	2	1306,7199	33,22
11	¹³⁷⁹ FADLIQSGTFQLHLSK ¹³⁹⁵	1	3	1919,9877	33,44
12	¹³³⁷ TAGTPVSIPVCDSSVKVECLSR ¹³⁵⁹	6	3	2477,2020	30,42
13	¹³⁰⁹ GFCQIQVK ¹³¹⁶	1	2	979,5027	26,86
14	¹³⁰⁵ VCSADYSGLLAFQVFLDELTA ¹³²⁸	2	3	2701,3937	44,39
15	¹²⁵⁵ SAFPPEPLLCVQR ¹²⁶⁸	4	2	1600,8146	33,36
16	¹¹⁷¹ AEDGGFSPVQCDPAQGSCWCVLGSGEEVPGTR ¹²⁰²	1	3	3409,4571	33,82
17	⁹⁹⁶ LAAQSTFDYQR ¹⁰⁰⁷	1	2	1446,7013	31,06
18	⁴¹⁴ ELFLDSGIFQPMQGR ⁴²⁹	2	3	1851,9279	31,19
19	²⁸⁴ FLAVQLVISGR ²⁹⁴	1	2	1202,7255	34,01
20	²¹⁴ FPDAFVTFSSFR ²²⁸	1	2	1420,6903	35,59
21	¹⁷⁹ SPPQCSPDGAFRPVQCK ¹⁹⁵	1	3	1930,8890	25,66
22	¹⁷¹ LLHGVGDRSPPQCSPDGAFRPVQCK ¹⁹⁵	1	5	2778,3555	25,56
23	⁸⁵ QPGRPAACLSFCQLQK ¹⁰⁰	1	3	1862,8807	25,36



Slika 19. Položaj α -Gal u TG peptidima nastalim nakon jednočasovne pepsinske digestije. Gastrični peptidi tiroglobulina identifikovani pomoću nLC-MS/MS (levo). TG aminokiselinska sekvenca P1027 je preuzeta iz Uniprot baze podataka (www.uniprot.org). Peptidi detektovani u traci masenog opsega 15-20 kDa su uokvireni punom linijom, a opsega 10-15 kDa isprekidanom linijom. Mesta N-glikozilacije za koja je vezan složeni ili hibridni tip glikana su označena trouglovima (\blacktriangle), dok su ona za koja je vezan tip sa visokim sadržajem manoze kvadratom (\blacksquare). Model α -Gal sadržavajući glikana koji je vezan za peptid ili protein (desno). Gal- α 1,3-Gal epitop je okružen plavom bojom. Jezgro glikana $Man_3GlcNAc_2$ je okruženo crvenom bojom, a mesto na kom se glikan vezuje za protein [Asn-X-Thr(Ser)] je naznačeno crnom strelicom. Model je kreiran uz pomoć Avogadro softvera v1.1.1.

Tireoglobulin pored α -Gal u sastavu složenog tipa glikana sadrži N-glikolilneuraminsku kiselinu (Neu5Gc), koja nije eksprimirana kod ljudi i može doći do stvaranja antitela na

ovaj epitop (Zhu and Hurst 2002). Prisustvo Neu5Gc je u intaktnom i pepsinom digestovanom TG je provereno imunoblotom sa specifičnim antitelom (**Slika 20**). Za razliku od α -Gal, Neu5Gc ne ostaje vezana za peptide TG nakon pepsinske digestije (bunar 2) iako je vezana za intaktan TG (bunar 1). Ovim se isključuje mogućnost da se IgE antitela osoba alergičnih na crveno meso vezuju za Neu5Gc i potvrđuje da je α -Gal zapravo modifikacija epitop koji dovodi do alergijske reakcije.



Slika 20. Detekcija Neu5Gc na goveđem tiroglobulinu i peptidima nastalim delovanjem pepsina imunoblotoma sa antitelom specifičnim na Neu5Gc. Bunar 1–TG; bunar 2–peptidi TG nakon 60 min digestije pepsinom; bunar 3 – kontrola: pepsin nakon 60 min digestije; M – proteinski molekulski markeri.

Analiza IgE reaktivnih peptida (Apostolovic, Krstic et al. 2017) masenom spektrometrijom je pokazala da su oni deo C-terminusa i jezgra TG. Peptidi analizirani u ovoj studiji ne sadrže sva pretpostavljena mesta vezivanja α -Gal sadržavajućih glikana.

Peptid od 17 kDa sadrži samo jedno potencijalno mesto glikozilacije za koje je vezan α -Gal i ono se nalazi u blizini C-terminusa, što se slaže sa prethodno publikovanim podacima (Spiro and Bhoyroo 1984, Geyer, Kempf et al. 1990). Peptidi detektovani u nižem masenom opsegu (10-15 kDa) sadrže 2 potencijala mesta vezivanja - Asn1756, Asn1850, ali ne sadrže Neu5Gc. Analogan region tiroglobulina svinjskog porekla takođe sadrži složeni tip glikana, u okviru kog se galaktozil- α 1,3-galaktozo- β 1,4-N-acetilglukozaminski epitop nalazi na jednoj, a galaktozo- β 1,4-N-acetilglukozaminski epitop na drugoj grani (Harvey 2005).

Delovanjem tripsina nastaju peptidi TG koji na sebi nose α -Gal i zadržavaju sposobnost da vežu IgE alergičnih osoba (Apostolovic, Krstic et al. 2017), što se odvija uz učešće oba molekula galaktoze iz α -Gal (Plum, Michel et al. 2011). α -Gal je prezentovan imunskom sistemu vezan za tzv. nosač – peptidni ili lipidni, što sa matriksom hrane i drugim faktorima utiče na proces varenja i procese posredovane IgE-antitelima koji slede. Treba imati u vidu da je pepsinoliza početni korak u obradi hrane u okviru GIT-a i da je potrebno ispitati i uticaj ostalih koraka u varenju hrane kako bi se stekla potpuna slika o sudbini i uticaju α -Gal nosećih molekula na organizam.

5.2. Komparativna studija posttranslacionih i hemijskih modifikacija glavnih alergena iz sirovog i pečenog kikirikija

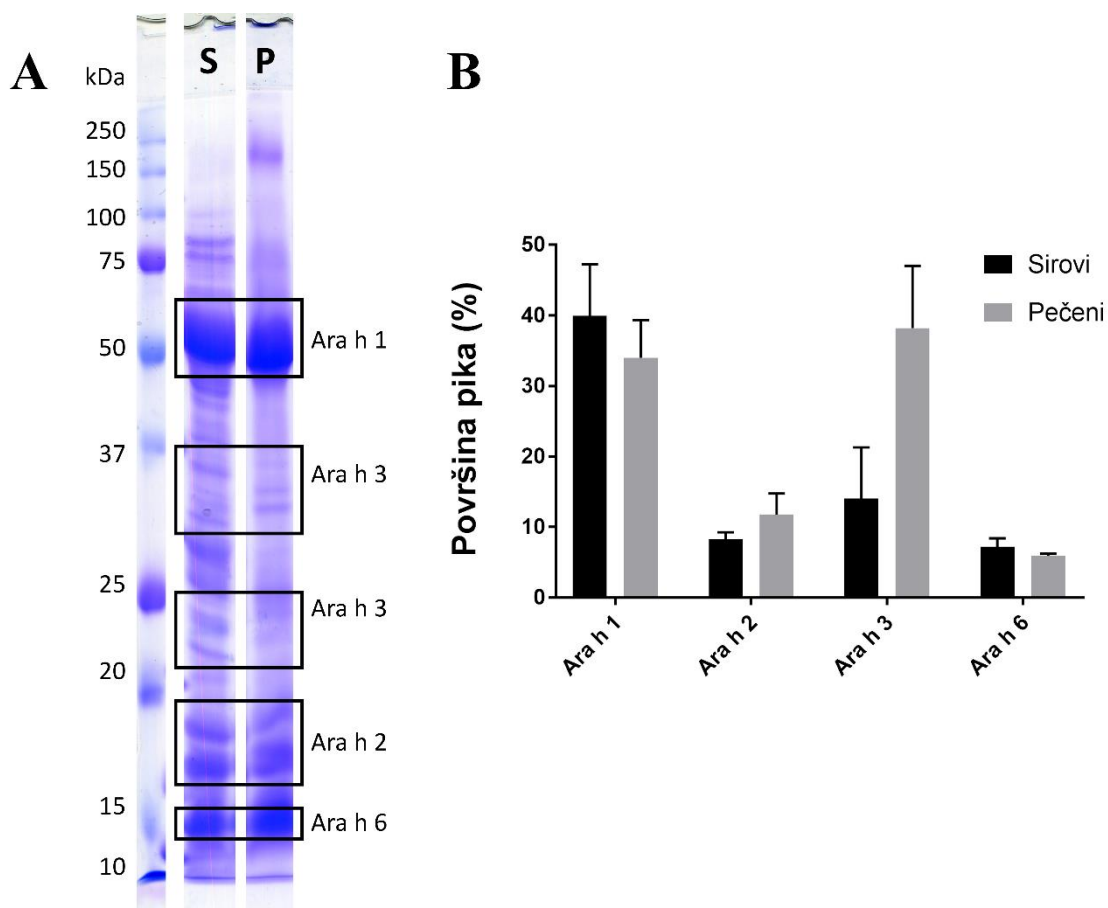
Pečeni kikiriki ima jači alergeni potencijal od prženog ili kuvanog (Maleki, Chung et al. 2000). Poznato je da je Ara h 1 glikozilovan (Kolarich and Altmann 2000), i Ara h 6 donekle (Suhr, Wicklein et al. 2004), dok Ara h 2 sadrži hidroksilovane proline (Li, Shefcheck et al. 2010). Zna se da proteini pečenog kikirikija na sebi nose modifikacije poput AGE proizvoda (karboksi-metil-lizin, karboksi-etil-lizin, pirlin i pentozidin) (Poulsen, Hedegaard et al. 2013), i da dolazi do oligomerizacije proteina tokom termalnog tretmana (Maleki, Chung et al. 2000). Okarakterisano je preko 200 posttranslacionih i hemijskih modifikacija proteina (Walsh, Garneau-Tsodikova et al. 2005), ali do sada nije objavljena opsežnija studija o njihovom prisustvu na alergenima poreklom iz sirovog ili pečenog kikirikija. Pretpostavlja se je da pečeni kikiriki na sebi nosi drugačiji profil modifikacija – bilo da nosi jedinstveni set modifikacija, ili se razlikuju raspored ili zatupljenost istih modifikacija u odnosu na sirovi ili drugačije termički obrađen kikiriki. U ovom delu disertacije su analizirani odmašćeni proteinski ekstrakti sirovog i pečenog kikirikija. Cilj ovog dela istraživanja je detaljna karakterizacija modifikacija koje nose četiri glavna alergena kikirikija – Ara h 1, 2, 3 i 6 i razlike u njima između dva ekstrakta kikirikija.

5.2.1. Postoje razlike u proteinskim profilima između sirovog i pečenog kikirikija

Ekstrakti sirovog i pečenog kikirikija (u PBS-u) su nakon odmašćivanja podvrgnuti određivanju koncentracije proteina metodom BCA. Koncentracija proteina ekstrahovanih iz pečenog kikirikija (4,8 mg/mL) je značajno manja u odnosu na sirovi kikiriki (18,8 mg/mL) ($p = 0,00283$). Ovakav rezultat je u skladu sa prethodno publikovanim i niža ekstraktabilnost (rastvorljivost) proteina se može objasniti njihovim agregiranjem i nastankom AGE proizvoda usled izloženosti kikirikija visokoj temperaturi (Schmitt, Nesbit et al. 2010).

Radi poređenja proteinskih profila elektroforetski (SDS PAGE) iste količine ekstrakata su analizirane u redukujućim uslovima - 100 μ g proteinskog ekstrakta nanoseno po traci. Kao što se vidi na Slici 21A, trake su nešto oštrije u slučaju sirovog ekstrakta (S).

„Razmaz“ uočljiv celom dužinom gela sa ekstraktom pečenog kikirikija (P) bi mogao ukazivati na modifikaciju proteina i formiranje krajnjih proizvoda glikacije (Thornalley, Battah et al. 2003). Prisustvo trake visoke molekulske mase (~ 200 kDa) jedinstvenu za P ekstrakt ukazuje na agregaciju proteina tokom pečenja i to verovatno Ara h 1 (Maleki, Chung et al. 2000).



Slika 21. Analiza proteinskih ekstrakata sirovog i pečenog kikirikija. **A.** SDS PAGE u redukujućim uslovima ekstrakata sirovog (S) i pečenog (P) kikirikija, naneto je 100 μ g proteina po traci. Gel se sastoji od 4% PAA gela za koncentrovanje i 12% PAA gela za razdvajanje, pripremljenog u laboratoriji između staklenih pomoć ploča dimenzija 20 x 20 x 0,3 cm. **B.** Relativna kvantifikacija glavnih alergena kikirikija LFQ metodom na osnovu masenih spektara visoke rezolucije

Sva četiri glavna alergena su prisutna u S i P ekstraktima (Slika 21). Njihovo prisustvo na uokvirenim pozicijama u gelu je potvrđeno masenom spektrometrijom, nakon digestije tripsinom u gelu (Prilozi 1 – 4). Pored analize proteina iz gela, masenom spektrometrijom

su analizirani S i P ekstrakti digestovani u rastvoru. Kombinacijom ova dva pristupa pripreme osigurana je pouzdanost detekcije, identifikacije i relativne kvantifikacije proteina kikirikija (proteini detektovani na ovaj način su prikazani u Prilozima 5 i 6). Primenom relativne kvantifikacije bez obeležavanja, LFQ, pomoću PEAKS Studio X softverskog paketa (BSI, Kanada) upoređene su količine četiri antigena u S i P preparatima. LFQ analiza je pokazala da je procentualna zastupljenost svakog od analiziranih alergena u odnosu na ukupnu analiziranu količinu proteina u ekstraktu slična i da nema statistički značajne razlike između sirovog i pečenog kikirikija analiziranog na ovaj način (Slika 21B).

5.2.2. Razlike u profilu modifikacija prisutnih na alergenima iz pečenog i sirovog kikirikija

Primenom imunoblota sa antitelima koja se specifično vezuju za pojedine modifikovane ak ostatke, masene spektrometrije i specijalizovanih algoritama za identifikaciju i karakterizaciju proteina su analizirani profili posttranslacionih i hemijskih modifikacija četiri glavna alergena kikirikija i njihove razlike između ekstrakata sirovog i pečenog kikirikija. Ekstrakti su pripremljeni iz gela i u rastvoru, tako da je jednaka količina proteina iz oba ekstrakta analizirana masenospektrometrijski. Masenom spektrometrijom je detektovano 27 različitih modifikacija na četiri alergena (Slike 22 - 25) iz dva ekstrakta i u Tabeli 5 su uz prikaz promene mase (delta m), naznačeni i ak ostaci na kojima su date modifikacije detektovane. Generalno se ove modifikacije mogu podeliti na one koje se dešavaju posredstvom enzima i spontano; neke PTM su normalna i očekivana pojava u fiziološkim uslovima (poput metilacije, acetilacije, glikozilacije i sl.), a druge mogu biti posledica patofiziologije poput stanja sa izrazito povišenim oksidativnim stresom uključujući ne samo kiseonične već i azotne i druge reaktivne vrste (npr. povećana oksidacija Met, His, Trp, pojava karboksimetilacije, hidroksilacije, nitrilacije, hlorovanja i sl.) (Smiljanic, Prodic et al. 2019). Modifikacije koje se javljaju na preko 5 ak pozicija po proteinu i ujedno su oksidativne su deamidacija (N, Q), piroglutamat (Q, E) (sve u slučaju Ara h 1 S i P) i oksidacija (M, H, W) (Ara h 1 S i P, Ara h 6 S i P) (Slike 22 i 25).

Tabela 5. Modifikacije (posttranslacione i hemijske) detektovane masenom spektrometrijom i identifikovane PEAKS PTM algoritmom (BSI, Kanada) na glavnim alergenima kikirikija iz sirovog i pečenog ekstrakta. U uglastim zagradama su prikazane jednoslovne skraćenice aminokiselina na kojima se modifikacija može naći, X označava bilo koju aminokiselinu, Nt i Ct označava ak ostatak na N- ili C-terminusu, redom

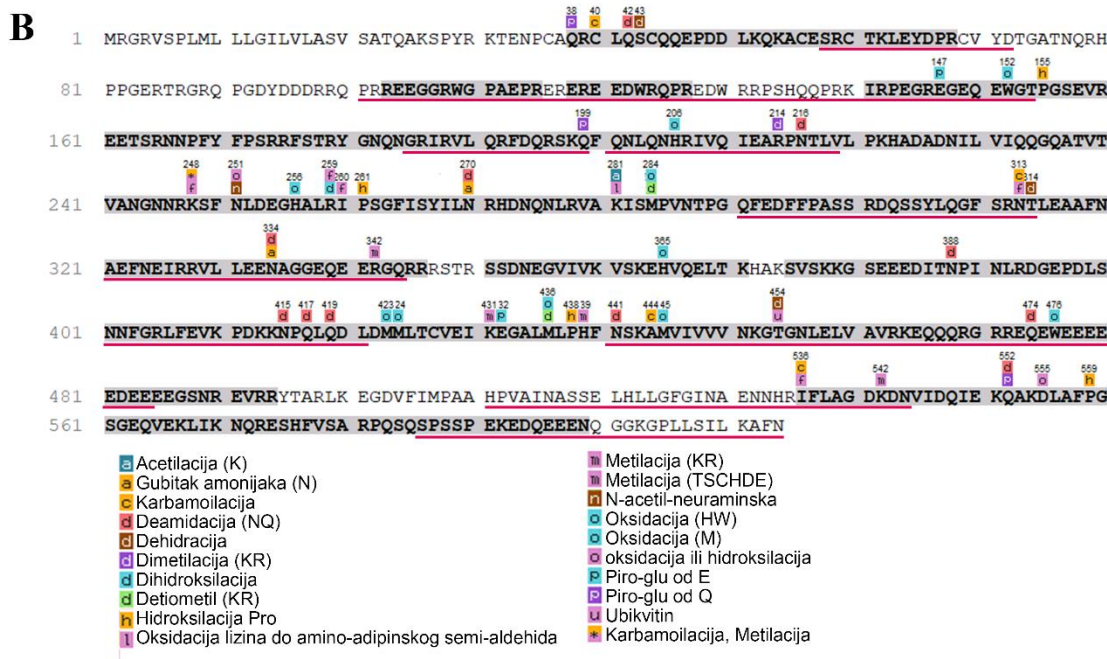
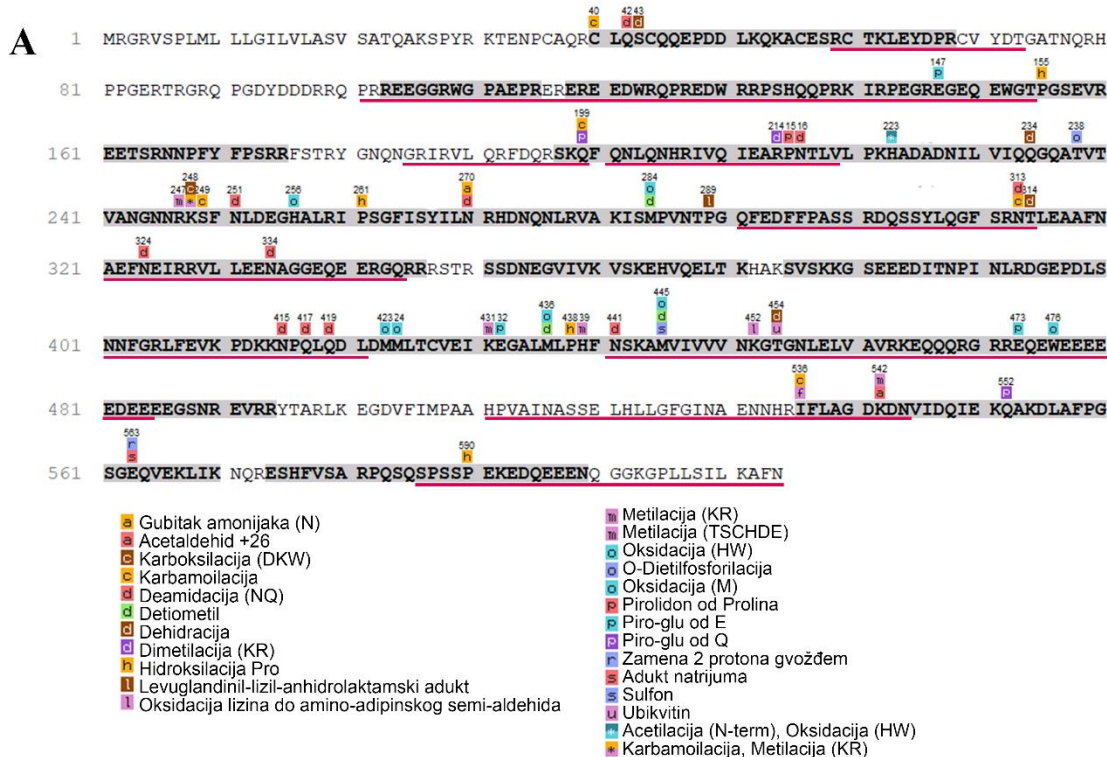
Modifikacije	Skraćenica	Masa modifikacije (Da)	AK ostaci
Acetilacija (K)	AcK	42.0106	[K]
Acetaldehid	AcAD	26.0157	[KH]
Deamidacija (NQ)	Deam	0.9840	[NQ]
Dehidratacija	deHid	-18.0106	[DYTS], [NQ] na Ct
Detiometil	deTMe	-48.0034	[M]
Dihidroksi	DiHid	31.9898	[YWFRKPC]
Dimetilacija(KR)	DiMet	28.0313	[KR]
Gubitak amonijaka	(-NH ₃)	-17.0265	[N]
Hidroksilacija Pro	hPro	15.9949	[P]
Karbamilacija	Karb	43.0058	[K], [X] na Nt
Karboksimetilacija	CM	58.0055	[CKW], [X] na Nt
Levuglandinil-lizin anhidrolaktamski adukt	LgK	314.1882	[K], [X] na Nt
Metilfosfonilacija	MePh	77.9871	[YTS]
Metilacija (TSCHE)	Me	14.0157	[TSCHE]
Metilacija(KR)	MeKR	14.0157	[KR]
Monoglutamil	mGlu	129.0426	[E]
N-acetil neuraminska kiselina	Neu5Ac	291.0954	[NTS]
O-Dietilfosforilacija	diEtPh	136.0289	[YTSHCK]
Oksidacija (HW)	OxHW	15.9949	[HW]
Oksidacija (M)	OxM	15.9949	[M]
Oksidacija ili Hidroksilacija	OX/Hyd	15.9949	[RYPNKD], [G] na Ct
Piro-glutamat od Glu	pGlu	-18.0106	[E] na Nt
Piro-glutamat od Gln	pGlu	-17,026548	[Q] na Nt
Pirolidon od Prolina	Pirol	-27.9949	[P]
Sulfon	OxoM	31.9898	[M]
Ubikvitin	Ub	114.0429	[TSCK]
Zamena 2 protona gvožđem	Fe	53.9193	[DE], [X] na Ct

Glavni alergeni kikirikija na sebi nose 6 do 23 različite PTM i HM, a najviše različitih se nalazi na Ara h 1 (Tabela 6). Ovo je donekle, očekivano, s obzirom da je ovaj protein najveći među izučavanim (537 ak). Međutim, gledano prema udelu modifikovane sekvence, najmanji od ovde proučavanih alergena – Ara h 6 prednjači sa 15% modifikovane sekvence kod sirovog i nešto manje (12%) kod pečenog ekstrakta (Tabela 6).

Tabela 6. Procentni udeli modifikacija na osnovu dužine ak sekvence i brojne vrednosti kvalitativno različitih posttranslacionih i hemijskih modifikacija glavnih alergena kikirikija. Procentni udeo modifikovane sekvence predstavlja procentualno izražen broj ak pozicija koje nose modifikaciju u odnosu na ukupan broj ak u sekvenci.

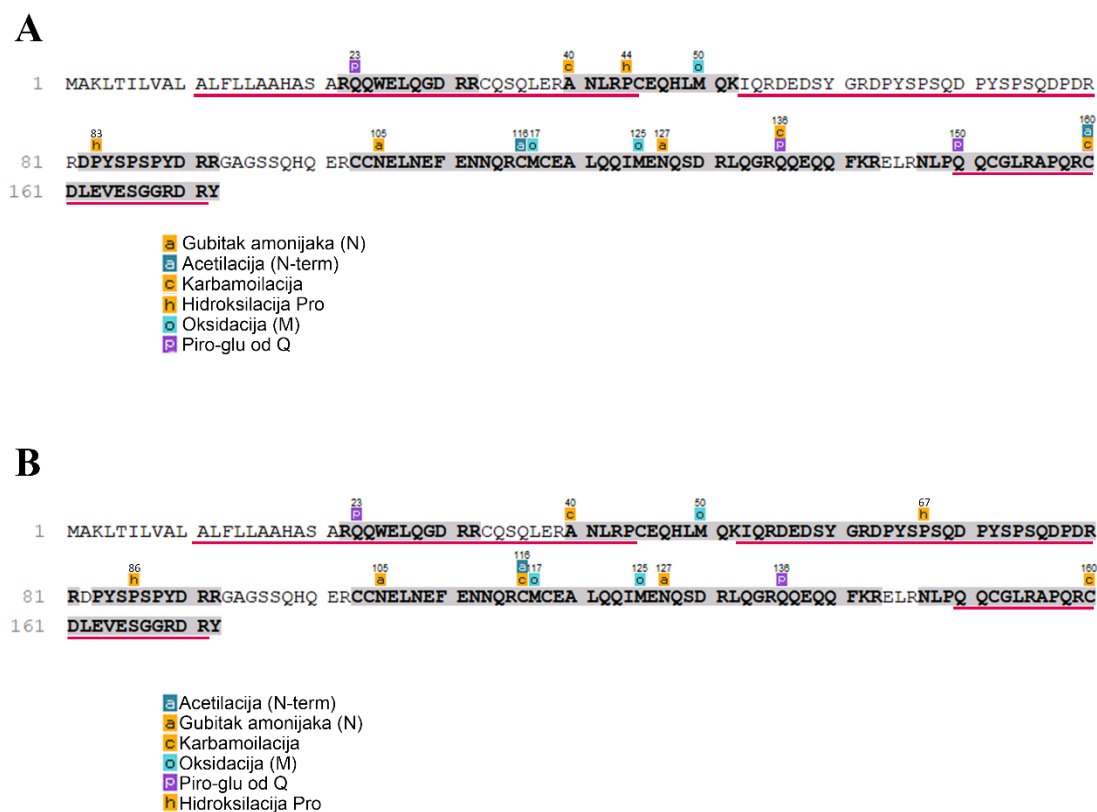
Alergen	HM i PTM	Sirovi	Pečeni
Ara h 1	Br. modifikacija	23	19
	Udeo modifikovane sekvence (%)	8	8
Ara h 2	Br. modifikacija	6	6
	Udeo modifikovane sekvence (%)	7	6
Ara h 3	Br. modifikacija	7	10
	Udeo modifikovane sekvence (%)	2	5
Ara h 6	Br. modifikacija	15	12
	Udeo modifikovane sekvence (%)	15	11

Modifikacije su duž sekvenci sva četiri alergena relativno pravilno raspoređene (Slike 22 - 25). Iako procentualno nije najviše modifikovan, Ara h 1 (Slika 22, Tabela 6) sadrži najveći broj različitih modifikacija, ali ih je više u sirovom (23) nego u ekstraktu pečenog kikirikija (19). Na Ara h 2 je u oba ekstrakta masenom spektrometrijom detektovan isti set modifikacija (Slike 23 i Tabela 6). Jedino je kod Ara h 3 manji broj modifikacija detektovan u sirovom u odnosu na pečeni kikiriki (Slike 24 i Tabela 6). Slično Ara h 1, Ara h 6 na sebi ima raznovrsniji profil modifikacija u slučaju sirovog kikirikija (Slika 25, Tabela 6).



Slika 22. Pokrivenost sekvence i modifikacije Ara h 1 iz sirovog (A) i pečenog (B) kikirikija. Delovi sekvence koji su detektovani nLC-MS/MS su osenčeni sivom bojom, dok su PTM i HM identifikovane sa minimalnom pouzdanošću od 50 (Ascore) upotrebom PEAKS X softverskog paketa (BSI, Kanada) prikazane kvadratima u boji iznad aminokiselinske sekvence. Karbamidometilacija Cys nije prikazana jer je ova

modifikacija uvedena hemijskim putem tokom pripreme uzorka za nLC-MS/MS analizu. Crvenom linijom ispod ak sekvence su prikazani linearni epitopi preuzeti iz baze podataka imunoepitopa (Vita, Mahajan et al. 2019)



Slika 23. Pokrivenost sekvence i modifikacije Ara h 2 iz sirovog (A) i pečenog (B) kikirikija. Delovi sekvence koji su detektovani nLC-MS/MS su osenčeni sivom bojom, dok su PTM i HM identifikovane sa minimalnom pouzdanošću od 50 (Ascore) upotrebom PEAKS X softverskog paketa (BSI, Kanada) prikazane kvadratima u boji iznad aminokiselinske sekvence. Karbamidometilacija Cys nije prikazana jer je ova modifikacija uvedena hemijskim putem tokom pripreme uzorka za nLC-MS/MS analizu. Crvenom linijom ispod ak sekvence su prikazani linearni epitopi preuzeti iz baze podataka imunoepitopa (Vita, Mahajan et al. 2019)

A

1 MAKLLALSVC FCFLVLGASS ISFRQQPEEN ACQFQRLNAQ RPDNRLESEG GYIETWNPNN QEFECAGVAL SRLVLRNAL
81 RRPFFYSNAPQ EIFIQQGRGY FGLIFPGCPS TYEPAQQGR RHQSQRAPRR FEGEDQSQQQ QQDSHQKVRV RDEGDLIAVP
161 TGVALWMYND HDTDVAVVSL TDTNNNDNQL DQFPRRFNLA GNHEQEFLRY QQQSRRRSLP YSPYSPQSQP RQEEREFSR
241 GQHSRRERAG QEQENEGGNI FSGFTPEFLA QAFQVDDRQI LQNLRGES DEQGAIVTVR GGLRILSPDR KRRQQYERPD
321 EEEYDEDEY EYDEEERQQD RRRGRGSRGR GNGIEETICT ASVKKNIGRN RSPDIYNPQA GSLKTANDLN LLILRWLGLS
401 AEYGNLYRNA LFPVHYNTNA HSIYALRGR AHVQVDSNG NRVYDEELQE GHVLVVPQNF AVAGKSQSDN FEYVAFKTD
481 RPSIANLAGE NSIIDNLPEE VVANSYGLPR EQARQLKNNN PFKFFVPPSQ QSLGAVA

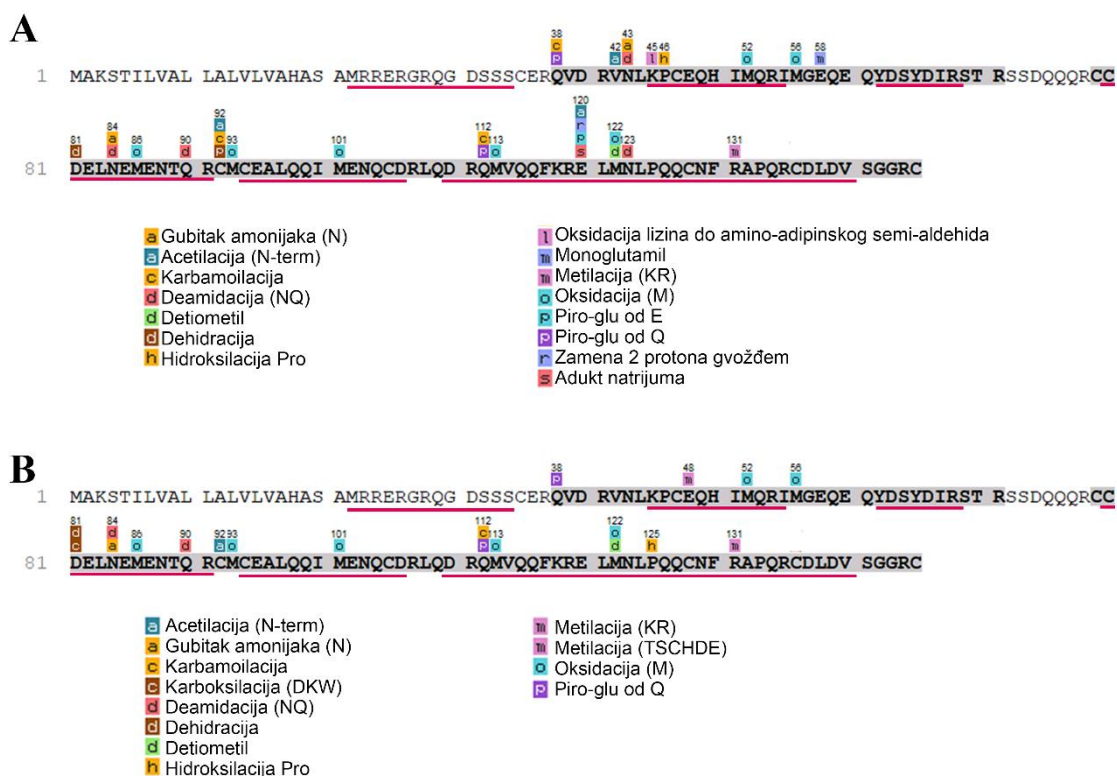
- Amidinacija lizina i N-term amina
- Deamidacija (NQ)
- Hidroksilacija Pro
- Metilacija (KR)
- Oksidacija (M)
- Piro-glu od Q
- Zamena 2 protona gvoždem

B

1 MAKLLALSVC FCFLVLGASS ISFRQQPEEN ACQFQRLNAQ RPDNRLESEG GYIETWNPNN QEFECAGVAL SRLVLRNAL
81 RRPFFYSNAPQ EIFIQQGRGY FGLIFPGCPS TYEPAQQGR RHQSQRAPRR FEGEDQSQQQ QQDSHQKVRV RDEGDLIAVP
161 TGVALWMYND HDTDVAVVSL TDTNNNDNQL DQFPRRFNLA GNHEQEFLRY QQQSRRRSLP YSPYSPQSQP RQEEREFSR
241 GQHSRRERAG QEQENEGGNI FSGFTPEFLA QAFQVDDRQI LQNLRGES DEQGAIVTVR GGLRILSPDR KRRQQYERPD
321 EEEYDEDEY EYDEEERQQD RRRGRGSRGR GNGIEETICT ASVKKNIGRN RSPDIYNPQA GSLKTANDLN LLILRWLGLS
401 AEYGNLYRNA LFPVHYNTNA HSIYALRGR AHVQVDSNG NRVYDEELQE GHVLVVPQNF AVAGKSQSDN FEYVAFKTD
481 RPSIANLAGE NSIIDNLPEE VVANSYGLPR EQARQLKNNN PFKFFVPPSQ QSLGAVA

- Acetilacija (N-term)
- Amidinacija lizina i N-term amina
- Karboksimetilacija (KW,N-term)
- Deamidacija (NQ)
- Dihidroksilacija
- Hidroksilacija Pro
- Oksidacija (M)
- Piro-glu od Q
- Zamena 2 protona gvoždem
- Acetilacija (N-term), Metilacija (KR)
- Karbamoilacija, Metilacija (KR)

Slika 24. Pokrivenost sekvence i modifikacije Ara h 3 iz sirovog (A) i pečenog (B) kikirikija. Delovi sekvence koji su detektovani nLC-MS/MS su osenčeni sivom bojom, dok su PTM i HM identifikovane sa minimalnom pouzdanošću od 50 (Ascore) upotrebom PEAKS X softverskog paketa (BSI, Kanada) prikazane kvadratima u boji iznad aminokiselinske sekvence. Karbamidometilacija Cys nije prikazana jer je ova modifikacija uvedena hemijskim putem tokom pripreme uzorka za nLC-MS/MS analizu. Crvenom linijom ispod ak sekvence su prikazani linearni epitopi preuzeti iz baze podataka imunoepitopa (Vita, Mahajan et al. 2019)



Slika 25. Pokrivenost sekvence i modifikacije Ara h 6 iz sirovog (A) i pečenog (B) kikirikija. Delovi sekvence koji su detektovani nLC-MS/MS su osenčeni sivom bojom, dok su PTM i HM identifikovane sa minimalnom pouzdanošću od 50 (Ascore) upotrebom PEAKS X softverskog paketa (BSI, Kanada) prikazane kvadratima u boji iznad aminokiselinske sekvence. Karbamidometilacija Cys nije prikazana jer je ova modifikacija uvedena hemijskim putem tokom pripreme uzorka za nLC-MS/MS analizu. Crvenom linijom ispod ak sekvence su prikazani linearni epitopi preuzeti iz baze podataka imunoepitopa (Vita, Mahajan et al. 2019)

Od pronađenih 27 modifikacija njih 12 se mogu naći na izučavanim alergenima isključivo u sirovom ili pečenom kikirikiju (Tabela 7). Većina ovih modifikacija je prisutna samo na Ara h 1 alergenu. Interesantno je da se u ekstraktu sirovog kikirikija nalazi veći broj oksidativnih modifikacija nego što je to slučaj kod pečenog, a mogle bi biti posledica prolongiranog skladištenja kikirikija (Rutherford and Moughan 2012). Aldehidi (acetaldehid, levuglandini) mogu nastati kao rezultat oksidativne peroksidacije lipida i njihovo vezivanje za proteine je jedan od markera oksidativnog stresa (Li, Nanji et al. 1997, Zhang, Li et al. 2011). Sa druge strane acetaldehid može imati i zaštitnu ulogu,

naime kada se veže za Amadori proizvod nastao tokom Majarove reakcije formira se stabilan kompleks, što onemogućuje prevođenje u AGE (Al-Abed, Mitsuhashi et al. 1999).

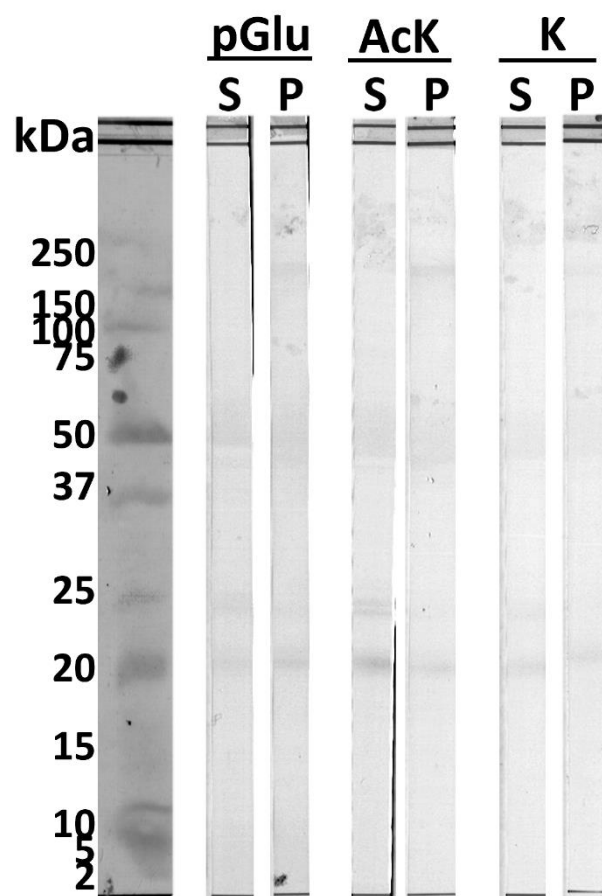
Tabela 7. Detektovane modifikacije specifične za jedan od dva ekstrakta. np – nije primenljivo (modifikacija se nalazi na više alergena)

Ekstrakt	Vrsta modifikacije	Modifikacija	Specifična za alergen
Sirovi	Oksidativne	Acetaldehid	Ara h 1
		Levuglandinil-lizin anhidrolaktamski adukt	Ara h 1
		Oksidacija (HW)	Ara h 1
		Piro-glutamat od Glu	np
		Pirolidon od Prolina	Ara h 1
	Sulfon	Ara h 1	
	Fiziološke / spontane	Monoglutamil	Ara h 6
Pečeni	Oksidativne	O-Dietilfosforilacija	Ara h 1
		Dihidroksilacija (R, W)	np
	Fiziološke / spontane	Karboksimehilacija (C)	Ara h 3
		Acetilacija (K)	Ara h 1
		N-acetil neuraminska kiselina	Ara h 1

Oksidacija metionina je spontana reakcija i odvija se preko metionin-sulfoksida (OxM) do metionin-sulfona (OxoM) i dešava se usled obrade hrane ili tokom dugog skladištenja. Metionin-sulfoksid se u ćeliji može konvertovati nazad u Met dejstvom metionin-sulfoksid reduktaze (Slika 7). Međutim to nije moguće u slučaju sulfona, a Met u ovom obliku ne može biti apsorbovan u GITu i zaostaje u zadnjem ileumu (Rutherford and Moughan 2012). Moguće je da peptidi koji sadrže ovaj oblik Met ne bivaju apsorbovani, te tako ne mogu izazvati alergijsku reakciju. Masenom spektrometrijom je detektovan sulfon samo kod Ara h 1 iz sirovog ekstrakta (Tabela 7).

Ciklizacijom N-terminalnog glutamata nastaje piroglutamat i kada se nađe unutar proteinske sekvence hidrolitički enzimi teže prilaze mestima sečenja, te se prisustvo ove modifikacije povezuje sa produženim poluživotom proteina (Zheng, Niu et al. 2011). Ova modifikacija je kod Ara h 1 i Ara h 6 detektovana metodama proteomike samo u sirovom ekstraktu (Tabela 7). Imunoblotom je ova modifikacija detektovana kod sirovog kikirikija na mestima koja bi mogla odgovarati Ara h 1 (malo iznad 50 kDa) i baznoj subjednici Ara h 3 (~25 kDa) (Slika 26). Kod pečenog kikirikija su trake sa prioglutamatom detektovane na mestu Ara h 2 i Ara h 1 oligomera ali slabijeg intenziteta (Slika 26). Moguće je da peptidi koji nose ovu modifikaciju detektovani isključivo imunoblotom nisu detektovani maseno-spektrometrijski zbog toga što su slabije zastupljeni, ili su zbog preskočenog mesta sečenja tripsina nastali dugački peptidi koji nisu eluirani sa kolone tokom hromatografske faze nLC-MS/MS analize.

Još jedna modifikacija masenospektrometrijski detektovana samo u sirovom kikirikiju je nastanak pirolidona od prolina (Tabela 7). U prisustvu reaktivnih kiseoničnih vrsta dolazi do oksidacije Pro do pirolidona, usled čega dolazi do raskidanja peptidne veze na C-terminusu Pro (Slika 8) (Berlett and Stadtman 1997). Oksidacijom prolina na ovaj način bi nastali peptidi Ara h 1 sa pirolidonom na C-terminusu, neenzimskim putem. Delimičnim procesovanjem (fragmentisanjem) Ara h 1 na ovaj način bi moglo doći do remećenja epitopskih sekvenci i nastali fragmenti bi bili podložniji dejstvu proteolitičkih enzima nego intaktan protein, što bi moglo doprineti nižoj IgE reaktivnosti proteina sirovog u odnosu na pečeni kikiriki .



Slika 26. Imunoblot na modifikacije u ekstraktima kikirikija – sirovom (S) i pečenom (P) sa antitelima specifičnim na piroglutamat (pGlu) i acetilizin (AcK). Kontrola (K) je razvijana bez upotrebe antitela na modifikacije. Kao sekundarno antitelo je korišćen kozji anti-zečji IgG konjugovan sa alkalnom fosfatazom

Četri modifikacije detektovane metodama proteomike su specifične za alergene iz pečenog kikirikija (Tabela 7). Među njima je karboksimetilacija koja se najčešće dešava na lizinu, ali se može naći i na cisteinu, a posledica je Majarove reakcije tj. ovo je AGE proizvod (Rutherford and Moughan 2012). Dihidroksilacija je još jedan marker oksidativnog stresa i AGE proizvod, koji može nastati u reakciji Arg (kao što je pokazano sa Ara h 1) sa gliksalatom. Nastanak Majarovih proizvoda se kod alergena hrane povezuje i sa slabijom proteolizom digestivnim enzimima (Kaminogawa, Kumagai et al. 1984) i sa pojačanom alergenošću pečenog kikirikija (Maleki, Chung et al. 2000). Acetilacija lizina je masenom spektrometrijom detektovana samo kod alergena pečenog kikirikija (Tabela 7). Ova PTM može dovesti do povećanja uređenosti u sekundarnim

strukturama i hidrofobnosti proteina, uz neutralisanje pozitivnog naelektrisanja (Winogradoff, Echeverria et al. 2015). Stabilizacija strukture proteina i smanjenje naelektrisanja bi moglo da dodatno stabilizuje konformacione epitope, smanji elektrostatičko odbijanje između istoimeno naelektrisanih grupa i oteža digestiju u GIT-u. Specifična antitela na acetilovani lizin (AcK) su se kod pečenog kikirikija vezala za oligomer Ara h 1, dok su u oba ekstrakta prisutne AcK trake na pozicijama Ara h 3 (bazna subjedinica) (Slika 26). Moguće je da je ova modifikacija prisutna i u sirovom ekstraktu, ali u manjoj meri te nije detektovana masenom spektrometrijom ili usled nedovoljno efikasne jonizacije zbog neutralizacije pozitivnog naelektrisanja, ili se nalazi na peptidima koji su se ireverzibilno vezali za reverzno-faznu kolonu.

Pored ak sekvenci četiri glavna alergeni i prisutnih modifikacija na Slikama 22-25 su označeni i poznati linearni epitopi (Vita, Mahajan et al. 2019) ovih alergena. U okviru prikazanih epitopskih sekvenci postoje razlike u masenospektrometrijski detektovanim modifikacijama između dva izučavana ekstrakta kikirikija. Osam pozicija u okviru epitopskih sekvenci Ara h 1 iz sirovog kikirikija nosi modifikacije (Q199, P215, N313, M445, K452, E473, K452 i P590) koje nisu prisutne na analognim pozicijama u ekstraktu pečenog kikirikija (Slika 22, Tabela 8). Među njima najinteresantnije su transformacija prolina (P215) u pirolidon i glutamata (E473) u piroglutamat, jer se javljaju samo kod sirovog kikirikija. Prisustvo pirolidona može dovesti do neezimskog procesovanja, tako da nastaju peptidi sa pirolidonom na C-terminusu (Berlett and Stadtman 1997), čime se remeti sekvenca linearnog epitopa i može rezultovati smanjenom IgE reaktivnošću. Takođe su detektovani peptidi koji na poziciji M445 imaju metionin oksidovan do sulfona, kao i peptidi koji su detiometilovani. Sa druge strane detektovano je četiri pozicije na epitopima Ara h 1 iz pečenog kikirikija (W152, H206, A444, Q474), a da iste nisu modifikovane u slučaju sirovog (Slika 22, Tabela 8). Karbamoilacija N-terminalnih amina i deamidacija (Asn, Gln) se javljaju na jedinstvenim pozicijama Ara h 1 u oba ekstrakta. Moguće je da ne samo prisustvo ili odsustvo modifikacija već i njihov raspored duž ak sekvence utiče na funkcionalne osobine proteina, koje mogu sa svoje strane uticati na alergičnost proteina.

Tabela 8. Razlike u modifikacijama linearnih epitopa Ara h 1 između sirovog i pečenog kikirikija detektovane masenospektrometrijski (Nt – N-terminus)

Sirovi		Pečeni	
Pozicija	Modifikacija	Pozicija	Modifikacija
Q199	karbamoilacija Nt	W152	oksidacija
P215	pirolidon od prolina	H206	oksidacija
N313	deamidacija	A444	karbamoilacija Nt
M445	sulfon, detiometil	Q474	deamidacija
K452	oksidacija do amino-adipinskog semi-aldehida		
E473	piroglutamat od Glu		
K452	acetaldehid		
P590	hidroksilacija		

Epitopi Ara h 2 iz sirovog kikirikija su modifikovani na pozicijama P44, Q150 i C160, a da to nije slučaj sa pečenim kikirikijem (Slika 23 i tabela 9). Ara h 2 iz pečenog kikirikija ima hidroksilovani prolin na poziciji P67, za koju je pokazano da značajno doprinosi IgE reaktivnosti ovog alergena (Bernard, Guillon et al. 2015). Kada ova modifikacija nije prisutna na linearnom epitopu DPYSP, IgE se slabije vezuje (Bernard, Guillon et al. 2015). Na poziciji C160 u oba ekstrakta je cistein Ara h 2 nosi karbamoilovan N-terminus, ali su u ekstraktu sirovog kikirikija detektovani i peptidi kojima je ovo acetilovana N-terminalna aminokiselina (Tabela 9).

Tabela 9. Razlike u modifikacijama linearnih epitopa Ara h 2 između sirovog i pečenog kikirikija detektovane masenospektrometrijski (Nt – N-terminus)

Sirovi		Pečeni	
Pozicija	Modifikacija	Pozicija	Modifikacija
P44	hidroksilacija	P67	hidroksilacija Pro
Q150	piroglutamat od Gln		
C160	acetilacija Nt		

Kod Ara h 3 je nešto drugačija situacija u odnosu na Ara h 1 i Ara h 2. Ovde epitopi alergena iz ekstrakta pečenog kikirikija nose modifikacije na više pozicija, nego što je slučaj sa sirovim kikirikijem (Slika 24, Tabela 10). Među modifikovanim pozicijama Ara h 3 iz pečenog kikirikija najinteresantniji je arginin 82 (R82) jer su detektovani peptidi koji na ovoj poziciji trpe dvostruku modifikaciju. Arginin 82 je u detektovanim peptidima ujedno i N-terminalna aminokiselina, stoga nosi jednu modifikaciju na α -amino grupi (u jednom slučaju acetilaciju, u drugom karbamoilaciju) i jednu modifikaciju na jednom od azota guanidino bočnog ostatka (metilacija). Obzirom da je korišćen tripsin tokom pripreme uzorka, verovatno dolazi do modifikacije N-terminusa nakon dejstva hidrolitičkog enzima, a moguće je da se metilacija dešava na neprocesovanom proteinu. Prolin na poziciji 266 (P266) je u ekstraktu pečenog kikirikija Ara h 3 hidroksilovan, za razliku od sirovog kikirikija (Slika 24, Tabela 10). Moguće je hidroksilacija prolina linearnih epitopa kod Ara h 3 doprinosi IgE reaktivnosti, kao što je to slučaj kod Ara h 2 (Bernard, Guillon et al. 2015).

Tabela 10. Razlike u modifikacijama linearnih epitopa Ara h 3 između sirovog i pečenog kikirikija detektovane masenospektrometrijski (Nt – N-terminus, b.o. – bočni ostatak)

Sirovi		Pečeni	
Pozicija	Modifikacija	Pozicija	Modifikacija
N504	deamidacija	N57	deamidacija
		H58	hidroksilacija
		Q61	deamidacija
		R82	acetilacija Nt i metilacija b.o. Arg
		R82	karbamoilacija N-term i metilacija b.o. Arg
		100Y	karboksilacija N-term
		P266	hidroksilacija
		W396	dihidroksilacija

Linearni epitopi Ara h 6 imaju šest modifikovanih pozicija koje su modifikovane u slučaju sirovog kikirikija, a da ne nose isti set modifikacija na datim pozicijama kada je u pitanju pečeni kikiriki (Tabela 11). Prolin P46 je hidroksilovan u Ara h 6 pečenog kikirikija, dok je kod pečenog o slučaj sa P125. Kao što je već pomenuto, raspored hidroksilacije prolina može imati ulogu u IgE reaktivnosti alergena. Glutaminska (E120) je N-terminalna i detektovani su peptidi sa četiri različite modifikacije na ovoj poziciji u sirovom kikirikiju.

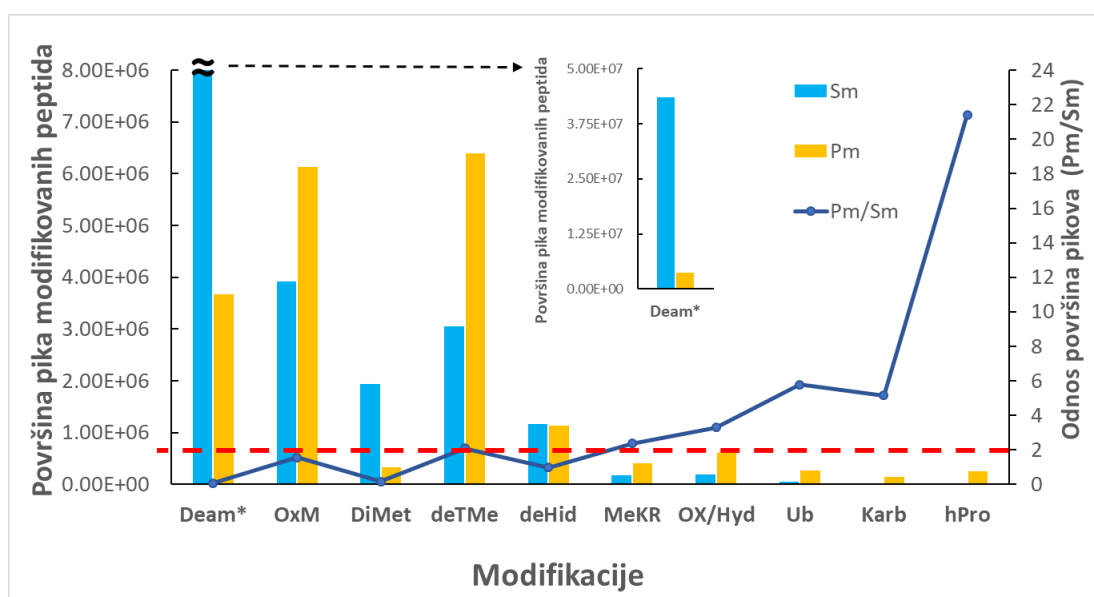
Tabela 11. Razlike u modifikacijama linearnih epitopa Ara h 6 između sirovog i pečenog kikirikija detektovane masenospektrometrijski (Nt – N-terminus)

Sirovi		Pečeni	
Pozicija	Modifikacija	Pozicija	Modifikacija
K45	oksidacija Lys do amino-adipinskog semi-aldehida	E48	metilacija Glu
P46	hidroksilacija	D81	karboksilacija
E120	acetilacija Nt	P125	hidroksilacija
E120	zamena 2 protona gvožđem		
E120	piroglutamat od Glu		
E120	adukt natrijuma		
N123	deamidacija		

5.2.2. Usporedna analiza modifikacija između sirovog i pečenog kikirikija *in silico* relativnom kvantifikacijom i imunoblotom sa antitelima specifičnim na modifikacije

U ovoj disertaciji je izvršena relativna kvantifikacija modifikacija identifikovanih masenom spektrometrijom u dva ekstrakta. Poređene su površine pikova jonskih hromatograma modifikovanih peptida u slučaju modifikacija koje se javljaju na istoj poziciji u aminokiselinskoj sekvenci proteina sirovog i pečenog kikirikija. Pored toga, prisustvo određenih modifikacija je potvrđeno imunoblotom sa za njih specifičnim antitelima.

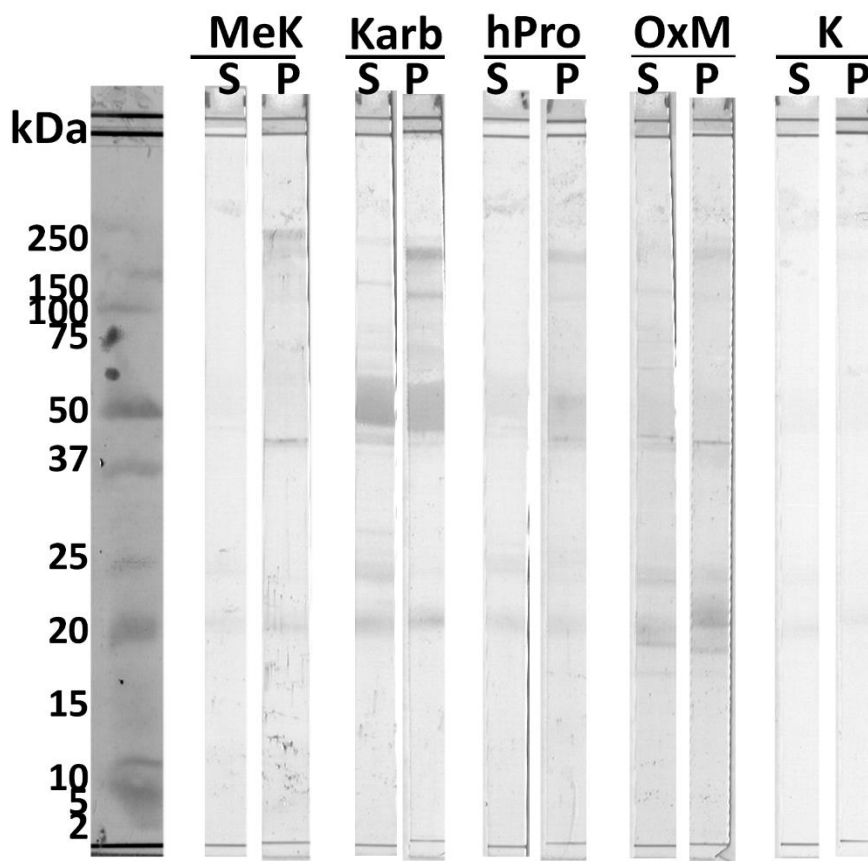
Ara h 1 je najveći među proučavanim alergenima i na njemu je detektovan najveći broj različitih modifikacija (Tabele 6 i 7, Slika 22). Zastupljenost 10 modifikacija (deamidacija Asn i Glu; oksidacija Met; dimetilacija Arg i Lys; detiometilacija Met; dehidratacija Asp, Tyr, Thr, Ser i Asn ili Gln na C-term; metilacija Lys i Arg; oksidacija ili hidrokislacija; ubikvitinacija Thr, Ser, Cys, Lys; karbamoilacija Lys i N-term; hidroksilacija Pro) je na osnovu intenziteta hromatografskih pikova modifikovanih peptida poređena između sirovog (Sm) i pečenog kikirikija (Pm) (Slika 26). Odnos površina pikova modifikovanih peptida u dva ekstrakta (Pm/Sm) dodatno oslikava razliku u količini modifikacija. U oba ekstrakta su deamidacija Asn i Glu (Deam), oksidacija metionina (OxM) i detiometilacija (deTMe) najzastupljenije modifikacije.



Slika 26. Ara h 1 – usporedna analiza profila PTM i HM između ekstrakata sirovog (Sm) i pečenog (Pm) kikirikija relativnom kvantifikacijom modifikovanih peptida na

osnovu površina pikova jonskih hromatograma. *Prekid u visini stuba (\approx) deamidacije (Deam) u P ekstraktu je uveden radi preglednosti stubića niže vrednosti koji predstavljaju ostale modifikacije i na umetku je prikazana deamidacija sa adekvatnim opsegom na y-osi. Plave tačke povezane plavom linijom predstavljaju odnos površina pikova jonskih hromatograma modifikovanih peptida detekovanih u ekstraktu pečenog i sirovog kikirikija (Pm/Sm). Crvenom isprekidanom linijom je predstavljena granica u odnosu Pm/Sm od 2. OxM – oksidacija Met, DiMet – dimetilacija, deTMe – detiometilacija, deHid – dehidratacija, MeKR – metilacija Lys i Arg, OX/Hyd – oksidacija ili hidroksilacija, Ub- ubikvitinacija, Karb – karbamoilacija Lys i N-term., hPro – hidroksilacija Pro

Deamidacija i dimetilacija su znatno zastupljenije u sirovom nego u ekstraktu pečenog kikirikija (Pm/Sm 0,08 i 0,17, redom) (Slika 26). Deamidacija je PTM kod koje dolazi do neenzimske konverzije Asn u Asp i Gln u Glu i uvodi negativno naelektrisane ostatke na mesto neutralnih što bi moglo uticati na izmene u vodoničnim vezama i destabilizaciju proteinske strukture (Soulby, Heal et al. 2015). Promene u proteinskoj strukturi bi mogle uticati na izmene u konformacionim epitopima, što bi kao moguću posledicu imalo umanjenje alergnosti Ara h 1. Modifikacije koje su prisutne u većoj količini kod pečenog nego kod sirovog (Pm/Sm >2) su metilacija Lys i Arg (MeKR), karbamoilacija Lys i N-term. (Karb), vezivanje fragmenta ubikvitina (Ub) i hidroksilacija Pro (hPro) (Slika 26). Metilacija Lys i Arg, je za razliku od dimetilacije dva puta zastupljenija u ekstraktu pečenog kikirikija. Specifična antitela na MeKR su se vezala samo za poziciju koja bi odgovarala Ara h 1 oligomeru (~200 kDa) pečenog ekstrakta (Slika 27).

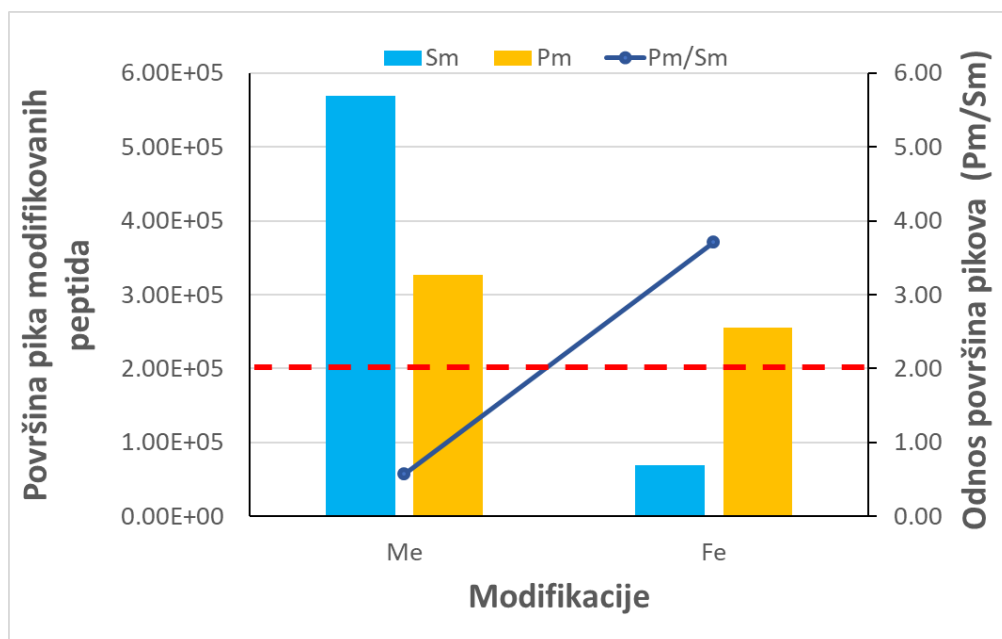


Slika 27. Imunoblot na modifikacije u ekstraktima kikirikija – sirovom (S) i pečenom (P) sa antitelima specifičnim na metilaciju Lys i Arg (MeKR), karbamoilaciju (Karb), hidroksilaciju Pro (hPro) i Met-sulfoksid (OxM). Kontrola (K) je razvijena bez upotrebe antitela na modifikacije. Kao sekundarno antitelo je korišćen koziji IgG konjugovan sa alkalnom fosfatazom

Karbamoilacija se *in vitro* može odigrati na amino, karboksilnim, tiolnim ili fenolnim grupama, međutim u fiziološkim uslovima se odigrava samo na ak ostacima koji sadrže amino grupu. U prisustvu uree, u fiziološkim uslovima neenzimskom reakcijom dolazi do vezivanja karbamoil grupe ($-\text{CONH}_2$) za ϵ -amino grupu Lys ili N-terminus proteina. Karbamoilacija ima denaturišući efekat na proteine (α -kristalin, hemoglobin) (Jaisson, Pietrement et al. 2018), u nekim slučajevima do te mere da izlaže delove proteina koji nose neoantigenske sekvence (Shi, Knevel et al. 2011). Obzirom na denaturišući efekat koji ima karbamoilacija, verovatno dolazi do izlaganja linearnih epitopa Ara h 1 poreklom iz pečenog kikirikija, što može doprineti većoj IgE reaktivnosti alergena iz pečenog zrna. Imunoblotom detektovana karbamoilacija je prisutna u oba ekstrakta, ali su Ara h 1 trake

(~70 kDa – monomer i ~200 kDa - oligomer) jače kod P ekstrakta (Slika 27). Hidroksilacija prolina Ara h 1 je prisutna u izrazito većoj meri u ekstraktu pečenog zrna (Pm/Sm 21,42) (Slika 26). Imunoblot takođe pokazuje hPro Ara h 1 u oba ekstrakta, sa tom razlikom što kod se PTM kod P nalazi i na monomeru i na oligomeru, što bi moglo da bude razlog većoj zastupljenosti (Slika 27). Ova PTM je veoma važna za alergenost kikirikija, jer je pokazano da bez njenog prisustva epitopi Ara h 2 vezuju IgE u znatno slabijoj meri (Bernard, Guillon et al. 2015), te je moguće da na isti način doprinosi alergenosti Ara h 1. U slučaju Ara h 2 hidoksilacija Pro je detektovana masenospektrometrijski na 2 pozicije i kod sirovog (P44 i P83) i kod pečenog (P67 i P86) kikirikija (Slika 23). Zbog toga što u oba ekstrakta nije detektovana na istoj poziciji u ak sekvenci LFQ nije bila moguća. Interesantno je da se pozicije Ara h 2 iz pečenog kikirikija na kojima je Pro hidroksilovan (Slika 23) poklapaju sa onim u okviru sekvence linearnog epitopa na kom su Bernard i kolege (Bernard, Guillon et al. 2015) pokazale značaj ove modifikacije za IgE reaktivnost. Obzirom da se hPro nalazi na po dve pozicije u oba ekstrakta, moguće je da pored količinske zastupljenosti modifikacija i njihova pozicija u ak sekvenci utiče na alergenost, te „pravilno“ pozicionirana hPro iz pečenog kikirikija omogućuje bolje prepoznavanje epitopa.

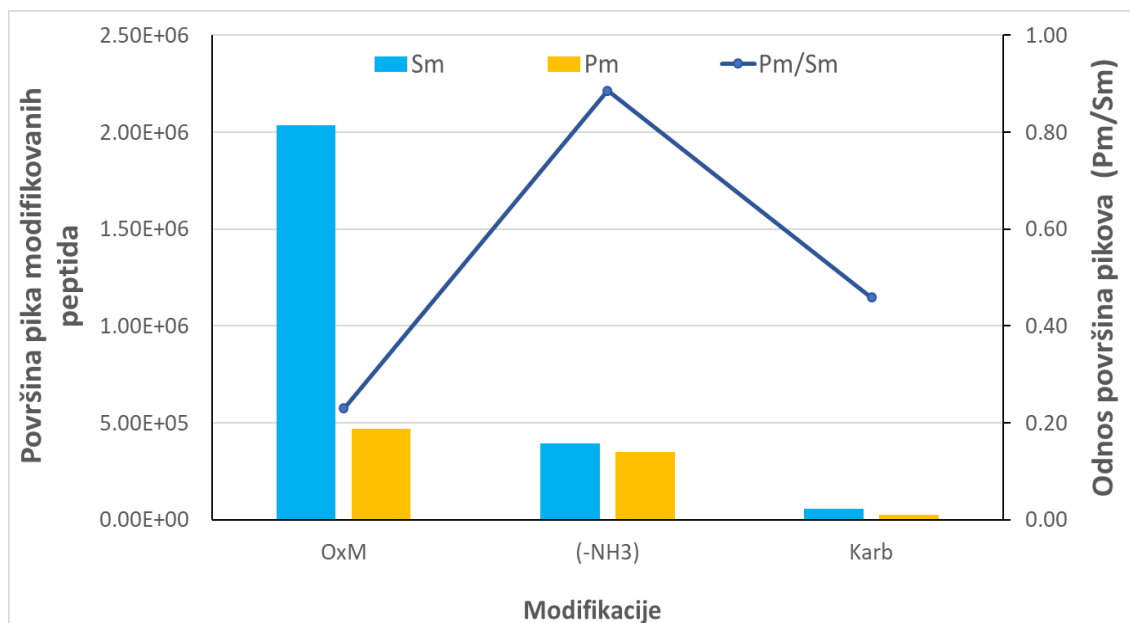
Ara h 3, drugi kupin među proučavanim alergenima je znatno manje modifikovan od Ara h 1. Samo dve modifikacije se mogu uporediti relativnom kvantifikacijom - metilacija histidina (His, H) ili glutamata (Glu, E) (Me) i zamena 2 protona gvoždem na Asp i Glu (Fe) (Slika 28). Od navedenih poslednja modifikacija je zastupljenija kod pečenog, dok su preostale dve skoro podjednako zastupljene u oba ekstrakta. Bočni ostaci aspartata i glutamata imaju sposobnost da heliraju gvožđe. Kod Ara h 3 je zamena 2 protona gvoždem (Fe) detektovana u S i P ekstraktima, sa većom zastupljenošću u pečenom zrnu (Slika 28). Vezivanje gvožđa može povoljno uticati na stabilizaciju strukture proteina i termostabilnost (Sun, Cui et al. 2017) i time stabilizuje strukturu alergena i čini ih otpornijim u nepovoljnim uslovima tako da IgE epitopi i reaktivnost ostaju očuvani.



Slika 28. Ara h 3 – uporedna analiza profila PTM i HM između ekstrakata sirovog (Sm) i pečenog (Pm) kikirikija relativnom kvantifikacijom modifikovanih peptida na osnovu površina pikova jonskih hromatograma. Plave tačke povezane plavom linijom predstavljaju odnos površina pikova jonskih hromatograma modifikovanih peptida detekovanih u ekstraktu pečenog i sirovog kikirikija (Pm/Sm). Crvenom isprekidanom linijom je predstavljena granica u odnosu Pm/Sm od 2. Me – metilacija (HE), Fe – zamena 2 protona gvožđem

Kod Ara h 2 većina modifikacija detektovanih masenom spektrometrijom je zastupljenija u ekstraktu sirovog nego pečenog kikirikija (Slika 29). Oksidacija metionina do Met-sulfoksida je 4,36 puta zastupljenija u sirovom zrnu (Pm/Sm 0,23) (Slika 29). Metionin-sulfoksid se kod Ara h 6 nalazi u sličnim količinama u oba ekstrakta (Slika 30). Ova forma oksidovanog Met je intermedijerna i može preći i u neoksidovanu formu i u sulfon (Berlett and Stadtman 1997). Imunoblotom sa antitelima specifičnim na Met-sulfoksid (OxM) je detektovano više traka u oba ekstrakta (Slika 27). Interesantne su trake na pozicijama malo niže od 25 kDa i 20 kDa, koje bi mogle odgovarati Ara h 3 (bazna subjedinica) i Ara h 2, redom. Ove dve trake su nešto slabije u slučaju ekstrakta P. Karbamoilacija (Karb) je masenom spektrometrijom detektovana i na Ara h 2 i to sa 2 puta većom zastupljenošću u sirovom zrnu (Pm/Sm 0,46) (Slika 29). Ova modifikacija je kod Ara h 6 dala odnos Pm/Sm od 0,91. Specifičnim antitelom je ova modifikacija

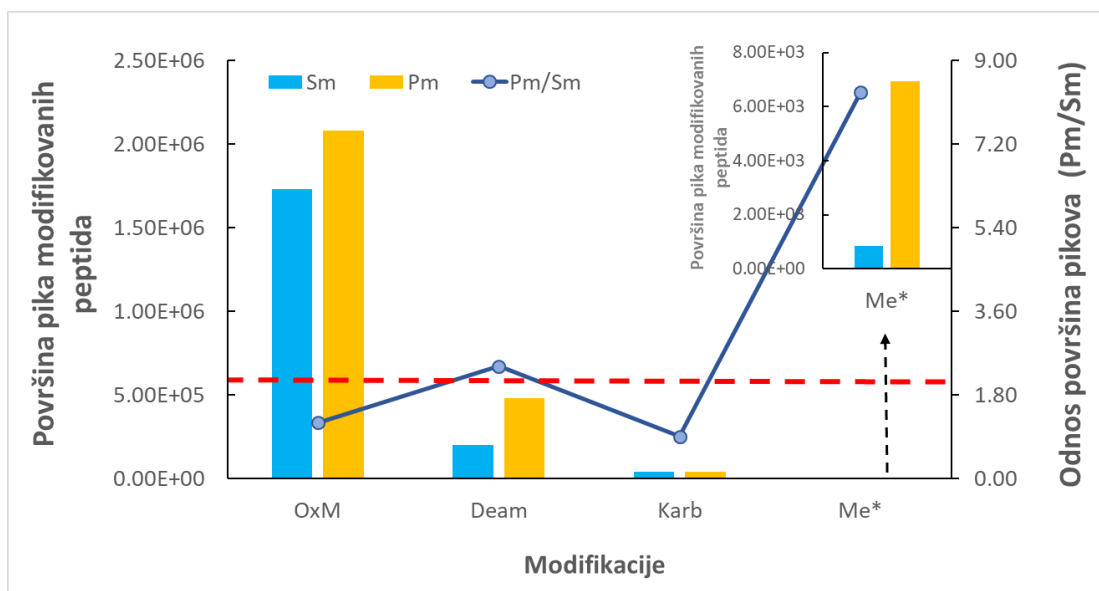
detektovana na Ara h 2 iz oba ekstrakta (~18 kDa), dok na Ara h 6 ovom metodom nije uočena (Slika 27). Interesantno je da je karbamoilacija Ara h 1 mnogo zastupljenija u pečenom ekstraktu, što se verovatno može objasniti njenim prisustvom na Ara h 1 oligomeru (Maleki, Chung et al. 2000) koji nije elektroforetski detektovan u ekstraktu sirovog zrna (Slike 21A i 27).



Slika 29. Ara h 2 – uporedna analiza profila PTM i HM između ekstrakata sirovog (Sm) i pečenog (Pm) kikirikija relativnom kvantifikacijom modifikovanih peptida na osnovu površina pikova jonskih hromatograma. Plave tačke povezane plavom linijom predstavljaju odnos površina pikova jonskih hromatograma modifikovanih peptida detekovanih u ekstraktu pečenog i sirovog kikirikija (Pm/Sm). OxM – oksidacija Met, (-NH3) – gubitak amonijaka, Karb – karbamoilacija Lys, N-term.

Kod Ara h 6 deamidacija je 2,42 puta zastupljenija kod termički obrađenog kikirikija (Slika 30). Kod Ara h 1 (Slika 26) je situacija obrnuta i u slučaju ovog alergena je površina pikova modifikovanih proteina znatno veća nego što je slučaj sa Ara h 6. Moguće je da je broj modifikovanih Ara h 6 peptida mali, te se teže detektuju nLC-MS/MS što bi se moglo objasniti zaostatkom peptida na reverzno-faznoj koloni ili slabom jonizacijom ovih

peptida. Peptidi koji nose metilaciju His ili Glu su kod Ara h 6 takođe detektovani sa nešto nižim površinama pikova, uz visoku razliku između ekstrakata – Pm/Sm 8,32.



Slika 30. Ara h 6 – uporedna analiza profila PTM i HM između ekstrakata sirovog (Sm) i pečenog (Pm) kikirikija relativnom kvantifikacijom modifikovanih peptida na osnovu površina pikova jonskih hromatograma. Umetak prikazuje metilaciju (Me) sa prilagođenim opsegom površine modifikovanih pikova. Plave tačke povezane plavom linijom predstavljaju odnos površina pikova jonskih hromatograma modifikovanih peptida detekovanih u ekstraktu pečenog i sirovog kikirikija (Pm/Sm). Crvenom isprekidanom linijom je predstavljena granica u odnosu Pm/Sm od 2. OxM – oksidacija Met, Deam- deamidacija (N, Q), Karb – karbamoilacija, Me – metilacija (H, E)

Masena spektrometrija je sveobuhvatna metoda koja je veoma pouzdana kada je u pitanju detekcija proteina i njihovih modifikacija (Barber and Rinehart 2018). Instrumenti i algoritmi za identifikaciju i karakterizaciju su poslednjih godina veoma uznapredovali, što rezultuje veoma pouzdanim sirovim podacima koji se uz malo veštine mogu ispravno interpretirati. Masena spektrometrija je osetljiva metoda, koja može da detektuje modifikacije u kompleksnim smešama proteina, odredi tačnu poziciju modifikacije u ak sekvenci i da relativnu kvantitativnu procenu o modifikaciji na određenoj poziciji između

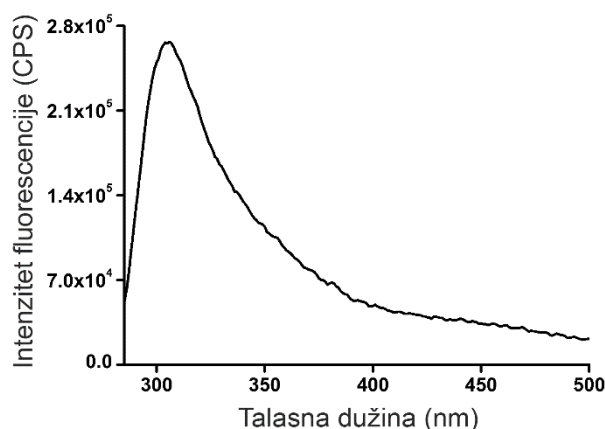
različito tretiranih uzoraka (Larsen, Trelle et al. 2006). Imunoblot sa antitelima specifičnim na modifikacije, sa druge strane, može samo obezbediti informaciju o prisustvu ili odsustvu modifikacije na proteinu (Barber and Rinehart 2018). Međutim, ovom metodom se mogu potvrditi modifikacije čije prisustvo može uticati na efikasnost jonizacije peptida koji se usled ovog ili drugog razloga slabije detektuju masenospektrometrijski (Barber and Rinehart 2018). Stoga se kombinovanjem ove dve metode dobija potpunija slika raznovsnosti modifikacija proteina, kao što je prikazano u ovoj disertaciji

5.3. 2S albumini kikirikija formiraju komplekse sa imunomodulatornim polifenolom iz zelenog čaja

2S albumini kikirikija – Ara h 2 i Ara h 6 su veoma interesantni sa aspekta alergnog potencijala zbog toga što su zastupljeni u znatno nižim količinama u kikirikiju (u odnosu na Ara h 1 i Ara h 3) i pokazali su se veoma rezistentnim na delovanje digestivnih enzima (Apostolovic, Stanic-Vucinic et al. 2016). Uklanjanjem ova dva alergena iz ekstrakta dolazi do smanjenja imunoreaktivnosti (van der Zee, Dubois et al. 2011). Stoga je u ovom delu studije ispitana mogućnost uspostavljanja interakcija između dva potentna alergena i EGCG, katehina zelenog čaja koji, pokazalo se pospešuje efikasnost digestije pepsinom (Tantoush, Apostolovic et al. 2012) i utiče na mehanizme alergijskog odgovora (Ognjenovic, Stojadinovic et al. 2014).

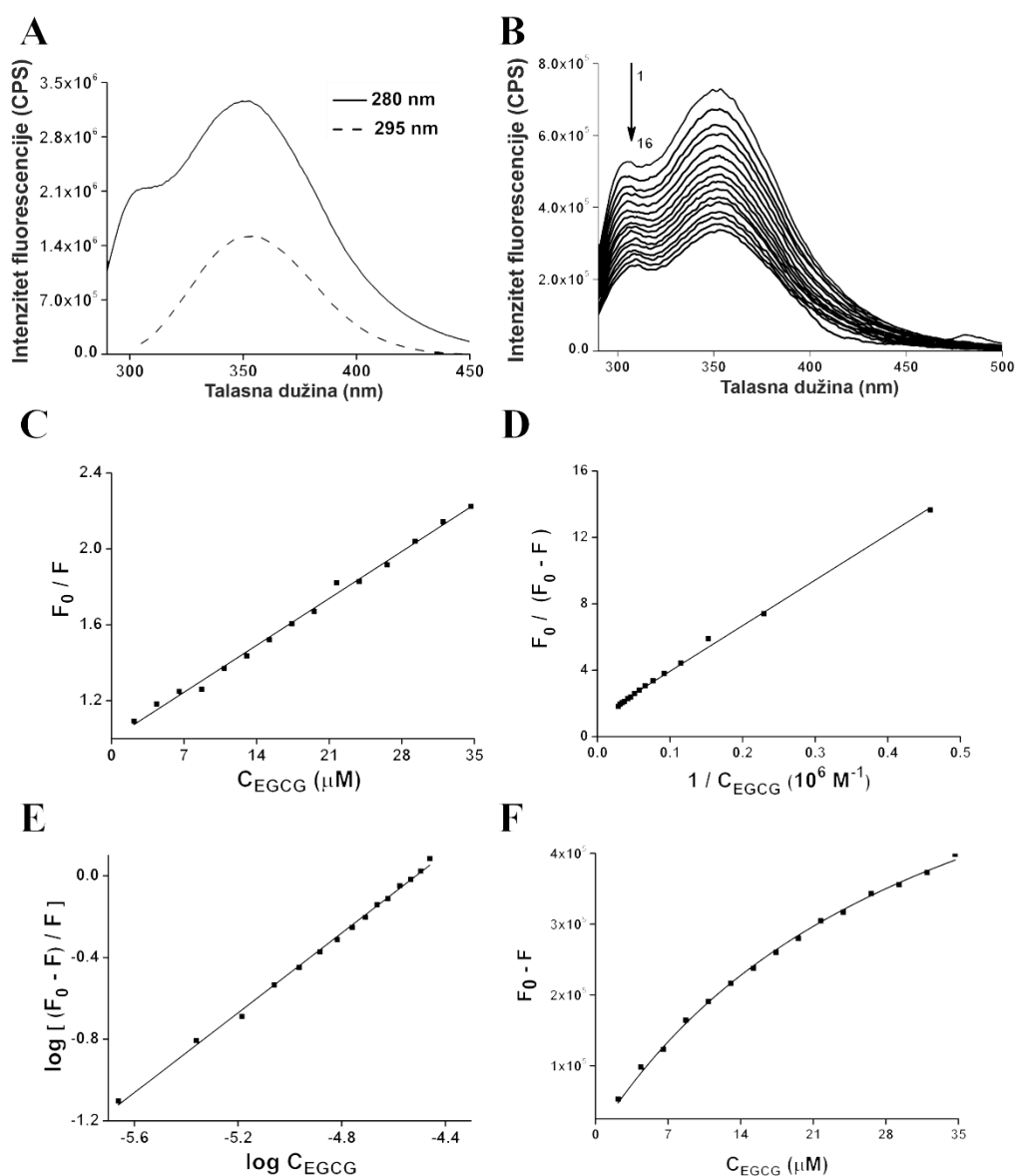
5.3.1. Fluorescentna spektroskopija potvrđuje stvaranje kompleksa EGCG i Ara h 2

Jedan od glavnih alergena kikirikija, Ara h 2 sadrži jedan triptofan (Trp4) i šest tirozina u svojoj sekvenci. Postojanje Trp fluorofore omogućava proučavanje vezivanja liganda - EGCG i Ara h 2 fluorescentnom spektroskopijom i procenu afiniteta vezivanja ova dva molekula. Sa druge strane, Ara h 6 ne sadrži Trp, već samo Tyr pa je intenzitet njegove fluorescentne emisije mnogo niži nego što je to slučaj sa Ara h 2 (Slika 31) i nije moguće raditi ispitivanje gašenja fluorofore.



Slika 31. Fluorescentni spektar Ara h 6 nakon ekscitacije na 275 nm

Emisionom spektru Ara h 2 najviše doprinosi fluorescencija koja potiče od Trp (Slika 32A). Trp je glavna fluorofora kod proteina i iako pri ekscitaciji na 280 nm i Trp i Tyr emituju energiju, obično se detektuje samo emisija Trp zbog rezonantnog prenosa energije između aromatičnih bočnih ostataka ak. Na Ara h 2 spektirma se može zapaziti doprinos obe fluorofore (Slika 32A).



Slika 32. **A.** Emisioni spektar Ara h 2 pri ekscitaciji na 280 nm (puna linija) i 295 nm (isprekidana linija). **B.** Gašenje fluorofora Ara h 2 titracijom EGCG-om (1 – 16: 0 – 34.7 μM EGCG). Strelica ukazuje na trend promene fluorescencije Ara h 2 sa porastom

koncentracije EGCG-a. **C – F.** Prikaz nastanka Ara h 2-EGCG kompleksa na osnovu analize gašenja Trp fluorescencije primenom 4 matematička modela: Stern-Volmer (C); Lerer (D); logaritamski (E); Langmuir (F).

Činjenica da se emisioni maksimum Trp nalazi na talasnoj dužini od 354 nm (Slika 32A) ukazuje na izloženost fluorofore rastvaraču. Prisustvo velikog broja Tyr ostataka i efikasan rezonantni transfer energije sa Tyr na Trp je omogućio i detekciju emisionog maksimuma koji se nalazi na 308 nm (Slika 32A). Emisioni spektri čija fluorescencija potiče i od Trp i od Tyr su u literaturi već pokazani u slučaju interferona γ (INF- γ) (Boteva, Zlateva et al. 1996) i u slučaju obe izoforme Ara h 2 (Apostolovic, Luykx et al. 2013). Emisioni spektar Ara h 2 pobuđenog na 280 nm se sastoji od pika na ~350 nm koji potiče od Trp i nižeg pika na 305 nm (Slika 32A, puna linija). Pobuđivanje na 295 nm dovodi isključivo do emisije Trp (Slika 32A, isprekidana linija), što je dodatni dokaz da pri eksitaciji na 280 nm niži pik emisioni na 305 nm (Slika 32A, puna linija) potiče od Tyr.

Jedan od ciljeva ove disertacije je bio ispitivanje uticaja EGCG na fluorescenciju alergena kikirikija. Porast koncentracije EGCG-a u rastvoru dovodi do gašenja fluorescencije Ara h 2 (Slika 32B). Jačina vezivanja između Ara h 2 i EGCG je procenjena na osnovu gašenja emisije Trp na 350 nm i primenom 4 matematička modela (Slika 32 C-F).

Parametri vezivanja su kod svakog primenjenog matematičkog modela izvedeni na osnovu linearnih ili nelinearnih grafika. Korišćeno je više jednačina za određivanje konstanti koje opisuju vezivanje da bismo isključili uticaj fenomena unutrašnjeg filtera koji bi EGCG mogao da ima (Keppler, Stuhldreier et al. 2014). Na osnovu nagiba, linearnosti i odsečaka 4 jednačine regresione analize potvrđeno je da EGCG ne izaziva fenomen unutrašnjeg filtera i da korekcija za isti nije potrebna. Takođe su dobijeni parametri vezivanja upoređeni sa parametrima vezivanja EGCG za druge proteine (Tabela 12).

Tabela 12. Poređenje parametara vezivanja kompleksa Ara h 2-EGCG dobijenih na osnovu metode gašenja fluorofore i primenom četiri matematička modela sa podacima iz literature

Matematički model	Ref	Protein	Parametar vezivanja	Vrednost	Ara h 2-EGCG
Stern-Volmer	(Keppler, Stuhldreier et al. 2014)	α -laktoglobulin	$K_{SV} (M^{-1})$	$4,0 \times 10^3$	$3,5 \times 10^4$
Lerer	(Keppler, Stuhldreier et al. 2014)	β -laktoglobulin	$K_Q (M^{-1})$	$2,6 \times 10^5$	
	(Ghosh, Sahoo et al. 2008)	Lizozim	$K_Q (M^{-1})$	$7,4 \times 10^4$	$5,5 \times 10^4$
			fa	0,55	0,8
	(Maiti, Ghosh et al. 2006)	HSA	$K_Q (M^{-1})$	$6,85 \times 10^4$	
			fa	0,74	
	(Ognjenovic, Stojadinovic et al. 2014)	Ovalbumin	$K_Q (M^{-1})$	$3,90 \times 10^4$	
			fa	0,7	
Logaritamski		α -laktoglobulin	$K_a (M^{-1})$	$1,34 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$
			n	1,3	0,92
	(Bandyopadhyay, Ghosh et al. 2012)	α -kazein	$K_a (M^{-1})$	$7,40 \times 10^3$	
			n	1,5	
		β -kazein	$K_a (M^{-1})$	$1,59 \times 10^4$	
			n	1,5	
	(Keppler, Stuhldreier et al. 2014)	β -laktoglobulin	$K_a (M^{-1})$	$1,00 \times 10^4$	
			n	0,64	
(Wu, He et al. 2013)	Lipaza	$K_a (M^{-1})$	$3,98 \times 10^4$		
		n	1,05		
Langmjuer	(Keppler, Stuhldreier et al. 2014)	β -laktoglobulin	$K_a (M^{-1})$	$5,10 \times 10^5$	4×10^4
			$K_d (M)$	$1,69 \times 10^{-6}$	$2,5 \times 10^{-5}$

Grafik koji predstavlja jačinu gašenja fluorescencije i prikazuje odnos fluorescencije proteina bez i uz dodatak liganda (F_0/F) u funkciji koncentracije liganda je u ovom slučaju prava (Slika 32 C) i daje Stern-Volmer-ovu konstantu gašenja (K_{SV}) od $3.5 \times 10^4 M^{-1}$. EGCG gasi fluorescenciju triptofana Ara h 2 statičkim mehanizmom, što pruža mogućnost izračunavanja iz jednačine prave konstanti brzine gašenja i analizu afiniteta

vezivanja. Lererov model je dao vrednosti udela dostupne fluorofore (f_a) – 0.8 i konstante gašenja (K_Q) - $5.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Slika 32 D). Udeo dostupnih fluorofora je za Ara h 2 viši nego što je to slučaj kod ovalbumina (OVA) ili humanog serum albumina (HSA) kada je u pitanju vezivanje EGCG za ove proteine (Tabela 12). Triptofan se kod Ara h 2 nalazi na N-terminusu i jeste dostupan rastvaraču (Mueller, Gosavi et al. 2011), te se dobijeni rezultat dobro poklapa sa podacima iz literature.

Primenom Stern-Volmerovog modela je dobijen grafik zavisnosti gašenja fluorescencije od koncentracije liganda i on je predstavljen pravom (ne krivom), što je omogućilo izračunavanje konstante brzine gašenja fluorescencije (k_q) na osnovu jednačine

$$K_{sv} = k_q \times \tau_0 \quad (\text{Lakowicz 1999})$$

Poznato je da vreme poluživota fluorofore (τ_0) Trp bez prisustva prigušivača kod biopolimera iznosi 10 ns (Lakowicz, Gryczynski et al. 1999, Wang, Yin et al. 2013) i kada je tu vrednost uzeta u obzir i u slučaju Ara h 2 dobijena je k_q u vrednosti od $3,5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ koja je viša od vrednosti za difuzijom ograničeno gašenje fluorescencije u vodi ($\sim 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Gudgin, Lopez-Delgado et al. 1981) što takođe ukazuje na formiranje kompleksa između proteina i liganda, odnosno gašenje se odvija po statičkom mehanizmu. Ovo omogućuje primenu logaritamskog i Langmjuerovog modela za dodatnu karakterizaciju formiranja kompleksa. Broj vezivnih mesta EGCG za Ara h 2 iznosi 0,92, dok konstanta vezivanja iznosi $8 \times 10^{-5} \text{ M}$, prema logaritamskom modelu (Slika 32 E). Konstanta disocijacije izračunata primenom Langmjuerovog modela iznosi $2.6 \times 10^{-5} \text{ M}$ (Slika 32 F). Vrednost konstante disocijacije je istog reda veličine za poslednja dva modela, mada je logaritamski model je dao nešto nižu vrednost ($8 \times 10^{-5} \text{ M}$) u odnosu na Langmjuerov ($2,6 \times 10^{-5} \text{ M}$). Svi parametri formiranja kompleksa u prikazani u Tabeli 13.

Tabela 13. Parametri formiranja Ara h2/EGCG kompleksa (izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija) određeni primenom studije gašenja fluorofore

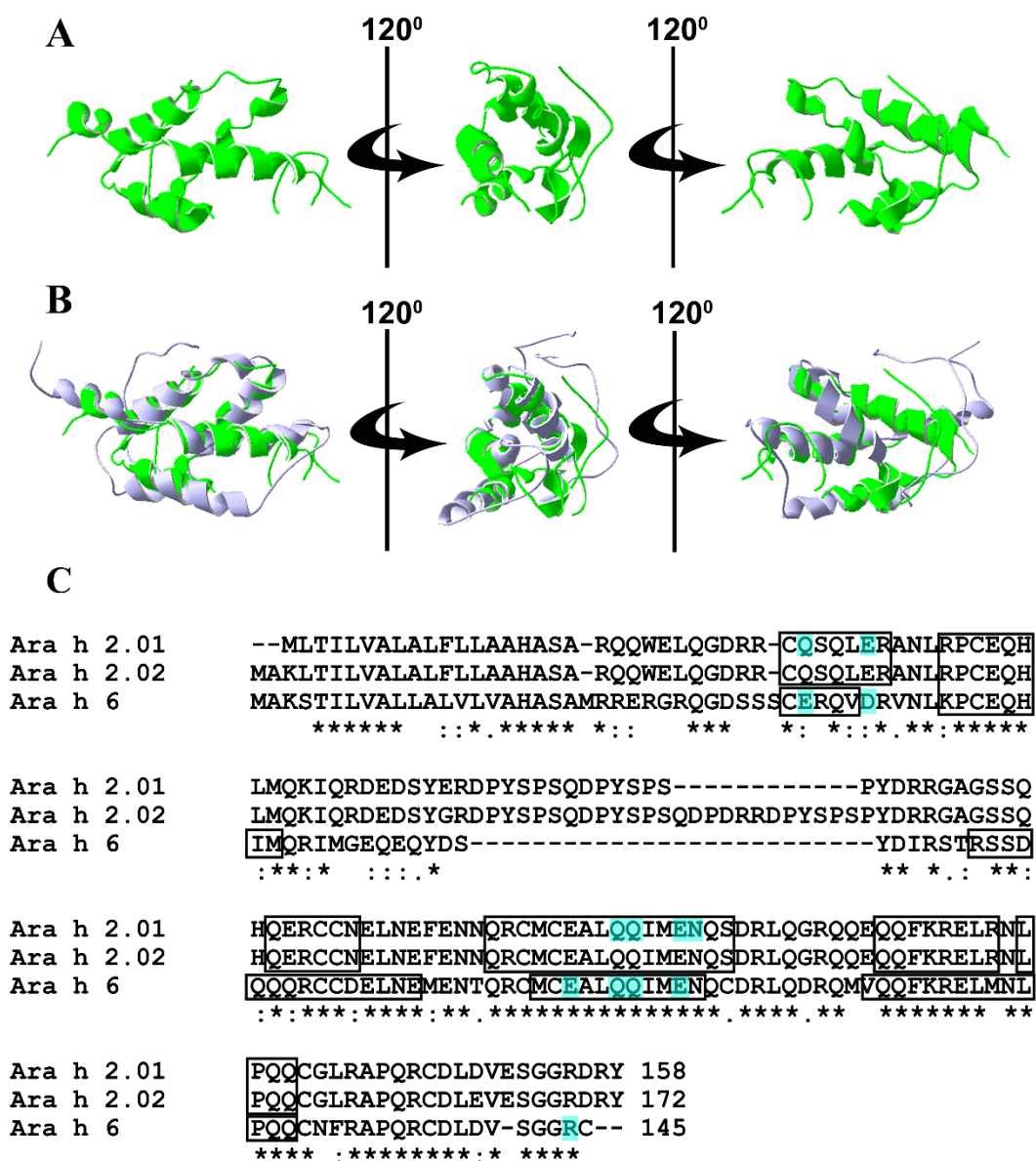
Matematički model	Parametar	Vrednost
Stern-Volmer	$K_{sv} (M^{-1})$	$(3,5 \pm 0,2) \times 10^4$
Lerer	fa	$0,80 \pm 0,02$
	$K_Q (M^{-1})$	$(5,5 \pm 0,7) \times 10^4$
Logaritamski	$K_a (M^{-1})$	$(1,7 \pm 0,6) \times 10^4$
	$K_d (M)$	$(8 \pm 3) \times 10^{-5}$
	n	$0,92 \pm 0,04$
Langmjuer	$K_a (M^{-1})$	$(4 \pm 1) \times 10^4$
	$K_d (M)$	$(2,6 \pm 0,8) \times 10^{-5}$

Na osnovu svega iznetog se može zaključiti da u rastvoru dolazi do formiranja stabilnog Ara h 2-EGCG kompleksa i da EGCG gasi proteinsku fluorescenciju statičkim mehanizmom što nam omogućilo da primenu logaritamskog modela za izračunavanje konstante vezivanja i procenu steometrije formiranog kompleksa. Izračunate konstante i drugi parametri vezivanja su u skladu sa ranije publikovanim podacima koji opisuju vezivanje EGCG za druge proteine hrane i HSA (Tabela 12). U ovoj studiji su dobijene konstante vezivanja reda veličine $10^4 M^{-1}$, što je u skladu sa podacima dostupnim u literaturi a tiču se proučavanja formiranja kompleksa proteina i liganada istom metodologijom. K_Q određena Lererovim modelom je slične vrednosti konstanti gašenja za lizozim (Ghosh, Sahoo et al. 2008), HSA (Maiti, Ghosh et al. 2006) i ovalbumin (Ognjenovic, Stojadinovic et al. 2014). Konstanta vezivanja i broj vezivnih mesta izračunate za Ara h 2-EGCG su u skladu sa onim dobijenim za vezivanje EGCG za proteine mleka - β -laktoglobulin i β -kazein (Bandyopadhyay, Ghosh et al. 2012, Keppler, Stuhldreier et al. 2014) i lipazu (Wu, He et al. 2013).

Ovi rezultati idu u prilog vezivanju EGCG za Ara h 2 i nastajanju stabilnog kompleksa u rastvoru, koji afinitetom vezivanja nalik u literaturi već opisanim za druge globularne proteine.

Ara h 2 (Slika 33 A, C) je veoma sličan Ara h 6 - ova dva proteina dele 59% sličnosti u aminokiselinskoj sekvenci i 75% na nivou sekundarne strukture (Burks, Williams et al. 1992) (slika 33 B-C) i kao alergeni su ukršteno reaktivni (Apostolovic, Luykx et al. 2013). Iako Ara h 6 ne sadrži nijedan ostatak triptofana zbog čega nije moguća procena afiniteta vezivanja za EGCG fluorescentnom spektroskopijom postoji velika verovatnoća da će se EGCG na sličan način vezati za Ara h 6, kao što je to slučaj sa Ara h 2. Vesić i saradnici su primenom analize strukturnim modelovanjem (*engl.* docking analysis) pokazali da oba proteina sadrže po jedno visoko afinitetno EGCG vezivno mesto (Vesic, Stambolic et al. 2015). Kod oba 2S albumina se vezivna mesta EGCG-a nalaze između α -heliksa H1 i H4, na Slici 33C su plavom bojom obeleženi ak ostaci sa kojima EGCG uspostavlja interakcije (Vesic, Stambolic et al. 2015).

Priroda vezivanja EGCG-a za 2S albumine i uticaj na njihovu strukturu su u nastavku istraženi primenom metoda spektroskopije cirkularnog dihroizma (CD) i izotermalne titracione mikrokalorimetrije (ITC).



Slika 33. A. Trodimenzionalna struktura Ara h 2 prikazana iz tri ugla gledanja, tako da su uočljivi i elementi sekundarnih struktura. **B.** Preklapljene strukture Ara h 2 (prikazana zelenom bojom) i Ara h 6 (prikazana plavom bojom), na osnovu kojih se uočava strukturalna sličnost dva proteina, uz koren srednje vrednosti kvadrata devijacije od 1.43 Å. Slika je generisana u Swiss PDB Viewer programu korišćenjem PDB modela Ara h 2 (PDB ID 3OB4) i Ara h 6 (PDB ID 1W2Q). **C.** Poređenje aminokiselinskih sekvenci Ara h 2.01, Ara h 2.02 i Ara h 6 uz prikaz ostataka koji čine EGCG vezivno mesto (osenčene plavom bojom) prema (Vesic, Stambolic et al. 2015). Delovi sekvence uokvireni crnim kvadratima ulaze u sastav α -heliksa. Značenje simbola ispod ak

sekvenci: istovetni bočni ostaci (*), ostaci sa visokim stepenom sličnosti (:), ostaci sa niskim stepenom sličnosti (.)

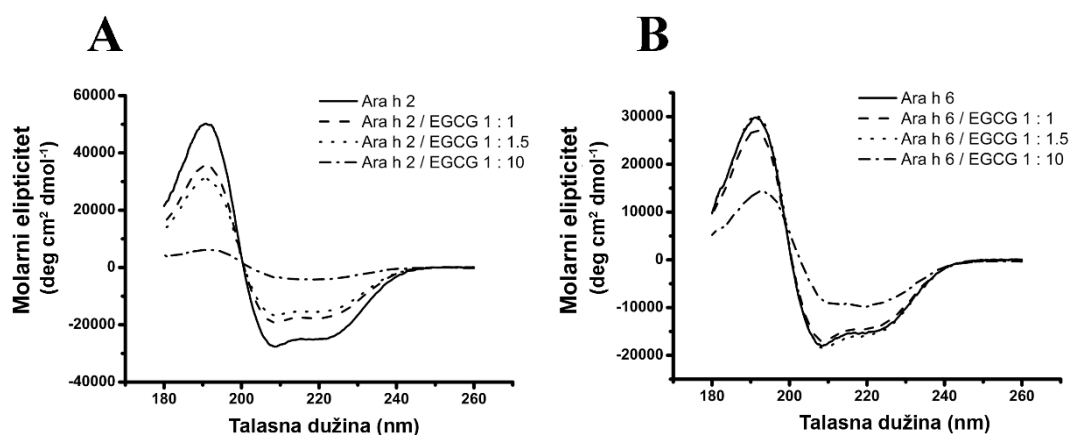
5.3.2. Vezivanje EGCG dovodi do promene u konformaciji i sekundarnim strukturama 2S albumina

Vezivanje polifenolnih jedinjenja za proteine u mnogo slučajeva dovodi do strukturnih promena proteina (Yuksel, Avci et al. 2010, Kanakis, Hasni et al. 2011). Radi provere da li i do takvih promena dolazi pri vezivanju EGCG za 2S albumine, primenjena je metoda spektroskopije cirkularnog dihiroizma (CD) jer je dovoljno osetljiva i može detektovati čak i blage promene u strukturi.

Ara h 2 daje CD spektar uobičajen za proteine čija je dominantna sekundarna struktura α -heliks (Lehmann, Hoffmann et al. 2003) i u opsegu 190 do 260 nm pokazuje 2 minimuma - na 208-210 i 222nm i jedan maksimum - 190-193 nm. Dobijeni rezultati su ukazuju da pri vezivanju EGCG-a za Ara h 2 dolazi do znatnih promena sekundarnih struktura proteina. Pri vezivanju EGCG-a visoko uređeno jezgro Ara h 2 podleže značajnim strukturnim promenama na dozno zavisani način (Slika 34A i Tabela 14). U prisustvu EGCG-a kod Ara h 2 dolazi do povećanja udela β -pločica, na uštrb α -heliksa. Ovaj efekat dolazi do izražaja pri Ara h 2-EGCG molarnom odnosu od 1:1 i prisutan je i pri višim udelima EGCG-a (Slika 34A). Nakon interakcije sa polifenolom sadržaj β -pločica raste sa 3% na 30%, dok sadržaj α -heliksa opada sa 63% na 25% kod Ara h 2, uz porast udela β -navoja sa 12% na 18% (Tabela 14).

Tabela 14. Sadržaj sekundarnih struktura Ara h 2 i Ara h 6 pre i posle dodatka EGCG određene na osnovu CD (NS - neuređene strukture)

Molarni odnos protein:EGCG	Ara h 2				Ara h 6			
	α -heliks (%)	β -pločica (%)	β -navoj (%)	NS* (%)	α -heliks (%)	β -pločica (%)	β -navoj (%)	NS* (%)
1:0	63	3	12	22	52	6	16	26
1:1	64	2	11	22	50	7	17	26
1:1,5	51	7	16	27	51	8	17	25
1:10	25	30	18	27	34	19	20	28



Slika 34. U prisustvu EGCG-a dolazi do strukturnih promena kod Ara h 2 i Ara h 6. **A.** CD spektri Ara h 2. **B.** CD spektri Ara h 6. Proteini su rastvoreni u 20 mM fosfatnom puferu, pH 7,2 i CD spektri su snimani bez dodatka EGCG (—), kao i uz dodatak tako da su primenjeni protein:EGCG molarni odnosi od 1:1 (- - -), 1:1.5 (.....) i 1:10 (- · -)

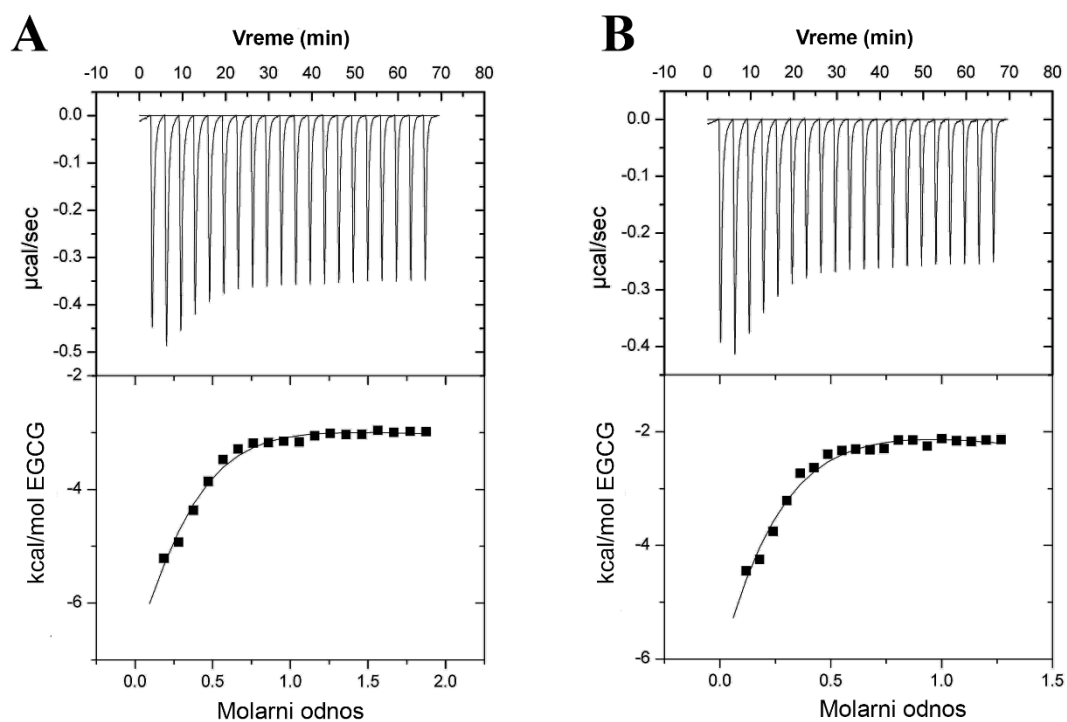
Vezivanje EGCG ima isti efekat na strukturu Ara h 6, koji je takođe primer proteina kod koga među sekundarnim strukturama dominira α -heliks (Slika 34B). Formiranje Ara h 6-EGCG kompleksa je takođe karakterisano smanjenjem udela α -heliksa u korist β -pločica. U prisustvu EGCG-a sadržaj α -heliksa kod Ara h 6 opada do 34% (sa početnih 52%), dok udeo β -pločica raste do 18% (sa 16%, koliko ih je u odsutvu EGCG-a) (Tabela 14). Slično Ara h 2, Ara h 6 u kompleksu sa EGCG-om pokazuje porast u udelu β -navoja, sa 16% (slobodan protein) na 20% (protein u kompleksu). Efekat koji EGCG ima na

strukturu Ara h 6 je nešto suptilniji nego što je slučaj sa Ara h 2, te se efekti EGCG-a na strukturu Ara h 6 ispoljavaju pri višim koncentracijama prisutnog EGCG-a – pri Ara h 6:EGCG molarnom odnosu od 1:10 (Slika 34 B i Tablela 14).

U slučaju oba 2S albumina formiranje kompleksa sa EGCG-om rezultuje smanjenjem uređenosti i to na dozno-zavistan način. Maiti i saradnici (Maiti, Ghosh et al. 2006) su došli do sličnih zaključaka u studiji vezivanja EGCG-a za HSA, gde vezivanje liganda izaziva smanjenje udela α -heliksa u korist β -pločica. Iste zaključke su imali i Ghosh i saradnici kada je u pitanju vezivanje EGCG-a za lizozim (Ghosh, Sahoo et al. 2008), dok su za ovalbumin Ognjenović i saradnici prijavili da pri vezivanju EGCG-a dolazi do porasta sadržaja β -pločica, ali istovremeno i smanjenja udela neuređenih struktura.

5.3.3. Formiranje 2S albumin-EGCG kompleksa je praćeno egzotermnom promenom entalpije

ITC studija je potvrdila vezivanje EGCG za 2S albumine i pokazala da je titracija proteina ligandom dovela do promene vrednosti entalpije kao što se može videti na graficima prikazanim na Slici 35. Formiranje oba kompleksa, Ara h 2-EGCG i Ara h 6-EGCG je praćena egzotermnom promenom entalpije. Broj slobodnih EGCG vezivnih mesta opada sa porastom koncentracije dodatog liganda sve do zasićenja Ara h 2 i Ara h 6 ligandom koje se na graficima vidi kao plato. Na osnovu dobijenih ITC podataka nije moguće zaključiti da li proučavani proteini sadrže samo jedno EGCG vezivno mesto, te ne treba isključiti mogućnost da 2S albumini mogu vezati više EGCG molekula i/ili da podležu konformacionoj promeni u prisustvu visoke koncentracije EGCG.



Slika 35. Tokom formiranja 2S albumin/EGCG kompleksa dolazi do egzotermne promene entalpije. A. ITC termogram vezivanja EGCG za Ara h 2. B. ITC termogram vezivanja EGCG za Ara h 6.

Podaci iz ove studije su u skladu sa onim iz literature, te tako vezivanje EGCG-a za lipazu (Wu, He et al. 2013), BSA, β -kazein i želatin (Bohin, Vincken et al. 2012), ovalbumin (Ognjenovic, Stojadinovic et al. 2014) i insulin (Wang, Liu et al. 2012) prati egzotermna promena entalpije.

Na osnovu prikazanih CD i ITC podataka zaključuje se da formiranje kompleksa se EGCG-om kod oba izučavana proteina uzrokuje slične strukturne promene. Vezivanje IgE za alergene, koje je neophodno za izazivanje alergijske reakcije, je zavisno od stabilnosti i konformacije 2S albumina (Sen, Kopper et al. 2002). Značajne promene u konformaciji proteina, pokazane u ovoj studiji bi mogle biti razlog slabijem IgE vezivanju za Ara h 2 i Ara h 6 poreklom iz brašna od kikirikija sa dodatkom ekstrakta zelenog čaja (Plundrich, Kulis et al. 2014). Takođe, konformacione promene koje EGCG izaziva vezivanjem za 2S albumine mogu uticati na njihovu podložnost delovanju

proteolitičkih enzima, što su pokazali Tantoush i saradnici u studiji u kojoj je dodatak polifenola zelenog čaja omogućio efikasniju digestiju Ara h 2 pepsinom (Tantoush, Apostolovic et al. 2012).

2S albumini proučavani u ovoj studiji, pored sličnosti koju dele u strukturnom smislu, vezuju i EGCG na sličan način. Afinitet vezivanja određen primenom metoda fluorescentne spektroskopije za Ara h 2-EGCG kompleks je u skladu sa onim opisanim za druge binarne protein-EGCG komplekse, poput OVA, α - i β -kazeina, β -laktoglobulina i lizozima. Vezivanje EGCG-a za 2S albumine izaziva znatne promene na nivou sekundarnih struktura i prelazak iz α -heliksa u β -pločice kod oba alergena.

6. Zaključci

6.1. Peptidi crvenog mesa nastali pepsinskom digestijom sadrže PTM koja je ujedno i IgE epitop - α -Gal

Vezivanje šećerne komponente za protein procesom glikozilacije, može dovesti do strukturnih i funkcionalnih promena proteina. α -Gal je disaharid koji kada se nađe u sastavu šećerne komponente glikoproteina crvenog mesa ima ulogu epitopa i izaziva IgE posredovanu reakciju kod alergičnih osoba. U ovoj studiji je primenom metoda imunoblota, masene spektrometrije i bioinformatike pokazano da α -Gal epitopi celim tokom simulirane želudačne digestije ostaju vezani za IgE reaktivne peptide goveđeg tiroglobulina. Peptidi koji nastaju delovanjem pepsina su veličine 10 do 20 kDa i predstavljaju deo C-terminalnog i središnjeg dela sekvence TG. Ovi peptidi sadrže do 2 mesta za koja može biti vezan kompleksni tip glikana koji u svom sastavu sadrži α -Gal.

Rezultati dobijeni u ovom delu studije doprinose razumevanju značaja i stabilnosti N-glikana vezanih za peptide tokom procesa gastrične digestije, daju uvid u poziciju i način na koji je α -Gal vezan za protein i značaj posttranslacionih modifikacija u poremećajima alergije na hranu.

6.2. Pečenje kikirikija utiče na profil PTM i HM

Razlozi za jaču alergnost pečenog kikirikija i dalje nisu u potpunosti razjašnjeni. Ovde su primenjene metode proteomike i imunoblota radi doprinosa razjašnjenju fenomena. Pokazalo se da je ekstraktabilnost proteina niža u slučaju pečenog nego sirovog kikirikija. Elektroforetski profili analiziranih ekstrakata se utoliko razlikuju da se uočava formiranje oligomera i slabija rezolucija / razmaz kod pečenog kikirikija, što upućuje na ubrzavanje Majarove reakcije i prisustvo njenih proizvoda.

Detektovano je 27 posttranslacionih i hemijskih modifikacija, i uočene su razlike u profilima modifikacija na više nivoa. Postoje razlike u rasporedu modifikacija duž ak sekvenci linearnih epitopa izučavanih alergena između sirovog i pečenog kikirikija. Detektovane su modifikacije koje se nalaze na alergenima isključivo u sirovom odnosno pečenom kikirikiju. Među 4 modifikacije detektovane samo u pečenom kikirikiju su

karboksimetilacija Cys i dihidroksilacija Arg – obe u literaturi opisane kao sastavni deo AGE. Među modifikacijama specifičnim za sirovi kikiriki su najinteresantnije formiranje pirolidona od Pro, koja može dovesti do raskidanja peptidne veze (Berlett and Stadtman 1997) i time olakšati digestiju u GIT i derivatizacija Lys acetaldehidom, čime se ovaj ostatak štiti od mogućnosti formiranja AGE. Prisustvo acetilacije lizina i piroglutamata su potvrđene i imunoblotom sa antitelima specifičnim na ove modifikacije.

Modifikacije koje su detektovane na alergenima u oba ekstrakta su poređene i putem relativne kvantifikacije na osnovu površina hromatogramskih pikova peptida koji ih nose. Dve modifikacije koje utiču na relaksaciju proteinske strukture (Jaisson, Pietrement et al. 2018) (Soulby, Heal et al. 2015) detektovane na Ara h 1. Karbamoilacija je znatno prisutnija u pečenom kikirikiju kod Ara h 1. Imunoblotom je ova modifikacija potvrđena na Ara h 1 i Ara h 2. Deamidacija je kod Ara h 1 detektovana u većoj meri u sirovom zrnu i znatno je prisutnija od ostalih modifikacija na ovom proteinu. Potrebno je ispitati koja od ovde dve modifikacije ima jači efekat na strukturu proteina u ekstraktu pečenog kikirikija, da bi se moglo diskutovati o daljem uticaju na alergeni potencijal. Moguće da deamidacija remeti tercijernu strukturu proteina i da dolazi do remećenja konformacionih epitopa u ekstraktu sirovog kikirikija, dok karbamoilacija ima jači denaturišući efekat u ekstraktu pečenog kikirikija i otkriva linearne epitope, što bi moglo da objasni jaču IgE reaktivnost P ekstrakta. Hidroksilacija prolina, modifikacija koja se pokazala neophodnom za imunoreaktivnost linearnih epitopa Ara h 2 (Bernard, Guillon et al. 2015) je detektovana masenom spektrometrijom na Ara h 1 u većoj meri u pečenom zrnu. Kod Ara h 2 je detektovana u oba ekstrakata, ali na različitim pozicijama što onemogućava LFQ procenu. Ara h 2 iz pečenog kikirikija ima hidroksilovane proline na istim pozicijama kao na epitopima na kojima je potvrđen značaj ove modifikacije (Bernard, Guillon et al. 2015). Moguće je da hPro modulira IgE reaktivnost ne samo svojim prisutvom ili odsustvom, već i položajem u okviru ak sekvence. Ara h 3 ima manji broj modifikacija na sebi nego Ara h 1 i samo dve su relativno kvantifikovane. Jedino je helacija gvožđa različito zastupljena u ekstraktima (Sm/Pm 0,27) i doprinosi termostabilnosti proteina (Sun, Cui et al. 2017), što bi moglo uticati na očuvanje IgE reaktivnost alergena koji je nose čak i nakon termičke obrade. Ara h 2 nosi mali broj modifikacija koje se mogu detektovati masenom spektrometrijom, a imunoblotom je potvrđeno prisustvo oksidacije Met do sulfoksida i karbamoilacija. Kod Ara h 6 su

deamidacija i metilacija prisutnije u pečenom ekstraktu i moguće je igraju ulogu u jačini IgE odgovora.

Rezultati ovog dela studije daju uvid u profile modifikacija četiri glavna alergena kikirikija i razlike među njima koje su rezultat različitog tretmana. Primena metoda masene spektrometrije i imunoblota sa antitelima koja se specifično vezuju za modifikovane ak ostatke omogućila je pouzdanu identifikaciju i relativnu kvantifikaciju širokog dijapazona modifikacija koje svojim prisustvom, odsustvom ili specifičnom pozicijom mogu uticati na funkcionalne osobine proteina i njihovu alergnost. Ovde prikazani rezultati mogu doprineti razumevanju uticaja termičke obrade hrane na osobine alergena od kojih zavisi njihova IgE reaktivnost.

6.3. EGCG u rastvoru formira kompleks sa alergenima kikirikija i utiče na njihovu konformaciju

EGCG uspostavlja interakcije sa mnogim proteinima i ispoljava čitav dijapazon bioloških efekata na njih. Ova studija daje uvid u interakcije između značajnih proteina kikirikija, 2S albumina i jednog od biološki najpotentnijih fenola zelenog čaja, EGCG-a primenom metoda analize gašenja fluoroform, spektroskopije cirkularnog dihroizma, izotermalne titracione kalorimetrije i kompjuterskih metoda. CD spektroskopija je potvrdila da dolazi do konformacionih promena proučavanih proteina kada u rastvoru interaguju sa EGCG-om. Tokom vezivanja EGCG-a dolazi do velikih izmena u strukturi i povećanja udela β -pločica, koji je praćen smanjenjem udela α -heliksa. Izotermalna titraciona mikrokalorimetrija ukazuje da je vezivanje ovog fenola i proteina entalpijski povoljan proces. Prisustvo triptofana u sekvenci Ara h 2 je omogućilo primenu analize gašenja fluorescencije radi karakterizacije vezivanja EGCG-a za Ara h 2 i dobijeni parametri su u skladu podacima iz literature koji se odnose na globularne proteine hrane

Ovde prikazani rezultati ukazuju da je vezivanje 2S albumina i fiziološki aktivnog katehina zelenog čaja, EGCG, entalpijski povoljan proces koji ujedno dovodi do promena u konformaciji izučavanih proteina. Pozitivni aspekti formiranja ovih kompleksa bi mogli biti:


- Stabilizacija EGCG-a vezivanjem za proteine (Li and Hagerman 2014), koji u fiziološkim uslovima lako oksiduje (Ahmad, Baba et al. 2015) i gubi biološke funkcije. Vezivanje za lako dostupne biljne proteine bi moglo da pozitivno utiče na očuvanje funkcionalnih bioloških i pozitivnih osobina EGCG-a;
- Svojim vezivanjem EGCG izaziva konformacione promene u Ara h 2 i Ara h 6 i mogao bi imati uticaj na sposobnost vezivanja IgE za ove alergene, s obzirom na to da ovi alergeni pored linearnih sadrže i konformacione epitope.

7. Prilozi




7.1. Prilog 1 – proteini iz gela detektovani masenom spektrometrijom na poziciji koja odgovara Ara h 1

Primenjeni filteri pretrage: peptidni FDR $\leq 1\%$, Ascore ≥ 50 , proteini identifikovani sa bar 2 pripadajuća peptida. Objašnjenja zaglavlja: ID broj - identifikacioni broj proteina iz UniProt baze podataka (uniprot.org), -10lgP – ocena pouzdanosti identifikacije datog peptida na osnovu P vrednosti, #Pep – broj identifikovanih peptida za dati protein, #J.Pep – broj identifikovanih jedinstvenih peptida za dati protein.

sirovi kikiriki

ID broj	-10lgP	Pokrivenost sekvence	#Pep	#J.Pep	Modifikacije	Masa (Da)	Opis proteina
P43237 ALL11_ARAHY	580.17	 68%	113	14	C D O A H C C D F M M O P R S U A I I T N C D O R	70283	Allergen Ara h 1, clone P17 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=1 SV=1
tr E5G076 E5G076_ARAHY	521.08	 59%	78	5	C D O A H A C C D F M M O P R U M C D O R	70788	Ara h 1 allergen OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=ara h 1 PE=4 SV=1
tr A0A290FZZ3 A0A290FZZ3_ARAHY	112.42	 11%	2	2		41532	Resistance protein (Fragment) OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1

pečeni kikiki

ID broj	-10lgP	Pokrivenost sekvence	#Pep	#J.Pep	Modifikacije	Masa (Da)	Opis proteina
P43237 ALL11_ARAHY	569.24	 65%	102	11	C D O A H A C C D F M M O P R U C P C F I S C D R	70283	Allergen Ara h 1, clone P17 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=1 SV=1
tr E5G076 E5G076_ARAHY	509.31	 52%	68	5	C D O A H A C C D F M M O P R U C P M C D	70788	Ara h 1 allergen OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=ara h 1 PE=4 SV=1
tr Q647H3 Q647H3_ARAHY	35.82	 9%	2	2		61532	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1

7.2.Prilog 2 – proteini iz gela detektovani masenom spektrometrijom na poziciji koja odgovara Ara h 2

Primenjeni filteri pretrage: peptidni FDR $\leq 1\%$, Ascore ≥ 50 , proteini identifikovani sa bar 2 pripadajuća peptida. Objašnjenja zaglavlja: ID broj - identifikacioni broj proteina iz UniProt baze podataka (uniprot.org), -10lgP – ocena pouzdanosti identifikacije datog peptida na osnovu P vrednosti, #Pep – broj identifikovanih peptida za dati protein, #J.Pep – broj identifikovanih jedinstvenih peptida za dati protein.

sirovi kikiriki

ID broj	-10lgP	Pokrivenost sekvence	#Pep	#J.Pep	Modifikacije	Masa (Da)	Opis proteina
tr E9LFE8 E9LFE8_ARAHY	357.42	53%	14	14		28290	11S arachin (Fragment) OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr Q6IWGS Q6IWGS_ARAHY	342.17	35%	18	16		58061	Glycinin (Fragment) OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr Q6T2T4 Q6T2T4_ARAHY	341.99	32%	15	4		61499	Storage protein OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr Q647H3 Q647H3_ARAHY	335.03	32%	15	2		61532	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr Q9FZ11 Q9FZ11_ARAHY	330.38	26%	15	2		60449	Gly 1 OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=Gly 1 PE=2 SV=1
tr Q9SQH7 Q9SQH7_ARAHY	300.97	28%	12	2		61011	Glycinin OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=Arah4 PE=2 SV=1
tr Q647H2 AHY3_ARAHY	292.44	31%	14	12		54569	Arachin Ahy-3 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=1 SV=1
tr INJ13 INJ13_ARAHY	278.38	28%	13	2		71345	Seed storage protein Ara h1 OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=ARAX_AHF417E07-017 PE=4 SV=1
tr A1E2B1 A1E2B1_ARAHY	276.65	52%	12	12		31268	11S seed storage globulin B2 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr Q647H1 Q647H1_ARAHY	210.01	10%	5	5		75933	Conarachin OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr Q6PSU2 CONG7_ARAHY	193.66	48%	8	8		20114	Conglutin-7 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=1 SV=2
tr A5Z1R0 A5Z1R0_ARAHY	141.19	18%	2	2		16920	Ara h 6 allergen OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=Ara h 6 PE=4 SV=1
tr INJN8 INJN8_ARAHY	78.91	9%	2	2		23506	Proteasome subunit OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=ARAX_AHF417E07-015 PE=4 SV=1
tr Q1PCR5 Q1PCR5_ARAHY	72.68	13%	2	2		24047	20S proteasome beta subunit (Fragment) OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr B4JWB2 B4JWB2_ARAHY	68.55	10%	2	2		21637	Kunitz trypsin inhibitor 4 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr U3MF97 U3MF97_ARAHY	60.03	27%	2	2		15748	40S ribosomal protein S23 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1









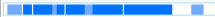



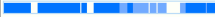





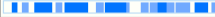



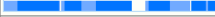



































pečeni kikiriki

ID broj	-10lgP	Pokrivenost sekvence	#Pep	#J.Pep	Modifikacije	Masa (Da)	Opis proteina
tr Q647H4 Q647H4_ARAHY	333.45	40%	22	5		61506	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr BSTYU1 BSTYU1_ARAHY	332.70	40%	26	2		60624	Arachin Arah3 isoform OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=1 SV=1
tr Q647H3 Q647H3_ARAHY	332.24	40%	24	4		61532	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr Q0GM57 Q0GM57_ARAHY	327.64	42%	23	21		58263	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr Q9FZ11 Q9FZ11_ARAHY	323.30	40%	24	4		60449	Gly 1 OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=Gly 1 PE=2 SV=1
tr Q9SQH7 Q9SQH7_ARAHY	288.11	32%	18	2		61011	Glycinin OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=Arah4 PE=2 SV=1
tr E9LFE8 E9LFE8_ARAHY	287.38	55%	14	14		28290	11S arachin (Fragment) OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr Q647H2 AHY3_ARAHY	281.03	33%	16	13		54569	Arachin Ahy-3 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=1 SV=1
tr Q647H1 Q647H1_ARAHY	234.95	19%	10	10		75933	Conarachin OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr A1E2B1 A1E2B1_ARAHY	178.22	49%	7	7		31268	11S seed storage globulin B2 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr A5Z1R0 A5Z1R0_ARAHY	161.54	34%	4	4		16920	Ara h 6 allergen OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=Ara h 6 PE=4 SV=1
tr Q6PSU2 CONG7_ARAHY	146.37	38%	5	5		20114	Conglutin-7 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=1 SV=2



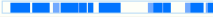













7.3. Prilog 3 – proteini iz gela detektovani masenom spektrometrijom na pozicijama koje odgovaraju Ara h 3 kiseloj i baznoj subjedinici

Primenjeni filteri pretrage: peptidni FDR ≤ 1%, Ascore ≥ 50, proteini identifikovani sa bar 2 pripadajuća peptida. Objašnjenja zaglavlja: ID broj - identifikacioni broj proteina iz UniProt baze podataka (uniprot.org), -10lgP – ocena pouzdanosti identifikacije datog peptida na osnovu P vrednosti, #Pep – broj identifikovanih peptida za dati protein, #J.Pep – broj identifikovanih jedinstvenih peptida za dati protein.

sirovi kikiriki

ID broj	-10lgP	Pokrivenost sekvence	#Pep	#J.Pep	Modifikacije	Masa (Da)	Opis proteina
tr N ING13 N ING13_ARAHY	426.22	 47%	40	8		71345	Seed storage protein Ara h 1 OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=ARAX_AHF417E07-017 PE=4 SV=1
P43237 ALL11_ARAHY	423.33	 51%	41	3		70283	Allergen Ara h 1, done P17 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=1 SV=1
tr T 2B9M0 T 2B9M0_ARAHY	397.41	 85%	34	34		38383	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr Q 38711 Q 38711_ARAHY	382.57	 80%	21	2		29134	Galactose-binding lectin (Fragment) OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=lec PE=2 SV=1
tr A 1E2B0 A 1E2B0_ARAHY	374.21	 63%	19	17		33520	11S seed storage globulin B1 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr A 0A089ZL7 A 0A089ZL7_ARAHY	364.50	 83%	22	3		29407	Peanut agglutinin variant OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr A 0A0F6VX63 A 0A0F6VX63_ARAHY	326.17	 66%	23	23		36080	Annexin OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr A 0A0A6ZDP1 A 0A0A6ZDP1_ARAHY	323.71	 70%	15	5		20101	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr Q 9FZ11 Q 9FZ11_ARAHY	290.36	 31%	15	2		60449	Gly 1 OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=Gly1 PE=2 SV=1
tr A 1DZFO A 1DZFO_ARAHY	289.74	 43%	14	2		60375	Arachin 6 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr Q 647H3 Q 647H3_ARAHY	285.57	 45%	16	2		61532	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr A 0A0A6ZDT0 A 0A0A6ZDT0_ARAHY	274.15	 69%	14	4		20099	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=4 SV=1
tr Q S16T2 Q S16T2_ARAHY	269.65	 34%	13	2		60736	Arachin Ahy-4 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr E 9LFE8 E 9LFE8_ARAHY	251.56	 36%	7	5		28290	11S arachin (Fragment) OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr E 9LFE9 E 9LFE9_ARAHY	249.34	 67%	10	10		28300	11S arachin OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr A 0A0F7GF62 A 0A0F7GF62_ARAHY	235.47	 50%	10	10		36134	Annexin OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=AnnA6 PE=2 SV=1
tr D 8KXZ8 D 8KXZ8_ARAHY	220.59	 60%	13	2		41475	Enoyl-ACP reductase 1-3 OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=ENR1-3 PE=2 SV=1
tr E 6Y9A9 E 6Y9A9_ARAHY	212.74	 60%	13	2		41491	Enoyl-ACP reductase OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=ER PE=2 SV=1
tr B 4UW81 B 4UW81_ARAHY	199.50	 46%	5	5		20343	Glutathione S-transferase 2 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr Q 61WGS5 Q 61WGS5_ARAHY	192.02	 38%	9	9		58061	Glycinin (Fragment) OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr N 1NKG9 N 1NKG9_ARAHY	186.18	 36%	4	4		26041	Seed maturation protein OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=ARAX_AHF417E07-003 PE=4 SV=1
tr Q 42515 Q 42515_ARAHY	183.30	 21%	3	3		28924	Chitinase (Class II) OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=chi2;2 PE=2 SV=1
tr H 6U596 H 6U596_ARAHY	183.18	 31%	7	7		19370	Alcohol dehydrogenase (Fragment) OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr A 0A191UJ50 A 0A191UJ50_ARAHY	175.63	 16%	7	7		52587	Ribulose biphosphate carboxylase large chain OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=rbcL PE=3 SV=1
tr A 0A0R4UXQ1 A 0A0R4UXQ1_ARAHY	165.23	 20%	4	4		48348	3-ketoacyl-CoA thiolase OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=PKT PE=2 SV=1
tr D 4NXXQ0 D 4NXXQ0_ARAHY	158.74	 41%	4	4		23448	Germin-like protein subfamily 3 member 3 OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=GLP1 PE=2 SV=1
tr B 4UWD5 B 4UWD5_ARAHY	135.79	 26%	2	2		15013	Proteasome subunit alpha type (Fragment) OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
Q647H2 AHY3_ARAHY	124.35	 3%	2	2		54569	Arachin Ahy-3 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=1 SV=1
tr A 5Z1R0 A 5Z1R0_ARAHY	109.53	 23%	2	2		16920	Ara h 6 allergen OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=Ara h 6 PE=4 SV=1

pečeni kikiriki

ID broj	-10lgP	Pokrivenost sekvence	#Pep	#J.Pep	Modifikacije	Masa (Da)	Opis proteina
t NING13 NING13_ARAHY	359.85	 46%	37	6	c o a d	71345	Seed storage protein Ara h1 OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=ARAX_AHF417E07-017 PE=4 SV=1
t A1DZF0 A1DZF0_ARAHY	315.44	 63%	24	5	c a	60375	Arachin 6 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
t Q647H3 Q647H3_ARAHY	304.28	 60%	22	3	c o h	61532	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
t Q9FZ11 Q9FZ11_ARAHY	290.13	 43%	18	2	c h p	60449	Gly1 OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=Gly1 PE=2 SV=1
t Q38711 Q38711_ARAHY	279.15	 85%	18	2	s o h	29134	Galactose-binding lectin (Fragment) OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=lec PE=2 SV=1
t A0A089ZXL7 A0A089ZXL7_ARAHY	265.47	 78%	17	2	s o h	29407	Peanut agglutinin variant OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
t A1E2B0 A1E2B0_ARAHY	238.61	 63%	12	10	c o h	33520	11S seed storage globulin B1 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
t E9LFE8 E9LFE8_ARAHY	219.78	 47%	9	7	s o h d	28290	11S arachin (Fragment) OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
t Q6IWGS5 Q6IWGS5_ARAHY	216.05	 35%	12	11	c	58061	Glycinin (Fragment) OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
t E9LFE9 E9LFE9_ARAHY	145.43	 33%	5	5	n	28300	11S arachin OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
t E9LFE9 E9LFE9_ARAHY	134.03	 28%	3	3		22636	Late embryogenesis abundant protein group 5 protein OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=LEA5-1 PE=2 SV=1
t ASZ1R0 ASZ1R0_ARAHY	132.47	 34%	4	4	c o	16920	Ara h 6 allergen OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=Ara h 6 PE=4 SV=1
Q647H2 AHY3_ARAHY	128.91	 11%	4	3	c	54569	Arachin Ahy-3 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=1 SV=1
Q6PSU2 CONG7_ARAHY	94.40	 27%	3	3	c o	20114	Conglutin-7 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=1 SV=2
t Q42515 Q42515_ARAHY	88.18	 14%	2	2		28924	Chitinase (Class II) OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=chi2;2 PE=2 SV=1
t T2B9M0 T2B9M0_ARAHY	44.42	 15%	2	2		38383	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1

7.4.Prilog 4 – proteini iz gela detektovani masenom spektrometrijom na poziciji koja odgovara Ara h 6

Primenjeni filteri pretrage: peptidni FDR $\leq 1\%$, Ascore ≥ 50 , proteini identifikovani sa bar 2 pripadajuća peptida. Objasnjenja zaglavlja: ID broj - identifikacioni broj proteina iz UniProt baze podataka (uniprot.org), -10lgP – ocena pouzdanosti identifikacije datog peptida na osnovu P vrednosti, #Pep – broj identifikovanih peptida za dati protein, #J.Pep – broj identifikovanih jedinstvenih peptida za dati protein.

sirovi kikiriki

ID broj	-10lgP	Pokrivenost sekvence	#Pep	#J.Pep	Modifikacije	Masa (Da)	Opis proteina
tr ASZ1R0 ASZ1R0_ARAHY	287.47	67%	13	13	c d o a h c m c p s e n r	16920	Ara h 6 allergen OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=Ara h 6 PE=4 SV=1
tr B0YIU5 B0YIU5_ARAHY	212.68	60%	6	6	d h	16413	Ara h 8 allergen isoform OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr Q2PK12 Q2PK12_ARAHY	204.97	71%	6	6	a h	16090	Actin depolymerizing factor-like protein OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr E9LFE8 E9LFE8_ARAHY	152.22	25%	4	4		28290	11S arachin (Fragment) OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr A0A0A6ZDP1 A0A0A6ZDP1_ARAHY	149.99	34%	4	4		20101	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr Q45W80 Q45W80_ARAHY	133.36	29%	4	2	a	16439	Nucleoside diphosphate kinase OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr Q1HDS7 Q1HDS7_ARAHY	103.46	32%	2	2		15198	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr N1NG13 N1NG13_ARAHY	95.57	5%	2	2		71345	Seed storage protein Ara h1 OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=ARAX_AHF417E07-017 PE=4 SV=1
P02872 LECG_ARAHY	89.81	13%	2	2		29325	Galactose-binding lectin OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=1 SV=3
tr Q45W77 Q45W77_ARAHY	84.79	33%	3	2	c	17206	Ubiquitin-conjugating enzyme 1 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr K7PQ65 K7PQ65_ARAHY	80.87	30%	3	3		19193	Mother of FT and TFL1 OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=MFT PE=2 SV=1
tr Q647G4 Q647G4_ARAHY	80.57	17%	2	2		15527	Oleoin 2 (Fragment) OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1

pečeni kikiriki

ID broj	-10lgP	Pokrivenost sekvence	#Pep	#J.Pep	Modifikacije	Masa (Da)	Opis proteina
tr A1DZFO A1DZFO_ARAHY	357.33	56%	27	3	c d e h m p	60375	Arachin 6 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr Q647H3 Q647H3_ARAHY	343.44	51%	25	2	c d e m p	61532	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr Q9FZ11 Q9FZ11_ARAHY	342.74	45%	25	2	c d e m p	60449	Gly 1 OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=Gly 1 PE=2 SV=1
tr Q647H4 Q647H4_ARAHY	341.20	44%	23	3	c d e m p	61506	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr N1NG13 N1NG13_ARAHY	282.41	34%	18	2	c o	71345	Seed storage protein Ara h1 OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=ARAX_AHF417E07-017 PE=4 SV=1
tr Q6PSU3 Q6PSU3_ARAHY	281.70	40%	19	3	c o	66575	Conarachin (Fragment) OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=4 SV=1
tr ASZ1R0 ASZ1R0_ARAHY	275.67	70%	15	15	c d e a h r a d m m p p e d r	16920	Ara h 6 allergen OS=Arachis hypogaea OX=3818 GN=Ara h 6 PE=4 SV=1
tr Q647H1 Q647H1_ARAHY	235.52	19%	9	9	c d e	75933	Conarachin OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr Q61WGS Q61WGS_ARAHY	226.49	30%	8	7	c	58061	Glycinin (Fragment) OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr Q647H2 AHY3_ARAHY	202.45	28%	8	6	c	54569	Arachin Ahy-3 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=1 SV=1
tr E9LFE8 E9LFE8_ARAHY	169.03	36%	7	7		28290	11S arachin (Fragment) OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
tr Q6PSU2 CONG7_ARAHY	167.89	55%	6	6	c o c e	20114	Conglutin-7 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=1 SV=2
tr A1E2B1 A1E2B1_ARAHY	48.19	13%	2	2		31268	11S seed storage globulin B2 OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=2 SV=1
P02872 LECG_ARAHY	47.81	9%	2	2		29325	Galactose-binding lectin OS=Arachis hypogaea OX=3818 PE=1 SV=3

7.5. Prilog 5 - Proteini kikirikija i njihove modifikacije detektovane masenom spektrometrijom u ekstraktu sirovog kikirikija

ID broj proteina	-10lgP	Pokrivenost sekvence (%)	# Peptida	# Jedinstvenih peptida	Modifikacije	Masa (Da)	Opis proteina
P43237	645.11	74	145	17	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Oksidacija (M); Hidroksilacija Pro; Acetilacija (N-term); 22 dodatnih modifikacija	70283	Allergen Ara h 1 clone P17
E5G076	579.05	63	92	5	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Oksidacija (M); Hidroksilacija Pro; Acetilacija (K); 17 dodatnih modifikacija	70788	Ara h 1 allergen GN=ara h 1
A1DZF0	417.78	73	33	2	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Hidroksilacija Pro; Metilacija(KR); Piro-glu od Q; 2 dodatne modifikacije	60375	Arachin 6
A1E2B0	413.18	69	22	19	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Oksidacija (M); Hidroksilacija Pro	33520	11S seed storage globulin B1
Q647H4	408.21	65	31	5	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Hidroksilacija Pro; Metilacija(KR); Piro-glu od Q; Zamena 2 protona gvoždem	61506	Arachin Ahy-1
Q647H3	406.53	75	33	3	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Oksidacija (M); Hidroksilacija Pro; Metilacija(KR); 3 dodatne modifikacije	61532	Arachin Ahy-2
Q38711	403.47	80	22	2	Deamidacija (NQ); Oksidacija (M); Hidroksilacija Pro; Jodinacija	29134	Galactose-binding lectin (Fragment) GN=lec
T2B9M0	402.8	85	32	32	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ)	38383	Fructose-bisphosphate aldolase
Q9FZ11	399.87	61	33	4	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Hidroksilacija Pro; Metilacija(KR); Piro-glu od Q; 2 dodatne modifikacije	60449	Gly1 GN=Gly1
E9LFE8	397.77	82	21	18	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Oksidacija (M); Hidroksilacija Pro; Karbamoilacija; 5 dodatnih modifikacija	28290	11S arachin (Fragment)
Q516T2	388.78	64	31	2	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Hidroksilacija Pro; Metilacija(KR); Piro-glu od Q; 2 dodatne modifikacije	60736	Arachin Ahy-4
A0A089ZXL7	382.36	83	23	3	Deamidacija (NQ); Oksidacija (M); Hidroksilacija Pro; Jodinacija; Benzoil	29407	Peanut agglutinin variant
Q61WG5	369.35	71	26	24	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Oksidacija (M); Metilacija(KR); Piro-glu od Q	58061	Glycinin (Fragment)
Q9SQH7	367.94	57	25	3	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Hidroksilacija Pro; Metilacija(KR); Piro-glu od Q; Zamena 2 protona gvoždem	61011	Glycinin GN=Arah4
A5Z1R0	349.26	70	19	19	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Oksidacija (M); Hidroksilacija Pro; Acetilacija (N-term); 13 dodatnih modifikacija	16920	Ara h 6 allergen GN=Ara h 6
A0A0F6VX63	329.34	66	25	25	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Oksidacija (M); Hidroksilacija Pro; Acetilacija (Protein N-term)	36080	Annexin
A0A0A6ZDP1	320.64	70	16	5	Oksidacija (M); Acetilacija (Protein N-term); Metilacija(KR); Trimetilacija; Ubikvitin; Deamidacija (R)	20101	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2
Q647H2	315.45	30	14	12	Karbamidometilacija	54569	Arachin Ahy-3
Q6PSU2	298.5	59	19	19	Karbamidometilacija; Oksidacija (M); Hidroksilacija Pro; Acetilacija (N-term); Karbamoilacija; 3 dodatne modifikacije	20114	Conglutin-7

A1E2B1	285.11	61	13	13	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Oksidacija (M); Etil-amino Ser ili Thr	31268	11S seed storage globulin B2
A0A0A6ZDT0	274.42	69	14	3	Oksidacija (M); Hidroksilacija Pro; Ubikvitin	20099	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2
E9LFE9	259.67	67	11	11	Karbamidometilacija; Biotinilacija; N-Sukinimidil-2-morfolin-acetat	28300	11S arachin
E5FHY1	255.37	74	10	3	Oksidacija (M)	10140	Late embryogenesis abundant protein group 1 protein GN=LEA1-2
BOYIU5	227.95	60	6	6	Deamidacija (NQ); Hidroksilacija Pro	16413	Ara h 8 allergen isoform
A0A0F7GF62	223.87	43	9	9	Karbamidometilacija; Acetilacija (Protein N-term)	36134	Annexin GN=AnnAh6
D8KXZ8	217.25	60	13	2	Deamidacija (NQ); Hidroksilacija Pro	41475	Enoyl-ACP reductase 1-3 GN=ENR1-3
Q647H1	214.69	10	5	5	Hidroksilacija Pro; Miristoilacija; Dietilacija; Zamena 2 protona gvoždem	75933	Conarachin
B4UW81	210.43	46	5	5	Metilacija(KR); Beta-methylthiolacija (ND); kvinone	20343	Glutathione S-transferase 2
E6Y9A9	209.46	60	13	2	Deamidacija (NQ); Hidroksilacija Pro	41491	Enoyl-ACP reductase GN=ER
B6CG41	204.38	84	7	2	Karbamidometilacija	9054	Non-specific lipid-transfer protein (Fragment)
N1NKG9	200.24	38	5	5	Hidroksilacija Pro	26041	Seed maturation protein GN=ARAX_AHF417E07-003
Q2PK12	194.37	60	5	5	Karbamidometilacija; Hidroksilacija Pro	16090	Actin depolymerizing factor-like protein
Q42515	188	21	3	3	Karbamidometilacija	28924	Chitinase (Class II) GN=chi2;2
B6CEX8	185.13	66	7	2	Karbamidometilacija	11651	Non-specific lipid-transfer protein
H6U596	184.11	31	7	7		19370	Alcohol dehydrogenase (Fragment)
A0A191UJ50	175.92	20	8	8	Karbamidometilacija	52587	Ribulose biphosphate carboxylase large chain GN=rbcl
A0A0R4UXQ1	160.99	20	4	4	Karbamidometilacija	48348	3-ketoacyl-CoA thiolase GN=PKT
D4NXQ0	154.37	41	3	3	Deamidacija (NQ)	23448	Germin-like protein subfamily 3 member 3 GN=GLP1
E5FHZ2	138.49	20	4	4		27370	Late embryogenesis abundant protein group 5 protein GN=LEA5-2
C0HJZ1	137.22	33	3	3	Karbamidometilacija	8308	Defensin 3
Q45W80	132.66	29	4	2	Acetilacija (Protein N-term)	16439	Nucleoside diphosphate kinase
A0A290FZZ3	132	16	3	3		41532	Resistance protein (Fragment)
B4UWD5	131.89	26	2	2		15013	Proteasome subunit alpha type (Fragment)
E5FHY6	107.93	24	3	3		18003	Late embryogenesis abundant protein group 3 protein (Fragment) GN=LEA3-3
Q647G8	105.33	25	3	3	Karbamidometilacija	18455	2S protein 2
Q647G5	104.61	21	3	3		17753	Oleolin 17.8
Q1HDS7	98.68	32	2	2		15198	Superoxide dismutase [Cu-Zn]
Q1PCR5	96	13	2	2		24047	20S proteasome beta subunit (Fragment)
Q06H31	95.33	26	2	2	Deamidacija (NQ); Oksidacija (M)	19128	Translationally controlled tumor-like protein

K7PQ65	81.7	30	3	3		19193	Mother of FT and TFL1 GN=MFT
N1NIN8	77.06	9	2	2		23506	Proteasome subunit GN=ARAX_AHF417E07-015
Q45W77	74.42	29	2	2		17206	Ubiquitin-conjugating enzyme 1
A0A0A6ZDR9	74.14	6	2	2	Karbamidometilacija	52010	Serine hydroxymethyltransferase
B4UW57	68.98	19	2	2	Karbamidometilacija	24268	Putative dihydroflavonol reductase (Fragment)
Q6VT83	65.1	21	2	2	Hidroksilacija Pro	16952	Ara h 8 allergen
U3MF97	63.08	27	2	2	Karbamidometilacija	15748	40S ribosomal protein S23
Q2VMU0	54.89	29	2	2	Karbamidometilacija; Oksidacija (M)	11496	Serine protease inhibitor
Q4JME6	52.48	4	2	2		97476	Lipoxygenase GN=Pnlox3
H6QXH0	44.29	1	2	2	Oksidacija (M)	252184	Homomeric acetyl-CoA carboxylase

7.6. Prilog 6 - Proteini kikirikija i njihove modifikacije detektovane masenom spektrometrijom u ekstraktu pečenog kikirikija

ID broj proteina	-10lgP	Pokrivenost sekvence (%)	# Peptida	# Jedinstvenih peptida	Modifikacije	Masa (Da)	Opis proteina
P43237	678.46	76	120	11	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Oksidacija (M); Hidroksilacija Pro; Acetilacija (K); 18 dodatnih modifikacija	70283	Allergen Ara h 1 clone P17
N1NG13	634.66	70	117	6	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Oksidacija (M); Hidroksilacija Pro; Acetilacija (K); 18 dodatnih modifikacija	71345	Seed storage protein Ara h1 GN=ARAX_AHF417E07-017
E5G076	614.41	66	83	3	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Oksidacija (M); Hidroksilacija Pro; Karbamoilacija; 12 dodatnih modifikacija	70788	Ara h 1 allergen GN=ara h 1
A1DZF0	457.09	75	51	5	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Hidroksilacija Pro; Acetilacija (K); Acetilacija (N-term); 10 dodatnih modifikacija	60375	Arachin 6
Q647H3	447.48	77	50	7	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Oksidacija (M); Hidroksilacija Pro; Acetilacija (N-term); 10 dodatnih modifikacija	61532	Arachin Ahy-2
Q647H4	445.45	68	45	7	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Hidroksilacija Pro; Acetilacija (K); Acetilacija (N-term); 9 dodatnih modifikacija	61506	Arachin Ahy-1
Q9FZ11	430.59	61	45	5	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Hidroksilacija Pro; Acetilacija (N-term); Karbamoilacija; 9 dodatnih modifikacija	60449	Gly1 GN=Gly1
Q5I6T2	423.79	70	44	2	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Hidroksilacija Pro; Acetilacija (N-term); Karbamoilacija; 9 dodatnih modifikacija	60736	Arachin Ahy-4
Q9SQH7	399.41	56	36	3	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Hidroksilacija Pro; Acetilacija (N-term); Karbamoilacija; 8 dodatnih modifikacija	61011	Glycinin GN=Arah4

Q0GM57	384.09	61	32	28	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Oksidacija (M); Hidroksilacija Pro; Metilacija(KR); 4 dodatne modifikacije	58263	Iso-Ara h3
E9LFE8	368.23	82	21	18	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Oksidacija (M); Hidroksilacija Pro; Dimetilacija(KR); Propionamid (K, X na N-term)	28290	11S arachin (Fragment)
A5Z1R0	362.47	70	19	19	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Oksidacija (M); Hidroksilacija Pro; Acetilacija (N-term); 9 dodatnih modifikacija	16920	Ara h 6 allergen GN=Ara h 6
Q38711	341.69	85	18	2	Deamidacija (NQ); Oksidacija (M); Hidroksilacija Pro	29134	Galactose-binding lectin (Fragment) GN=lec
Q647H2	340.54	38	17	13	Karbamidometilacija; Oksidacija (M); Ubikvitin; Amidinacija Lys i N-term amina sa metil-acet-imidatom	54569	Arachin Ahy-3
A0A089ZXL7	324.9	78	17	2	Deamidacija (NQ); Oksidacija (M); Hidroksilacija Pro	29407	Peanut agglutinin variant
Q6PSU2	310.47	76	20	20	Karbamidometilacija; Oksidacija (M); Acetilacija (N-term); Karbamoilacija; Piro-glu od Q; Ammonia-loss (N)	20114	Conglutin-7
A1E2B0	308.23	69	16	13	Karbamidometilacija; Oksidacija (M); Hidroksilacija Pro	33520	11S seed storage globulin B1
E5FHY1	290.67	71	13	3		10140	Late embryogenesis abundant protein group 1 protein GN=LEA1-2
E5FHY2	283.56	72	12	2		10652	Late embryogenesis abundant protein group 1 protein GN=LEA1-3
Q647H1	270.61	19	11	11	Karbamidometilacija; Deamidacija (NQ); Dietilacija	75933	Conarachin
E5FHZ0	219.85	39	9	2	Oksidacija (M); Acetilacija (Protein N-term); Karbamoilacija	17233	Late embryogenesis abundant protein group 4 protein GN=LEA4-2
A1E2B1	203.41	56	7	7	Karbamidometilacija; Ethil amino	31268	11S seed storage globulin B2
E9LFE9	190.93	41	8	8	Karbamidometilacija; N-Succinimidil-2-morpholine acetate	28300	11S arachin
B6CG41	166.31	70	5	2	Karbamidometilacija	9054	Non-specific lipid-transfer protein (Fragment)
N1NKG9	145.51	24	3	3		26041	Seed maturation protein GN=ARAX_AHF417E07-003
B6CEX8	140.65	55	5	2	Karbamidometilacija	11651	Non-specific lipid-transfer protein
A0A0A6ZDP1	128.78	21	2	2	Formilacija	20101	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2
Q647G8	113.51	25	3	3	Karbamidometilacija; Hidroksilacija Pro	18455	2S protein 2
C0HJZ1	106.33	21	2	2	Karbamidometilacija	8308	Defensin 3
Q42515	95.85	14	2	2		28924	Chitinase (Class II) GN=chi2;2
Q0PKR5	70.32	58	2	2	Karbamidometilacija	7085	Proteinase inhibitor (Fragment) GN=PI
T2B9M0	51.28	15	2	2		38383	Fructose-bisphosphate aldolase

8. Literatura

Abramovitch, J. B., A. L. Lopata, R. E. O'Hehir and J. M. Rolland (2017). "Effect of thermal processing on T cell reactivity of shellfish allergens - Discordance with IgE reactivity." *12*(3): e0173549.

Ahmad, M., W. N. Baba, T. A. Wani, A. Gani, A. Gani, U. Shah, S. Wani and F. Masoodi (2015). "Effect of green tea powder on thermal, rheological & functional properties of wheat flour and physical, nutraceutical & sensory analysis of cookies." Journal of food science and technology **52**(9): 5799-5807.

Al-Abed, Y., T. Mitsuhashi, H. Li, J. A. Lawson, G. A. FitzGerald, H. Founds, T. Donnelly, A. Cerami, P. Ulrich and R. Bucala (1999). "Inhibition of advanced glycation endproduct formation by acetaldehyde: Role in the cardioprotective effect of ethanol." Proceedings of the National Academy of Sciences **96**(5): 2385-2390.

Albani, J. R. (2004). Chapter 4 - Fluorescence Quenching. Structure and Dynamics of Macromolecules: Absorption and Fluorescence Studies. J. R. Albani. Amsterdam, Elsevier Science: 141-192.

Apostolovic, D., M. Krstic, J. Mihailovic, M. Starkhammar, T. Cirkovic Velickovic, C. Hamsten and M. van Hage (2017). "Peptidomics of an in vitro digested alpha-Gal carrying protein revealed IgE-reactive peptides." Sci Rep **7**(1): 5201.

Apostolovic, D., D. Luykx, H. Warmenhoven, D. Verbart, D. Stanic-Vucinic, G. A. H. de Jong, T. C. Velickovic and S. J. Koppelman (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 (BBA) - Proteins and Proteomics **1834**(12): 2832-2842.

Apostolovic, D., D. Stanic-Vucinic, H. H. J. de Jongh, G. A. H. de Jong, J. Mihailovic, J. Radosavljevic, M. Radibratovic, J. A. Nordlee, J. L. Baumert, M. Milcic, S. L. Taylor, N. Garrido Clua, T. Cirkovic Velickovic and S. J. Koppelman (2016). "Conformational stability of digestion-resistant peptides of peanut conglutins reveals the molecular basis of their allergenicity." Scientific Reports **6**: 29249.

Apostolovic, D., T. A. Tran, C. Hamsten, M. Starkhammar, T. Cirkovic Velickovic and M. van Hage (2014). "Immunoproteomics of processed beef proteins reveal novel galactose-alpha-1,3-galactose-containing allergens." Allergy **69**(10): 1308-1315.

Apostolovic, D., T. A. Tran, S. Sanchez-Vidaurre, T. Cirkovic Velickovic, M. Starkhammar, C. Hamsten and M. van Hage (2015). "Red meat allergic patients have a selective IgE response to the alpha-Gal glycan." Allergy **70**(11): 1497-1500.

Asano, K., K. Shinagawa and N. Hashimoto (1982). "Characterization of Haze-Forming Proteins of Beer and Their Roles in Chill Haze Formation." Journal of the American Society of Brewing Chemists **40**(4): 147-154.

- Astwood, J. D., J. N. Leach and R. L. Fuchs (1996). "Stability of food allergens to digestion in vitro." Nat Biotechnol **14**(10): 1269-1273.
- Aswad, D. W., M. V. Paranandi and B. T. Schurter (2000). "Isoaspartate in peptides and proteins: formation, significance, and analysis." J Pharm Biomed Anal **21**(6): 1129-1136.
- Bandyopadhyay, P., A. K. Ghosh and C. Ghosh (2012). "Recent developments on polyphenol-protein interactions: effects on tea and coffee taste, antioxidant properties and the digestive system." Food Funct **3**(6): 592-605.
- Barber, K. W. and J. Rinehart (2018). "The ABCs of PTMs." Nat Chem Biol **14**(3): 188-192.
- Benede, S., R. Lopez-Fandino, M. Reche, E. Molina and I. Lopez-Exposito (2013). "Influence of the carbohydrate moieties on the immunoreactivity and digestibility of the egg allergen ovomucoid." PLoS One **8**(11): e80810.
- Berlett, B. S. and E. R. Stadtman (1997). "Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress." Journal of Biological Chemistry **272**(33): 20313-20316.
- Bernard, H., B. Guillon, M.-F. Drumare, E. Paty, S. C. Dreskin, J.-M. Wal, K. Adel-Patient and S. Hazebrouck (2015). "Allergenicity of peanut component Ara h 2: Contribution of conformational versus linear hydroxyproline-containing epitopes." Journal of Allergy and Clinical Immunology **135**(5): 1267-1274.e1268.
- Beyer, K., E. Morrow, X.-M. Li, L. Bardina, G. A. Bannon, A. W. Burks and H. A. Sampson (2001). "Effects of cooking methods on peanut allergenicity." Journal of Allergy and Clinical Immunology **107**(6): 1077-1081.
- Bloom, K. A., F. R. Huang, R. Bencharitiwong, L. Bardina, A. Ross, H. A. Sampson and A. Nowak-Wegrzyn (2014). "Effect of heat treatment on milk and egg proteins allergenicity." Pediatr Allergy Immunol **25**(8): 740-746.
- Bode, A. M. and Z. Dong (2009). "Epigallocatechin 3-Gallate and Green Tea Catechins: United They Work, Divided They Fail." Cancer Prevention Research **2**(6): 514-517.
- Bogh, K. L., V. Barkholt and C. B. Madsen (2013). "The sensitising capacity of intact beta-lactoglobulin is reduced by co-administration with digested beta-lactoglobulin." Int Arch Allergy Immunol **161**(1): 21-36.
- Bøgh, K. L., V. Barkholt and C. B. Madsen (2013). "The sensitising capacity of intact β -lactoglobulin is reduced by co-administration with digested β -lactoglobulin." International archives of allergy and immunology **161**(1): 21-36.
- Bohin, M. C., J.-P. Vincken, H. T. W. M. van der Hijden and H. Gruppen (2012). "Efficacy of Food Proteins as Carriers for Flavonoids." J Agric Food Chem **60**(16): 4136-4143.
- Boteva, R., T. Zlateva, V. DorovskaTaran, A. Visser, R. Tsanev and B. Salvato (1996). "Dissociation equilibrium of human recombinant interferon gamma." Biochemistry **35**(47): 14825-14830.

Boyce, J. A., A. Assa'ad, A. W. Burks, S. M. Jones, H. A. Sampson, R. A. Wood, M. Plaut, S. F. Cooper, M. J. Fenton, S. H. Arshad, S. L. Bahna, L. A. Beck, C. Byrd-Bredbenner, C. A. Camargo, L. Eichenfield, G. T. Furuta, J. M. Hanifin, C. Jones, M. Kraft, B. D. Levy, P. Lieberman, S. Luccioli, K. M. McCall, L. C. Schneider, R. A. Simon, F. E. R. Simons, S. J. Teach, B. P. Yawn and J. M. Schwaninger (2010). "Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: Summary of the NIAID-Sponsored Expert Panel Report." Journal of Allergy and Clinical Immunology **126**(6): 1105-1118.

Boyer, R. (2006). "Posttranslational modification of proteins: Expanding nature's inventory. Christopher T. Walsh, Roberts & Company Publishers, Greenwood Village, CO, 2005, 576 pp., ISBN 0-9747077-3-2, \$98.00." Biochemistry and Molecular Biology Education **34**(6): 461-462.

Braicu, C., V. Pilecki, O. Balacescu, A. Irimie and I. B. Neagoe (2011). "The relationships between biological activities and structure of flavan-3-ols." International journal of molecular sciences **12**(12): 9342-9353.

Breiteneder, H. and C. Radauer (2004). "A classification of plant food allergens." J Allergy Clin Immunol **113**(5): 821-830; quiz 831.

Brosch, M., S. Swamy, T. Hubbard and J. Choudhary (2008). "Comparison of Mascot and X!Tandem performance for low and high accuracy mass spectrometry and the development of an adjusted Mascot threshold." Mol Cell Proteomics **7**(5): 962-970.

Burks, A. W., G. Cockrell, J. S. Stanley, R. M. Helm and G. A. Bannon (1995). "Recombinant peanut allergen Ara h I expression and IgE binding in patients with peanut hypersensitivity." The Journal of Clinical Investigation **96**(4): 1715-1721.

Burks, A. W., L. W. Williams, C. Connaughton, G. Cockrell, T. J. O'Brien and R. M. Helm (1992). "Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge." J Allergy Clin Immunol **90**(6 Pt 1): 962-969.

Cavet, M. E., K. L. Harrington, T. R. Vollmer, K. W. Ward and J. Z. Zhang (2011). "Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of the green tea polyphenol epigallocatechin gallate in human corneal epithelial cells." Mol Vis **17**: 533-542.

Chruszcz, M., S. J. Maleki, K. A. Majorek, M. Demas, M. Bublin, R. Solberg, B. K. Hurlburt, S. Ruan, C. P. Mattison, H. Breiteneder and W. Minor (2011). "Structural and immunologic characterization of Ara h 1, a major peanut allergen." The Journal of biological chemistry **286**(45): 39318-39327.

Chung, S.-Y. and E. T. Champagne (2001). "Association of end-product adducts with increased IgE binding of roasted peanuts." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**(8): 3911-3916.

Commins, S. P. and T. A. E. Platts-Mills (2013). "Delayed Anaphylaxis to Red Meat in Patients with IgE Specific for Galactose alpha-1,3-Galactose (alpha-gal)." Current allergy and asthma reports **13**(1): 72-77.

Commins, S. P., S. M. Satinover, J. Hosen, J. Mozena, L. Borish, B. D. Lewis, J. A. Woodfolk and T. A. E. Platts-Mills (2009). "Delayed anaphylaxis, angioedema, or urticaria after consumption of red meat in patients with IgE antibodies specific for galactose- α -1,3-galactose." Journal of Allergy and Clinical Immunology **123**(2): 426-433.e422.

Cox, J. and M. Mann (2008). "MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification." Nat Biotechnol **26**(12): 1367-1372.

Diamant, B. J. and W. S. Noble (2011). "Faster SEQUEST Searching for Peptide Identification from Tandem Mass Spectra." Journal of Proteome Research **10**(9): 3871-3879.

Diesner, S. C., C. Schultz, C. Ackaert, G. J. Oostingh, A. Ondracek, C. Stremnitzer, J. Singer, D. Heiden, F. Roth-Walter, J. Fazekas, V. E. Assmann, E. Jensen-Jarolim, H. Stutz, A. Duschl and E. Untersmayr (2015). "Nitration of β -Lactoglobulin but Not of Ovomuroid Enhances Anaphylactic Responses in Food Allergic Mice." PLOS ONE **10**(5): e0126279.

Dunwell, J. M., A. Purvis and S. Khuri (2004). "Cupins: the most functionally diverse protein superfamily?" Phytochemistry **65**(1): 7-17.

Feeney, R. E., R. B. Yamasaki and K. F. Geoghegan (1982). Chemical Modification of Proteins: An Overview. Modification of Proteins, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. **198**: 3-55.

Forsström, B. (2014). Characterization of antibody specificity using peptide array technologies. PhD Doctoral, Kungliga Tekniska Högskolan, KTH.

Fujimura, Y., H. Tachibana, M. Maeda-Yamamoto, T. Miyase, M. Sano and K. Yamada (2002). "Antiallergic tea catechin, (-)-epigallocatechin-3-O-(3-O-methyl)-gallate, suppresses Fc ϵ RI expression in human basophilic KU812 cells." J Agric Food Chem **50**(20): 5729-5734.

Geyer, H., R. Kempf, H. H. Schott and R. Geyer (1990). "Glycosylation of the Envelope Glycoprotein from a Polytropic Murine Retrovirus in 2 Different Host-Cells." European Journal of Biochemistry **193**(3): 855-862.

Ghosh, K. S., B. K. Sahoo and S. Dasgupta (2008). "Spectrophotometric studies on the interaction between (-)-epigallocatechin gallate and lysozyme." Chemical Physics Letters **452**(1-3): 193-197.

Goodman, B., C. Yeretzyan, K. Stolze and D. Wen (2013). Quality aspects of coffees and teas: Application of electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy to the elucidation of free radical and other processes.

- Gudgin, E., R. Lopez-Delgado and W. R. Ware (1981). "The tryptophan fluorescence lifetime puzzle. A study of decay times in aqueous solution as a function of pH and buffer composition." Canadian Journal of Chemistry **59**(7): 1037-1044.
- Guex, N. and M. C. Peitsch (1997). "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling." Electrophoresis **18**(15): 2714-2723.
- Hamsten, C., T. A. Tran, M. Starkhammar, A. Brauner, S. P. Commins, T. A. Platts-Mills and M. van Hage (2013). "Red meat allergy in Sweden: association with tick sensitization and B-negative blood groups." J Allergy Clin Immunol **132**(6): 1431-1434.
- Hansen, T. K. and C. Bindslev-Jensen (1992). "Codfish allergy in adults. Identification and diagnosis." Allergy **47**(6): 610-617.
- Harvey, D. J. (2005). "Fragmentation of negative ions from carbohydrates: part 3. Fragmentation of hybrid and complex N-linked glycans." J Am Soc Mass Spectrom **16**(5): 647-659.
- Hilger, C., J. Fischer, K. Swiontek, F. Hentges, C. Lehnert, B. Eberlein, M. Morisset, T. Biedermann and M. Ollert (2016). "Two galactose-alpha-1,3-galactose carrying peptidases from pork kidney mediate anaphylactogenic responses in delayed meat allergy." Allergy.
- Hourihane, J. B., S. A. Kilburn, J. A. Nordlee, S. L. Hefle, S. L. Taylor and J. O. Warner (1997). "An evaluation of the sensitivity of subjects with peanut allergy to very low doses of peanut protein: a randomized, double-blind, placebo-controlled food challenge study." J Allergy Clin Immunol **100**(5): 596-600.
- Information, N. C. f. B. (2007). "PubChem." Retrieved 09/07/2019, 2019, from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Galactose-alpha-1_3-galactose#section=Structures.
- Jaisson, S., C. Pietrement and P. Gillery (2018). Chapter One - Protein Carbamylation: Chemistry, Pathophysiological Involvement, and Biomarkers. Advances in Clinical Chemistry. G. S. Makowski, Elsevier. **84**: 1-38.
- Jobstl, E., J. R. Howse, J. P. Fairclough and M. P. Williamson (2006). "Noncovalent cross-linking of casein by epigallocatechin gallate characterized by single molecule force microscopy." J Agric Food Chem **54**(12): 4077-4081.
- Johnston, L. K., K. B. Chien and P. J. Bryce (2014). "The Immunology of Food Allergy." The Journal of Immunology **192**(6): 2529-2534.
- Kagan, R. S. (2003). "Food allergy: an overview." Environmental Health Perspectives **111**(2): 223-225.
- Kalli, A., G. T. Smith, M. J. Sweredoski and S. Hess (2013). "Evaluation and Optimization of Mass Spectrometric Settings during Data-dependent Acquisition Mode: Focus on LTQ-Orbitrap Mass Analyzers." Journal of Proteome Research **12**(7): 3071-3086.

- Kaminogawa, S., Y. Kumagai, K. Yamauchi, E. Iwasaki, T. Mukoyama and M. Baba (1984). "Allergic Skin Reactivity and Chemical Properties of Allergens in Two Grades of Lactose." Journal of Food Science **49**(2): 529-530.
- Kanakis, C. D., I. Hasni, P. Bourassa, P. A. Tarantilis, M. G. Polissiou and H.-A. Tajmir-Riahi (2011). "Milk β -lactoglobulin complexes with tea polyphenols." Food Chem **127**(3): 1046-1055.
- Keppler, J., M. Stuhldreier, F. Temps and K. Schwarz (2014). "Influence of mathematical models and correction factors on binding results of polyphenols and retinol with β -lactoglobulin measured with fluorescence quenching." Food Biophysics: 1-11.
- Keppler, J. K., M. C. Stuhldreier, F. Temps and K. Schwarz (2014). "Influence of mathematical models and correction factors on binding results of polyphenols and retinol with β -lactoglobulin measured with fluorescence quenching." Food Biophysics **9**(2): 158-168.
- Kolarich, D. and F. Altmann (2000). "N-Glycan analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of electrophoretically separated nonmammalian proteins: application to peanut allergen Ara h 1 and olive pollen allergen Ole e 1." Analytical biochemistry **285**(1): 64-75.
- Koppelman, S. J., S. L. Hefle, S. L. Taylor and G. A. de Jong (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.
- Koppelman, S. J., S. L. Hefle, S. L. Taylor and G. A. H. de Jong (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." Molecular Nutrition & Food Research **54**(12): 1711-1721.
- Kukkonen, A. K., A. S. Pelkonen, S. Mäkinen-Kiljunen, H. Voutilainen and M. J. Mäkelä (2015). "Ara h 2 and Ara 6 are the best predictors of severe peanut allergy: a double-blind placebo-controlled study." Allergy **70**(10): 1239-1245.
- Kulis, M., X. Chen, J. Lew, Q. Wang, O. P. Patel, Y. Zhuang, K. S. Murray, M. W. Duncan, H. S. Porterfield, W. B. A and S. C. Dreskin (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.
- Labuckas, D. O., D. M. Maestri, M. Perello, M. L. Martinez and A. L. Lamarque (2008). "Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: Antioxidant activity and interactions with proteins." Food Chemistry **107**(2): 607-612.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lakowicz, J. R. (1999). "Principles of Fluorescence Spectroscopy." Springer: XXV, 698.

- Lakowicz, J. R., I. Gryczynski, Z. Gryczynski and J. D. Dattelbaum (1999). "Anisotropy-based sensing with reference fluorophores." *Anal Biochem* **267**(2): 397-405.
- Larsen, M. R., M. B. Trelle, T. E. Thingholm and O. N. Jensen (2006). "Analysis of posttranslational modifications of proteins by tandem mass spectrometry." *Biotechniques* **40**(6): 790-798.
- Lear, S. and S. L. Cobb (2016). "Pep-Calc.com: a set of web utilities for the calculation of peptide and peptoid properties and automatic mass spectral peak assignment." *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **30**(3): 271-277.
- Lehmann, K., S. Hoffmann, P. Neudecker, M. Suhr, W. M. Becker and P. Rosch (2003). "High-yield expression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of properly folded major peanut allergen Ara h 2." *Protein Expr Purif* **31**(2): 250-259.
- Lehmann, K., K. Schweimer, G. Reese, S. Randow, M. Suhr, W. M. Becker, S. Vieths and P. Rosch (2006). "Structure and stability of 2S albumin-type peanut allergens: implications for the severity of peanut allergic reactions." *Biochem J* **395**(3): 463-472.
- Lehrer, S. (1971). "Solute perturbation of protein fluorescence. Quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion." *Biochemistry* **10**(17): 3254-3263.
- Li, C., A. A. Nanji, A. N. Siakotos and R. C. Lin (1997). "Acetaldehyde-modified and 4-hydroxynonenal-modified proteins in the livers of rats with alcoholic liver disease." *Hepatology* **26**(3): 650-657.
- Li, J., K. Shefcheck, J. Callahan and C. Fenselau (2010). "Primary sequence and site-selective hydroxylation of prolines in isoforms of a major peanut allergen protein Ara h 2." *Protein Science* **19**(1): 174-182.
- Li, M. and A. E. Hagerman (2014). "Role of the flavan-3-ol and galloyl moieties in the interaction of (-)-epigallocatechin gallate with serum albumin." *Journal of agricultural and food chemistry* **62**(17): 3768-3775.
- Liang, L., H. A. Tajmir-Riahi and M. Subirade (2008). "Interaction of β -Lactoglobulin with Resveratrol and its Biological Implications." *Biomacromolecules* **9**(1): 50-56.
- Loza, C. and J. Brostoff (1995). "Peanut allergy." *Clinical & Experimental Allergy* **25**(6): 493-502.
- Maiti, T. K., K. S. Ghosh and S. Dasgupta (2006). "Interaction of (-)-epigallocatechin-3-gallate with human serum albumin: fluorescence, fourier transform infrared, circular dichroism, and docking studies." *Proteins* **64**(2): 355-362.
- Maleki, S. J., S. Y. Chung, E. T. Champagne and J. P. Raufman (2000). "The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins." *J Allergy Clin Immunol* **106**(4): 763-768.

- Maleki, S. J., O. Viquez, T. Jacks, H. Dodo, E. T. Champagne, S. Y. Chung and S. J. Landry (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.
- Mazzucchelli, G., T. Holzhauser, T. Cirkovic Velickovic, A. Diaz-Perales, E. Molina, P. Roncada, P. Rodrigues, K. Verhoeckx and K. Hoffmann-Sommergruber (2018). "Current (Food) Allergenic Risk Assessment: Is It Fit for Novel Foods? Status Quo and Identification of Gaps." Molecular nutrition & food research **62**(1): 1700278.
- Mercken, L., M. J. Simons, S. Swillens, M. Massaer and G. Vassart (1985). "Primary structure of bovine thyroglobulin deduced from the sequence of its 8,431-base complementary DNA." Nature **316**(6029): 647-651.
- Miles, A. J., L. Whitmore and B. A. Wallace (2005). "Spectral magnitude effects on the analyses of secondary structure from circular dichroism spectroscopic data." Protein Science **14**(2): 368-374.
- Mondoulet, L., E. Paty, M. Drumare, S. Ah-Leung, P. Scheinmann, R. Willemot, J. Wal and H. Bernard (2005). "Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(11): 4547-4553.
- Moneret-Vautrin, D. A. (1999). "Cow's milk allergy." Allerg Immunol (Paris) **31**(6): 201-210.
- Moreno, F. J. (2007). "Gastrointestinal digestion of food allergens: effect on their allergenicity." Biomed Pharmacother **61**(1): 50-60.
- Moreno, F. J., F. A. Mellon, M. S. Wickham, A. R. Bottrill and E. N. Mills (2005). "Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion." FEBS J **272**(2): 341-352.
- Mueller, G. A., R. A. Gosavi, A. Pomés, S. Wünschmann, A. F. Moon, R. E. London and L. C. Pedersen (2011). "Ara h 2: crystal structure and IgE binding distinguish two subpopulations of peanut allergic patients by epitope diversity." Allergy **66**(7): 878-885.
- Mueller, G. A., S. J. Maleki and L. C. Pedersen (2014). "The Molecular Basis of Peanut Allergy." Current Allergy and Asthma Reports **14**(5): 429.
- Ognjenovic, J., M. Stojadinovic, M. Milcic, D. Apostolovic, J. Vesic, I. Stambolic, M. Atanaskovic-Markovic, M. Simonovic and T. C. Velickovic (2014). "Interactions of epigallo-catechin 3-gallate and ovalbumin, the major allergen of egg white." Food Chem **164**: 36-43.
- Pawankar, R., C. Walter, S. T. Holgate and R. F. Lockey (2012). WAO, white book on allergy.
- Pierce, M. M., C. S. Raman and B. T. Nall (1999). "Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions." Methods **19**(2): 213-221.

- Piersma, S. R., M. Gaspari, S. L. Hefle and S. J. Koppelman (2005). "Proteolytic processing of the peanut allergen Ara h 3." Molecular Nutrition & Food Research **49**(8): 744-755.
- Plum, M., Y. Michel, K. Wallach, T. Raiber, S. Blank, F. I. Bantleon, A. Diethers, K. Greunke, I. Braren, T. Hackl, B. Meyer and E. Spillner (2011). "Close-up of the immunogenic alpha1,3-galactose epitope as defined by a monoclonal chimeric immunoglobulin E and human serum using saturation transfer difference (STD) NMR." J Biol Chem **286**(50): 43103-43111.
- Plundrich, N. J., M. Kulis, B. L. White, M. H. Grace, R. Guo, A. W. Burks, J. P. Davis and M. A. Lila (2014). "Novel strategy to create hypoallergenic peanut protein-polyphenol edible matrices for oral immunotherapy." J Agric Food Chem **62**(29): 7010-7021.
- Pomés, A., M. Chruszcz, A. Gustchina and A. Wlodawer (2015). "Interfaces Between Allergen Structure and Diagnosis: Know Your Epitopes." Current Allergy and Asthma Reports **15**(3): 8.
- Pomes, A., J. M. Davies, G. Gadermaier, C. Hilger, T. Holzhauser, J. Lidholm, A. L. Lopata, G. A. Mueller, A. Nandy, C. Radauer, S. K. Chan, U. Jappe, J. Kleine-Tebbe, W. R. Thomas, M. D. Chapman, M. van Hage, R. van Ree, S. Vieths, M. Raulf and R. E. Goodman (2018). "WHO/IUIS Allergen Nomenclature: Providing a common language." Mol Immunol **100**: 3-13.
- Poulsen, M. W., R. V. Hedegaard, J. M. Andersen, B. de Courten, S. Bugel, J. Nielsen, L. H. Skibsted and L. O. Dragsted (2013). "Advanced glycation endproducts in food and their effects on health." Food Chem Toxicol **60**: 10-37.
- Prodic, I., D. Stanic-Vucinic, D. Apostolovic, J. Mihailovic, M. Radibratovic, J. Radosavljevic, L. Burazer, M. Milcic, K. Smiljanic, M. van Hage and T. Cirkovic Velickovic (2018). "Influence of peanut matrix on stability of allergens in gastric-simulated digesta: 2S albumins are main contributors to the IgE reactivity of short digestion-resistant peptides." Clinical & Experimental Allergy **48**(6): 731-740.
- Radosavljevic, J., D. Dobrijevic, M. Jadranin, M. Blanusa, J. Vukmirica and T. Cirkovic Velickovic (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.
- Rawitch, A. B., H. G. Pollock and S. X. Yang (1993). "Thyroglobulin glycosylation: location and nature of the N-linked oligosaccharide units in bovine thyroglobulin." Arch Biochem Biophys **300**(1): 271-279.
- Rutherford, S. M. and P. J. Moughan (2012). "Available versus digestible dietary amino acids." Br J Nutr **108 Suppl 2**: S298-305.
- Salazar-Villanea, S., C. I. Butré, P. A. Wierenga, E. M. A. M. Bruininx, H. Gruppen, W. H. Hendriks and A. F. B. van der Poel (2018). "Apparent ileal digestibility of Maillard reaction products in growing pigs." PloS one **13**(7): e0199499-e0199499.

- Saleh, H., S. Embry, A. Nauli, S. Atyia and G. Krishnaswamy (2012). "Anaphylactic Reactions to Oligosaccharides in Red Meat: a Syndrome in Evolution." Clinical and Molecular Allergy **10**(1): 5.
- Satitsuksanoa, P., K. Jansen, A. Głobińska, W. van de Veen and M. Akdis (2018). "Regulatory Immune Mechanisms in Tolerance to Food Allergy." Frontiers in Immunology **9**(2939).
- Schmitt, D. A., J. B. Nesbit, B. K. Hurlburt, H. Cheng and S. J. Maleki (2010). "Processing can alter the properties of peanut extract preparations." J Agric Food Chem **58**(2): 1138-1143.
- Sen, M., R. Kopper, L. Pons, E. C. Abraham, A. W. Burks and G. A. Bannon (2002). "Protein structure plays a critical role in peanut allergen stability and may determine immunodominant IgE-binding epitopes." J Immunol **169**(2): 882-887.
- Shevchenko, A., H. Tomas, J. Havlis, J. V. Olsen and M. Mann (2006). "In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes." Nat Protoc **1**(6): 2856-2860.
- Shi, J., R. Knevel, P. Suwannalai, M. P. van der Linden, G. M. C. Janssen, P. A. van Veelen, N. E. W. Levarht, A. H. M. van der Helm-van Mil, A. Cerami, T. W. J. Huizinga, R. E. M. Toes and L. A. Trouw (2011). "Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage." Proceedings of the National Academy of Sciences **108**(42): 17372-17377.
- Shpigelman, A., Y. Cohen and Y. D. Livney (2012). "Thermally-induced beta-lactoglobulin-EGCG nanovehicles: Loading, stability, sensory and digestive-release study." Food Hydrocolloids **29**(1): 57-67.
- Silva, A. M. N., R. Vitorino, M. R. M. Domingues, C. M. Spickett and P. Domingues (2013). "Post-translational modifications and mass spectrometry detection." Free Radic Biol Med **65**: 925-941.
- Smiljanic, K., I. Prodic, D. Apostolovic, A. Cvetkovic, D. Veljovic, J. Mutic, M. van Hage, L. Burazer and T. Cirkovic Velickovic (2019). "In-depth quantitative profiling of post-translational modifications of Timothy grass pollen allergome in relation to environmental oxidative stress." Environment International **126**: 644-658.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson and D. C. Klenk (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Analytical Biochemistry **150**(1): 76-85.
- Soding, J. (2005). "Protein homology detection by HMM-HMM comparison." Bioinformatics **21**(7): 951-960.
- Soulby, A. J., J. W. Heal, M. P. Barrow, R. A. Roemer and P. B. O'Connor (2015). "Does deamidation cause protein unfolding? A top-down tandem mass spectrometry study." Protein science : a publication of the Protein Society **24**(5): 850-860.

Spiro, R. G. and V. D. Bhoyroo (1984). "Occurrence of alpha-D-galactosyl residues in the thyroglobulins from several species. Localization in the saccharide chains of the complex carbohydrate units." J Biol Chem **259**(15): 9858-9866.

Steinke, J. W., T. A. Platts-Mills and S. P. Commins (2015). "The alpha-gal story: lessons learned from connecting the dots." J Allergy Clin Immunol **135**(3): 589-596; quiz 597.

Stojadinovic, M., J. Radosavljevic, J. Ognjenovic, J. Vesic, I. Prodic, D. Stanic-Vucinic and T. Cirkovic Velickovic (2013). "Binding affinity between dietary polyphenols and beta-lactoglobulin negatively correlates with the protein susceptibility to digestion and total antioxidant activity of complexes formed." Food Chem **136**(3-4): 1263-1271.

Suhr, M., D. Wicklein, U. Lepp and W. M. Becker (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." Molecular nutrition & food research **48**(5): 390-399.

Sun, L., G. Zhu and N. J. Dovichi (2013). "Comparison of the LTQ-Orbitrap Velos and the Q-Exactive for proteomic analysis of 1-1000 ng RAW 264.7 cell lysate digests." Rapid communications in mass spectrometry : RCM **27**(1): 157-162.

Sun, N., P. Cui, D. Li, Z. Jin, S. Zhang and S. Lin (2017). "Formation of crystalline nanoparticles by iron binding to pentapeptide (Asp-His-Thr-Lys-Glu) from egg white hydrolysates." Food Funct **8**(9): 3297-3305.

Tanaka, K., K. Matsumoto, A. Akasawa, T. Nakajima, T. Nagasu, Y. Iikura and H. Saito (2002). "Pepsin-Resistant 16-kD Buckwheat Protein Is Associated with Immediate Hypersensitivity Reaction in Patients with Buckwheat Allergy." International Archives of Allergy and Immunology **129**(1): 49-56.

Tantoush, Z., D. Apostolovic, B. Kravic, I. Prodic, L. Mihajlovic, D. Stanic-Vucinic and T. Cirkovic Velickovic (2012). "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 **4**(3): 650-660.

Thall, A. and U. Galili (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.

Thomas, K., M. Aalbers, G. A. Bannon, M. Bartels, R. J. Dearman, D. J. Esdaile, T. J. Fu, C. M. Glatt, N. Hadfield, C. Hatzos, S. L. Hefle, J. R. Heylings, R. E. Goodman, B. Henry, C. Herouet, M. Holsapple, G. S. Ladics, T. D. Landry, S. C. MacIntosh, E. A. Rice, L. S. Privalle, H. Y. Steiner, R. Teshima, R. Van Ree, M. Woolhiser and J. Zawodny (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.

- Thornalley, P. J., S. Battah, N. Ahmed, N. Karachalias, S. Agalou, R. Babaei-Jadidi and A. Dawnay (2003). "Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry." Biochem J **375**(Pt 3): 581-592.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **76**(9): 4350-4354.
- Tran, N. H., R. Qiao, L. Xin, X. Chen, C. Liu, X. Zhang, B. Shan, A. Ghodsi and M. Li (2019). "Deep learning enables de novo peptide sequencing from data-independent-acquisition mass spectrometry." **16**(1): 63-66.
- Tran, N. H., M. Z. Rahman, L. He, L. Xin, B. Shan and M. Li (2016). "Complete De Novo Assembly of Monoclonal Antibody Sequences." Scientific Reports **6**: 31730.
- Untersmayr, E., L. K. Poulsen, M. H. Platzer, M. H. Pedersen, G. Boltz-Nitulescu, P. S. Skov and E. Jensen-Jarolim (2005). "The effects of gastric digestion on codfish allergenicity." J Allergy Clin Immunol **115**(2): 377-382.
- Valenta, R., H. Hochwallner, B. Linhart and S. Pahr (2015). "Food Allergies: The Basics." Gastroenterology **148**(6): 1120-1131.e1124.
- van der Zee, T., A. Dubois, M. Kerkhof, S. van der Heide and B. Vlieg-Boerstra (2011). "The eliciting dose of peanut in double-blind, placebo-controlled food challenges decreases with increasing age and specific IgE level in children and young adults." Journal of Allergy and Clinical Immunology **128**(5): 1031-1036.
- van Ree, R. (2002). "Carbohydrate epitopes and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases." Int Arch Allergy Immunol **129**(3): 189-197.
- Vereda, A., M. van Hage, S. Ahlstedt, M. D. Ibañez, J. Cuesta-Herranz, J. van Odijk, M. Wickman and H. A. Sampson (2011). "Peanut allergy: Clinical and immunologic differences among patients from 3 different geographic regions." Journal of Allergy and Clinical Immunology **127**(3): 603-607.
- Vesic, J., I. Stambolic, D. Apostolovic, M. Milcic, D. Stanic-Vucinic and T. Cirkovic Velickovic (2015). "Complexes of green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, and 2S albumins of peanut." Food Chem **185**: 309-317.
- Vita, R., S. Mahajan, J. A. Overton, S. K. Dhanda, S. Martini, J. R. Cantrell, D. K. Wheeler, A. Sette and B. Peters (2019). "The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update." Nucleic Acids Res **47**(D1): D339-d343.
- Walsh, C. T., S. Garneau-Tsodikova and G. J. Gatto Jr. (2005). "Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications." Angewandte Chemie International Edition **44**(45): 7342-7372.
- Wan, Y., J. Liu and S. Guo (2018). "Effects of succinylation on the structure and thermal aggregation of soy protein isolate." Food chemistry **245**: 542-550.

- Wang, R.-q., Y.-j. Yin, H. Li, Y. Wang, J.-J. Pu, R. Wang, H.-j. Dou, C.-j. Song and R.-y. Wang (2013). "Comparative study of the interactions between ovalbumin and three alkaloids by spectrofluorimetry." Molecular Biology Reports **40**(4): 3409-3418.
- Wang, R. Q., Y. J. Yin, H. Li, Y. Wang, J. J. Pu, R. Wang, H. J. Dou, C. J. Song and R. Y. Wang (2013). "Comparative study of the interactions between ovalbumin and three alkaloids by spectrofluorimetry." Mol Biol Rep **40**(4): 3409-3418.
- Wang, S.-H., F.-F. Liu, X.-Y. Dong and Y. Sun (2012). "Calorimetric and spectroscopic studies of the interactions between insulin and (-)-epigallocatechin-3-gallate." Biochemical Engineering Journal **62**(0): 70-78.
- Weissbach, H., L. Resnick and N. Brot (2005). "Methionine sulfoxide reductases: history and cellular role in protecting against oxidative damage." Biochim Biophys Acta **1703**(2): 203-212.
- Winogradoff, D., I. Echeverria, D. A. Potoyan and G. A. Papoian (2015). "The acetylation landscape of the H4 histone tail: disentangling the interplay between the specific and cumulative effects." Journal of the American Chemical Society **137**(19): 6245-6253.
- Wu, X., W. He, L. Yao, H. Zhang, Z. Liu, W. Wang, Y. Ye and J. Cao (2013). "Characterization of Binding Interactions of (-)-Epigallocatechin-3-gallate from Green Tea and Lipase." J Agric Food Chem **61**(37): 8829-8835.
- Xiao, H., Y. Zhang, Y. Kim, S. Kim, J. J. Kim, K. M. Kim, J. Yoshizawa, L.-Y. Fan, C.-X. Cao and D. T. W. Wong (2016). "Differential Proteomic Analysis of Human Saliva using Tandem Mass Tags Quantification for Gastric Cancer Detection." Scientific Reports **6**(1): 22165.
- Yuksel, Z., E. Avci and Y. K. Erdem (2010). "Characterization of binding interactions between green tea flavanoids and milk proteins." Food Chem **121**(2): 450-456.
- Zhang, M., W. Li and T. Li (2011). "Generation and detection of levuglandins and isolevuglandins in vitro and in vivo." Molecules (Basel, Switzerland) **16**(7): 5333-5348.
- Zhang, Y., J.-h. Zhao, X.-y. Zhang, H.-b. Guo, F. Liu and H.-l. Chen (2004). "Relations of the type and branch of surface N-glycans to cell adhesion, migration and integrin expressions." Molecular and Cellular Biochemistry **260**(1): 137-146.
- Zheng, L.-L., S. Niu, P. Hao, K. Feng, Y.-D. Cai and Y. Li (2011). "Prediction of protein modification sites of pyrrolidone carboxylic acid using mRMR feature selection and analysis." PloS one **6**(12): e28221-e28221.
- Zhou, Y., J. S. Wang, X. J. Yang, D. H. Lin, Y. F. Gao, Y. J. Su, S. Yang, Y. J. Zhang and J. J. Zheng (2013). "Peanut Allergy, Allergen Composition, and Methods of Reducing Allergenicity: A Review." Int J Food Sci **2013**: 909140.
- Zhu, A. and R. Hurst (2002). "Anti-N-glycolylneuraminic acid antibodies identified in healthy human serum." Xenotransplantation **9**(6): 376-381.

Biografija autora

Jelena Mihailović (devojačko Vesić) rođena je 16. 08. 1984. u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Osnovne i master studije je završila na Univerzitetu u Beogradu - Hemijskom fakultetu (BU-HF), smer Biohemija. Doktorske studije je upisala 2012. na programu Doktor biohemijskih nauka na BU-HF.

U aprilu 2012. angažovana je kao Stručni saradnik u laboratoriji za masenu i CD spektrometriju, od 2018. kao Samostalni stručno-tehnički saradnik za rad u laboratorijama ili centrima BU-HF. Od oktobra 2018. je angažovana na projektu MPNTR RS 172024 - Molekularne osobine i modifikacije nekih respiratornih i nutritivnih alergena (rukovodilac Prof. Dr Tanja Ćirković Veličković) kao istraživač saradnik.

Sarađivala je na projektima poput bilateralnog "Novi mehanizam egzozomalnog transfera proinflamatornog signala iz ćelija koje nose mutaciju L265P MyD88, povezanu sa limfomom" čiji su nosioci BU-HF i Kemijski institut, Ljubljana, Slovenija; multilateralnog „Genomika, transkriptomika, digestomika i mišji model senzitivacije na lipid-transfer proteine“ između Srbije, Slovačke i Austrije; i H2020 (GA No. 810752), „Twinning of research activities for the frontier research in the fields of food, nutrition and environmental ‘omics – FoodEnTwin“.

Učestvovala je u organizaciji više konferencija, radionica i škola.

Kao stipendista u okviru projekta FP7 RegPot FCUB-ERA 256716 tokom 2013. provodi mesec dana, u institutu INRA, Nant, Francuska.

Dobitnik je Basileus V stipendije u okviru Erasmus mundus 2 programa zahvaljujući kojoj 2014. provodi mesec dana u centru ZMBH, Hajdelberg, Nemačka.

Do sada, Jelena Mihailović je koautor 11 naučnih radova, publikovanih u časopisima kategorija M21a, M21 i M24, kao i 23 saopštenja prezentovanih na međunarodnim i nacionalnim naučnim skupovima.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јелена Д. Михаиловић (рођена Весић)

Број индекса ДБ 30/2012

Изјављујем

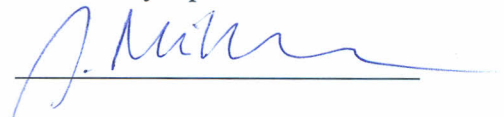
да је докторска дисертација под насловом

Протеомика посттранслационих и хемијских модификација протеина и интеракције протеина од значаја у алергији на храну

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

У Београду, 18. 11. 2019.

Потпис аутора



Изјава о коришћењу

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

Протеомика посттранслационих и хемијских модификација протеина и интеракције протеина од значаја у алергији на храну

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

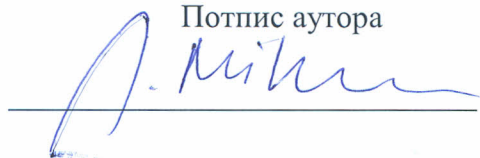
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 18.11.2019.

Потпис аутора



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 прерада.** 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 прерада.** 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.