

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Marija M. Stojadinović

**UTICAJ OBRADJE HRANE I INTERAKCIJA
KOMPONENTI MATRIKSA HRANE NA
STRUKTURU I FUNKCIJU
ALERGENA HRANE**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

BELGRADE UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY

Marija M. Stojadinović

**IMPACT OF FOOD PROCESSING AND
INTERACTIONS WITH OTHER FOOD
COMPONENTS ON THE STRUCTURE
AND FUNCTION OF FOOD ALLERGENS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

KOMISIJA ZA PREGLED, OCENU I ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE:

Mentor:

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

Članovi komisije:

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

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

dr Marina Atanasković - Marković, docent
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije: 11.10.2013.

“Sve što čovek u životu uradi sa puno ljubavi prema nečemu, ili nekome, sve je to- pesma. Zato, pesnike ne treba tražiti samo u knjigama, već svugde gde postoje tragovi da smo živeli.”

Branko Radičević

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za biohemiju Hemijskog fakulteta u Beogradu pod rukovodstvom prof. dr Tanje Ćirković Veličković. Deo eksperimenata je urađen u laboratorijama na „Karolinska Institute“ u Švedskoj u grupi prof. Marianne van Hage i „Institute for Risk Assessment Sciences“ u Holandiji u grupi prof. Raymond Pieters.

Ovom prilikom želim da se zahvalim svom mentoru, prof. dr Tanji Ćirković Veličković na ukazanom poverenju, savetima i pruženoj podršci tokom izrade doktorske disertacije. Hvala na pruženim uslovima i obezbeđenim sredstvima bez kojih ne bi bilo ove teze.

Zahvalnost dugujem i dr Dragani Stanić-Vučinić, na pomoći, sugestijama i savetima tokom izrade doktorske disertacije.

Prof. dr Mariji Gavrović-Jankulović i dr Marini Atanasković Marković se zahvaljujem na kritičkoj analizi i oceni ove teze.

Želim da se zahvalim i svim svojim prijateljima i kolegama uz koje su dugi sati u laboratoriji bili kraći. Hvala: Jelena R, Luka, Jelena V, Marija, Ana, Aleksandra, Milice, Jasna, Katarina, Jano, Anna, Jeanette, Ola, Joost, Rob i ostalima koje nisam spomenula. Posebno se zahvaljujem „mojim južnjakinjama“ Maji i Danijeli.

Beskrajnu zahvalnost dugujem majci Veri, ocu Milovanu, bratu Aleksandru i Ivanu, koji su uvek brinuli i nesebično mi pružali ljubav, podršku i razumevanje. Vi ste srž svih mojih postupaka, na vas mislim svakog dana i jako se radujem svim zajedničkim trenucima. Izvinite što me nije bilo često.

Nano, znam da si sa nama i danas, pa ovu tezu posvećujem tebi koja si za mene simbol upornosti, poštenja i pravednosti.

Marija Stojadinović

PODACI O DOKTORSKOJ DISERTACIJI

Naslov: Uticaj obrade hrane i interakcija komponenti matriksa hrane na strukturu i funkciju alergena hrane

Rezime

β -laktoglobulin (BLG) je glavni protein surutke mleka preživara, ali je prisutan i u mleku mnogih drugih vrsta sisara. Poznato je da BLG poseduje niz funkcionalnih osobina (npr. geliranje, stvaranje pene, emulzifikacija) važnih za industriju hrane kao i veliku nutritivnu vrednost zbog visokog sadržaja esencijalnih aminokiselina. Iz tog razloga se često koristi kao aditiv u prehrambenoj industriji. Međutim, BLG je jedan od glavnih alergena mleka; 45% pacijenata alergičnih na mleko reaguje na BLG. Stoga se sve više nameće potreba za razvijanje metoda za modifikaciju BLG-a u cilju smanjenja alergenosti i poboljšanja funkcionalnih osobina. Takođe, sva istraživanja u oblasti hrane ne smeju isključiti prisustvo drugih komponenti u matriksu hrane.

Predmet rada ove teze je bio ispitivanje uticaja interakcija komponenti matriksa hrane (protein-polifenolna jedinjenja) i odabranih tehnika za obradu hrane (ultrazvuk i enzimsko umrežavanje) na strukturu i funkciju BLG-a.

U okviru rada su okarakterisane nekovalentne interakcije između polifenolnih jedinjenja iz ekstrakata kafe, kakaoa, zelenog i crnog čaja i BLG-a. Pokazano je da se usled formiranja nekovalentnih interakcija između polifenolnih jedinjenja i BLG-a smanjuje digestibilnost proteina i da dolazi do maskiranja ukupnog antioksidativnog kapaciteta.

Tretiranjem BLG-a ultrazvukom visokog intenziteta generisani su stabilni modifikati sa različitim promenama u sekundarnoj i terciarnoj strukturi. Kontrolisanje temperature u toku tretmana je imalo odlučujući efekat na vrstu modifikacije. Izrazite promene u terciarnoj strukturi BLG-a su dovele do formiranja polimera, gubitka afiniteta za vezivanje retinola i brže degradacije pepsinom. Promene u sekundarnoj strukturi nisu uslovile promene u digestibilnosti i vezivanju retinola. Afinitet sonifikovanih formi za

vezivanje IgE antitela i indukciju IgE posredovane aktivacije bazofila i mastocita nije bio narušen.

BLG je kompaktni protein koji je slabo podložan enzimski katalizovanoj reakciji umrežavanja. Pospešenje reakcije umrežavanja BLG-a lakazom iz *Trametes versicolor* (fenol oksidaza) je postignuto uz prisustvo kafeinske kiseline kao pomoćne supstance i tretmana BLG-a ultrazvukom visokog intenziteta pre enzimske reakcije. Umreženi BLG (CL-BLG) je bio molekulske mase približno 50-60 MDa i fibrilarne strukture. CL-BLG je izazvao alergijski imunski odgovor kod miševa na efikasniji način od nativnog proteina. Smatramo da je to posledica preuzimanja umreženog BLG-a preko Pejerovih ploča crevnog trakta za razliku od nativnog proteina koji se transportuje kroz crevni epitel. Takođe, CL-BLG je bio preuzet i obrađen od strane dendritičnih ćelija na način koji je rezultovao većom ekspanzijom BLG specifičnih T-ćelijskih klonova i produkcijom IL-13, Th2 citokina.

Rezultati proistekli iz ove teze ukazuju da je potrebno dobro definisati uslove pri obradi hrane i ispitati uticaj svakog novog tretmana na alergenost proteina iz hrane. U našem slučaju, prisustvo polifenolnih jedinjenja i tretman ultrazvukom mogu imati uticaja na alergenost BLG-a usled promena u digestibilnosti. Međutim, najizraženije efekte na alergeni potencijal BLG-a je pokazalo enzimsko umrežavanje proteina kojim se drastično menjaju fizičko-hemijska svojstva proteina.

Ključne reči: β -laktoglobulin, alergije na hranu, obrada hrane, polifenolna jedinjenja, ultrazvuk, enzimsko umrežavanje, strukturna karakterizacija, mišji model alergije na hranu, transport u gastrointestinalnom traktu, dendritične ćelije, T-ćelije

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

UDK broj: 577.27

INFORMATION ABOUT DOCTORAL DISSERTATION

Title: Impact of food processing and interactions with other food components on the structure and function of food

Summary

β -lactoglobulin (BLG) is the major whey protein of ruminant species, but is also present in the milk of many other species. It is well known that BLG has many beneficial functional properties such as gelling, foaming and emulsifying properties. Although, BLG is considered to be a valuable protein in view of nutritional science, and is frequently used as an additive in food industry, BLG is known to be a potent allergen responsible for milk allergy; around 45% of patients allergic to milk are sensitive to BLG. Hence, it is strongly desirable to develop new methods that would decrease the allergenicity and enhance the functional properties of BLG. Also, all the research in the field of food science can not exclude the presence of other components in the food matrix.

The subject of this thesis was to examine the impact of the interactions formed between food matrix components (protein-polyphenol compounds) and selected food processing techniques (ultrasound and enzyme cross-linking) on the structure and function of BLG.

In the paper, non-covalent interactions between polyphenolic compounds from extracts of coffee, cocoa, green and black tea and BLG are characterized. It is shown that due to the formation of non-covalent interactions between polyphenolic compounds and BLG, protein digestibility is reduced and total antioxidant capacity is masked.

Treatment of BLG by high intensity ultrasound generated stable modified protein forms with marked changes in the secondary and tertiary structure. Temperature control during treatment had a determining effect on the type of modification. Striking changes in the tertiary structure of BLG led to the formation of polymers, the loss of affinity for retinol binding and degradation by pepsin. Alterations in the secondary structure did not cause

changes in digestability and retinol binding. Affinity of sonicated forms for IgE binding and induction of IgE-mediated activation of basophils and mast cells was not compromised.

BLG is a compact protein that is poorly susceptible to enzyme-catalyzed crosslinking reactions. Efficient BLG cross-linking by laccase from *Trametes versicolor* (phenol oxidase) was achieved by using caffeic acid as an auxiliary compound and treating BLG with high intensity ultrasound prior to the enzymatic reaction. Cross-linked BLG (CL-BLG) had molecular weight of approximately 50-60 MDs and fibrillar structure. CL-BLG induced allergic immune response in mice in a more efficient way than BLG. We assume that this is due to the transport of CL-BLG to Peyer's patches in contrast to the native protein which is transported through the intestinal epithelium. Also, CL-BLG was taken up and processed by dendritic cells in a manner that resulted in higher expansion of BLG-specific T-cell clones and production of IL-13, a Th2 cytokine.

These findings suggest that it is necessary to define well food processing conditions and to examine the impact of each new treatment on the allergenicity of food proteins. In our case, the presence of phenolic compounds and ultrasound treatment can influence the allergenicity of BLG due to changes in digestability. However, the most pronounced effect was shown by enzymatic cross-linking that dramatically alters the physical and chemical properties of BLG.

Key words: β -laktoglobulin, food allergy, poliphenolic compounds, ultrasound, enzymatic cross-linking, structural characterization, mouse model for food allergy, transport in gastrointestinal tract, dendritic cells, T-cells

Scientific field: Chemistry

Scientific discipline: Biochemistry

UDK number: 577.27

SPISAK SKRAĆENICA

BLG: β -laktoglobulin

CL-BLG: lakazom umreženi β -laktoglobulin, od engl. **cross-linked**

PAMP: molekularni obrasci koji su zajednički za većinu patogena, od engl. **pathogen-associated molecular patterns**

LPS: lipopolisaharid

PRR: receptor za PAMP, od engl. **pattern recognition receptor**

DĆ: dendritična ćelija

MHC: glavni kompleks tkivne podudarnosti, od engl. **major histocompatibility complex**

IL: interleukin

Ig: imunoglobulin

APĆ: antigen prezentujuća ćelija

TĆR: T-ćelijski receptor

Th- pomoćnička T-ćelija, od engl. **T helper**

NK ćelija- od engl. **natural killer**

TLR 4- tol proteinu sličan receptor 4, od engl. **Toll-like receptor 4**

GIT: gastrointestinalni trakt

nsLTP nespecifični lipid-prenosni proteina, od engl. **non specific lipid transfer protein**

BSA: goveđi serum albumin, od engl. **bovine serum albumin**

HPLC: hromatografija visokih performansi, od engl. **high performance liquid chromatography**

RP hromatografija: reverzno fazna hromatografija, od engl. **reversed phase**

ELISA: enzimom spregnut imunovezujući test, od engl. **enzyme linked immuno-sorbent assay**

IEF: izoelektrično fokusiranje

ALA: α -laktalbumin

CD: cirkularni dihidroizam

TG: transglutaminaza iz *Streptovercillium mobaraense*

Lacc: lakaza iz *Trametes hirsuta*, od engl. **laccase**

Aga Tyr: tirozinaza iz *Agaricus bisporous*, od engl. **tyrosinase**

TrTyr: tirozinaza iz *Trichoderma reesei*, od engl. **tyrosinase**

CBB: Coomassie **B**rilliant **B**lue R-250

SDS-PAG elektroforeza/ SDS-PAGE: Natijum-dodecil sulfat poliakrilamidna gel elektroforeza, od engl. sodium **d**odecyl sulfat **p**olyacrylamide **g**el **e**lectrophoresis

ESI-MS: Elektron-sprej **j**onizaciona **m**asena spektrometrija

OVA: ovalbumin

TBS (TTBS): 30 mM Tris (2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol) sa 9 g/l NaCl (+detergent Tween 20)

LC-MS: tečno masena spektrometrija, od engl. **l**iquid **c**hromatography- **m**ass **s**pectrometry

PE: polifenolni ekstrakt

ZČ: zeleni čaj

CČ: crni čaj

KF: kafa

KK: kakao

EGCG: epigalokatehin-3-galat, od engl. **e**pigallocatechin **g**allate

PBS: fiziološki rastvor puferisan fosfatom pH 7.2, od engl. **p**hosphate **b**uffered **s**aline

FITC: fluorescein izotiocijanat

DTT: ditiotreitol

mMCP-1: od engl. **m**ouse **m**ast **c**ell **p**rotease-1

CPM: od engl. **c**ounts **p**er **m**inute

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Ciljevi rada	2
1.2. Publikacije proistekle iz teze	3
2. OPŠTI DEO.....	4
2.1. Imunski sistem.....	4
2.1.1. Čelije imunskog sistema.....	6
2.2. Molekuli glavnog kompleksa tkivne podudarnosti, MHC	11
2.2.1. Molekuli I klase MHC.....	11
2.2.2. Molekuli II klase MHC	12
2.3. Alergije.....	14
2.3.1. Mehanizmi alergijskih reakcija	16
2.4. Alergije na hranu	18
2.4.1. Uspostavljanje oralne tolerancije u gastrointestinalnom traktu.....	19
2.4.2. Alergeni hrane	21
2.5. Alergeni mleka	26
2.5.1. Struktura i funkcija β -laktoglobulina	27
2.5.2. Modifikacije β -laktoglobulina.....	29
2.6. Nove tehnike za obradu hrane	31
2.6.1. Ultrazvuk.....	31
2.6.2. Umrežavanje proteina hrane.....	33
3. IZOLOVANJE I PREČIŠĆAVANJE NATIVNOG β -LAKTOGLOBULINA	38
3.1. Rezultati	39
3.1.1. Analiza elucionog profila jonoizmenjivačke hromatografije	39
3.1.2. Analiza prečišćenog BLG-a i poređenje sa standardom.....	39
3.2. Diskusija.....	45
3.3. Materijal i metode	47
3.3.1. Jonoizmenjivačka hromatografija i elektroforetska analiza frakcija.....	47
3.3.2. Određivanje čistoće, potvrda mase i karakterizacija stukture BLG-a	49

3.3.3.	Imunohemijska karakterizacija BLG-a.....	52
4.	INTERAKCIJE IZMEĐU POLIFENOLNIH JEDINJENJA I β -LAKTOGLOBULINA	54
4.1.	Rezultati	55
4.1.1.	Sastav polifenolnih ekstrakata često konzumiranih napitaka: zelenog i crnog čaja, kafe i kakao.....	55
4.1.2.	Analiza interakcija između polifenola i BLG-a.....	56
4.1.3.	Uticaj vezivanja polifenola na sekundarnu strukturu BLG-a	60
4.1.4.	Promene u digestibilnosti BLG-a usled vezivanja polifenola	62
4.1.5.	Maskiranje ukupnog antioksidativnog kapaciteta formiranjem kompleksa BLG-polifenoli.....	64
4.2.	Diskusija.....	65
4.3.	Materijal i metode	67
4.3.1.	Priprema i karakterizacija polifenolnih ekstrakata	67
4.3.2.	Karakterizacija polifenol-protein interakcija fluorescentnom i CD spektroskopijom... ..	68
4.3.3.	Testovi digestibilnosti i precipitacije proteina	70
4.3.4.	Određivanje totalnog antioksidativnog kapaciteta	71
5.	MODIFIKACIJE β -LAKTOGLOBULINA ULTRAZVUKOM VISOKOG INTENZITETA.....	73
5.1.	Rezultati	74
5.1.1.	Sonifikacijom uzrokovana polimerizacija BLG-a.....	74
5.1.2.	Promene u sekundarnoj i tercijarnoj strukturi sonifikovanih formi BLG-a	75
5.1.3.	Spektrofluorimetrijska analiza strukture sonifikovanih formi i afiniteta za vezivanje retinola.....	77
5.1.4.	Uticaj strukturnih promena izazvanih sonifikacijom na digestibilnost BLG-a	78
5.1.5.	Procena stabilnosti promena u strukturi proteina	79
5.1.6.	Uticaj sonifikacije na očuvanost IgE vezujućih epitopa.....	81
5.2.	Diskusija.....	84
5.3.	Materijal i metode	86
5.3.1.	Tretman ultrazvukom	86
5.3.2.	Metode za karakterizaciju strukture sonifikovanih formi BLG-a	86
5.3.3.	<i>In vitro</i> enzimski testovi	88

5.3.4.	Testovi za procenu alergenosti sonifikovanih formi BLG-a	89
6.	ISPITIVANJE ALERGENOSTI I IMUNOGENOSTI ENZIMSKI UMREŽENOG β -LAKTOGLOBULINA	93
6.1.	Rezultati	94
6.1.1.	Karakterizacija umreženog β -laktoglobulina (CL-BLG)	94
6.1.2.	Ispitivanje alergenosti BLG i CL-BLG-a u mišjem modelu alergije na hranu.....	95
6.1.3.	Transport i proteoliza BLG i CL-BLG-a u uslovima gastrointestinalnog trakta.....	98
6.1.4.	Ispitivanje interakcija BLG ili CL-BLG aktiviranih dendritičnih ćelija i BLG-specifičnih T-ćelija	100
6.1.5.	Preuzimanje BLG i CL-BLG-a od strane dendritičnih ćelija	102
6.1.6.	<i>In vitro</i> endolizozomalna degradacija BLG i CL-BLG-a.....	102
6.2.	Diskusija.....	106
6.3.	Materijal i metode	109
6.3.1.	Priprema i karakterizacija proteinskih uzoraka	109
6.3.2.	Eksperiment senzitivizacije miševa.....	111
6.3.3.	Mešana kultura dendritičnih ćelija i T-ćelija.....	114
6.3.4.	Praćenje transporta proteina u uslovima GIT-u.....	116
6.3.5.	<i>In vitro</i> test dvofazne digestije	118
6.3.6.	Preuzimanje i obrada proteina od strane dendritičnih ćelija.....	119
7.	ZAKLJUČCI.....	121
8.	LITERATURA.....	124
9.	PRILOZI.....	148

1. UVOD

Do neželjenog odgovora organizma na neku, inače bezopasnu, hranu dolazi usled intolerancije hrane ili alergije na hranu. Do intolerancije ili nepodnošenja hrane dolazi usled prisustva nekih toksičnih (npr. bakterijski toksini) ili farmakološki aktivnih supstanci (npr. kofein) u hrani ili usled nekih metaboličkih ili fizioloških poremećaja organizma (npr. intolerancija laktoze). Alergije na hranu se često poistovećuju sa intolerancijom, ali se one suštinski razlikuju. Kod osoba alergičnih na hranu dolazi do aberantnog imunskog odgovora organizma na alergene hrane (najčešće proteine). Alergije na hranu su u sve većem porastu i u industrijalizovanim zemljama pogađaju 4-8% dečje populacije i 1-2% odraslih.

Sve intenzivnije korišćenje industrijskih prehrambenih proizvoda uslovalo je razvoj novih metoda za obradu prehrambenih proizvoda i obogaćivanje hrane. U odnosu na hemijske metode, u industriji hrane prednost imaju fizičke (ultrazvuk), a naročito enzimske (fenol oksidaze) metode koje koriste komponente iz prirodnih izvora kao što je sama hrana. Obogaćivanje hrane fenolnim ekstraktima biljaka, zarad dobijanja hrane sa poboljšanim uticajem po zdravlje, je aktuelno u svetu. Međutim, kako su postali česti slučajevi pojave alergijskih reakcija na obrađenu a ne na sirovu hranu, postavilo se pitanje bezbednosti metoda za obradu hrane. Svaki tretman hrane može da dovede do destrukcije epitopa alergena hrane ili kreiranja novih, što za posledicu ima generisanje hipoalergena i neoalergena. Do sada je malo pažnje posvećeno ispitivanju uticaja interakcija komponenti kompleksnih matriksa hrane na svojstva istih.

Proteini surutke se koriste kao funkcionalni sastojci u mnoštvu prehrambenih proizvoda zbog svojih korisnih tehno-funkcionalnih i nutritivnih osobina. β -laktoglobulin je dominantan protein surutke, ali je istovremeno i jedan od dva glavna alergena mleka. Postavlja se pitanje kako modifikovati protein tako da se pospeše ili ostanu neizmenjene njegove osobine bitne za industriju, a da se istovremeno smanji njegova alergenost.

1.1. Ciljevi rada

U okviru ove teze formulirano je nekoliko ciljeva:

- 1) Izolovanje i karakterizacija β -laktoglobulina (BLG) iz sirovog mleka.
- 2) Strukturna karakterizacija interakcija između BLG-a i polifenolnih jedinjenja izolovanih iz široko zastupljenih napitaka: zelenog i crnog čaja, kafe i kakaoa. Ispitivanje efekata BLG-polifenol interakcija na digestibilnost proteina pepsinom u simuliranim uslovima želudačnog soka i ukupnu antioksidativnu moć.
- 3) Optimizacija ultrazvučnih tretmana u cilju dobijanja različitih sonifikovanih formi BLG-a. Karakterizacija strukture, afiniteta za vezivanje prirodnog liganda retinola i stabilnosti strukturnih promena selektovanih sonifikovanih oblika BLG-a. Ispitivanje digestibilnosti dobijenih sonifikovanih oblika BLG-a *in vitro* pepsinom u simuliranim uslovima želudačnog soka i ispitivanje njihovog afiniteta za vezivanje IgE antitela iz seruma pacijenata alergičnih na mleko. Ispitivanje alergeno potencijala *ex vivo* aktivacijom bazofila alergičnih pacijenta i *in vivo* u kožnim probama.
- 4) Optimizacija protokola za dobijanje enzimski modifikovanog BLG-a unakrsnim povezivanjem pod dejstvom lakaze uz prisustvo kafeinske kiseline kao fenolnog medijatora. Karakterizacija enzimski modifikovanog BLG-a (molekulska masa, struktura). Ispitivanje alergnosti i imunogenosti enzimski modifikovanog BLG-a *in vivo* u mišjem modelu alergije na hranu i *ex vivo* u kulturi ćelija slezine miševa. *In vitro* ispitivanje interakcija između CD⁴⁺ T-ćelija izolovanih iz miševa imunizovanih BLG-om i dendritičnih ćelija stimulisanih nativnim ili enzimski modifikovanim BLG-om. Praćenje transporta nativnog i enzimski modifikovanog BLG-a *in vitro* kroz monosloj Caco-2 ćelija i *in vivo* u miševima. Ispitivanje digestibilnosti *in vitro* u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta (želuca i

tankog creva). Preuzimanje i endocitoza nativnog i enzimski modifikovanog BLG-a od strane mišjih dendritičnih ćelija. *In vitro* endolizozomalna degradacija.

1.2. Publikacije proistekle iz teze

- 1) Stojadinovic, Marija; Burazer, Lidija; Ercili-Cura, Dilek; Sancho, Ana; Buchert, Johana; Cirkovic Velickovic, Tanja, Stanic-Vucinic, Dragana. **One-step method for isolation and purification of native β -lactoglobulin from bovine whey.** Journal of the Science of Food and Agriculture 2012, 92 (7), 1432-1440. (M21)
- 2) Stanic-Vucinic, Dragana*; Stojadinovic, Marija*; Atanaskovic-Markovic, Marina; Ognjenovic, Jana; Grönlund, Hans; van Hage, Marianne; Lantto, Raija; Sancho, I. Ana; Cirkovic Velickovic, Tanja. **Structural changes and allergenic properties of β -lactoglobulin upon exposure to high-intensity ultrasound.** Molecular Nutrition & Food Research 2012, 56 (12): 1894-1905. (M21) *equally contributing
- 3) Stojadinovic, Marija; Radosavljevic, Jelena; Ognjenovic, Jana; Vesic, Jelena; Prodic, Ivana; Stanic-Vucinic, Dragana; Cirkovic Velickovic, Tanja. **Binding affinity between dietary polyphenols and β -lactoglobulin negatively correlates with the protein susceptibility to digestion and total antioxidant activity of complexes formed.** Food Chemistry 2013, 136 (3–4), 1263-1271. (M21)
- 4) Stojadinovic, Marija; Pieters, Raymond; Smit, Joost*; Cirkovic Velickovic, Tanja*. **Laccase catalyzed cross-linking of β -lactoglobulin enhances allergenicity through changes in cellular uptake and processing.** *Manuscript*. *cosenior authors

2. OPŠTI DEO

2.1. Imunski sistem

„Iako pokušavamo da živimo u čistim sredinama, činjenica je da životni prostor delimo sa mnogim mikroorganizmima. Kada biste imali prilike da mikroskopom pregledate sobu u kojoj sedite, trenutno biste videli milione organizama sa kojima živite. U toj situaciji, celokupni organizam pojedinca liči na „zamak pod opsadom“. Nije potrebno reći da takav zamak, koji je okružen bezbrojnim neprijateljima, mora da bude zaštićen u potpunosti i na organizovan način. Ljudi su stvoreni sa tom savršenom zaštitom koja im je neophodna, i prema tome, nisu u potpunosti беспомоćни protiv tih neprijatelja. Ti „mikro“ čuvari u našem telu nikada nas ne ostavljaju i bore se za nas na mnogim frontovima“ (Yahya, 2003).

Imunski sistem predstavlja odbrambeni sistem našeg organizma bez koga ne bismo mogli da se izborimo sa nadirajućim patogenima kojima smo neprestano izloženi. Kroz istoriju, imunski sistem se usložnjavao i razvijao, i čak više puta sretao sa velikim evolutivnim pritisicima, poput epidemije kuge u Ateni (430 godina p.n.e.). Tukidid je tada zabeležio da pojedinci koji su jednom pobedili bolest nisu razvijali simptome bolesti pri narednim susretima sa obolelima. Njegovi zapisi ujedno predstavljaju i najstariji dokumentovani spomen o pojavi optornosti organizma na neku bolest tj. imunosti (od lat. *immunitas*- oslobođen od službe, poreza) (Retief i Cilliers, 1998). Imunski sistem predstavlja kompleksnu i dinamičku mrežu interakcija između ćelija i molekula, koji deluju kolektivno i koordinisano u odgovoru na spustance i organizme strane našem organizmu. Komponente ovog sistema se obično dele na dve grane: urođeni ili nespecifični i stečeni ili specifični imunitet (Murphy, 2012).

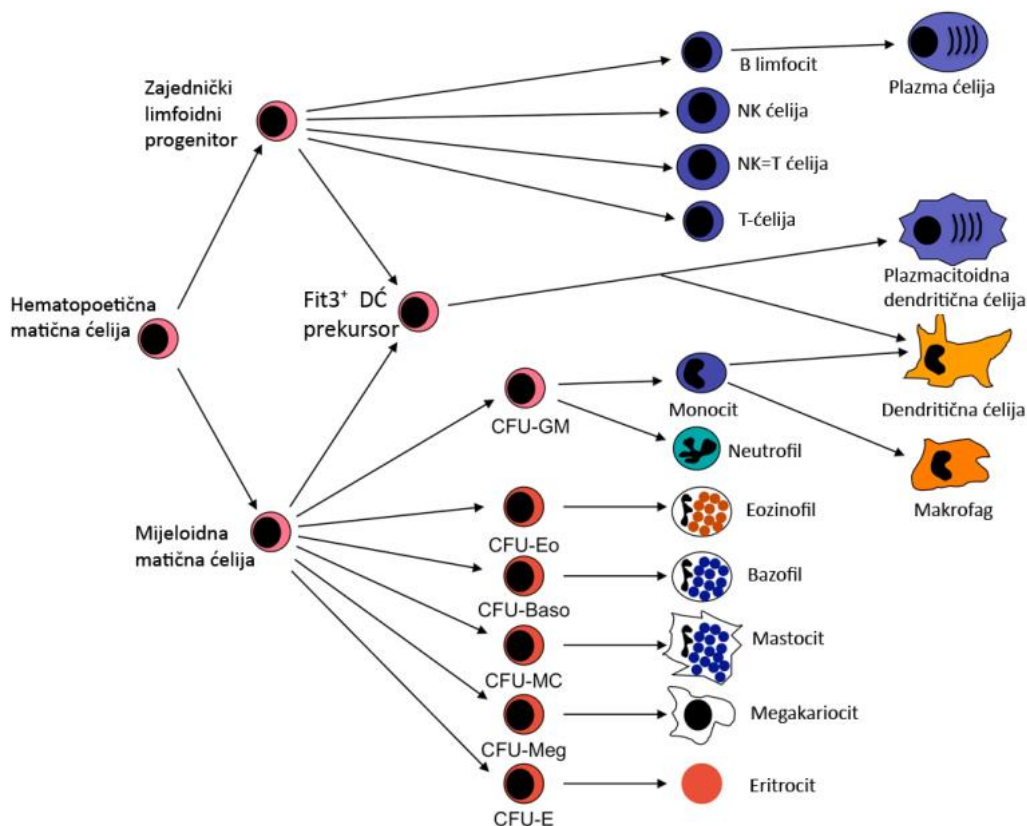
Urođeni imunski odgovor predstavlja prvu liniju odbrane organizma. Njegove komponente, koje čine prvu fizičku i funkcionalnu barijeru za patogene, su epitel kože, gastrointestinalnog i respiratornog trakta. Ukoliko se desi da patogeni prođu kroz epitel i

prodru u tkiva i cirkulaciju, ćelije urođenog imuniteta odmah reaguju i u najvećem broju slučajeva eliminisu uzrok infekcije. Ovaj odgovor je brz i nespecifičan, i bazira se na prepoznavanju molekularnih obrazaca koji su zajednički za većinu patogena (PAMP, od engl. **pathogen-associated molecular pattern**), poput lipopolisaharida (LPS) i peptidoglikana koji se nalaze na površini gram negativnih bakterija, ili dvolančane ribonukleinske kiseline iz virusa. PAMP se vezuju za specijalne receptore na površini ćelija imunskog sistema (PRR, od engl. **pattern recognition receptor**), i time aktiviraju urođeni imunski odgovor u kome glavnu ćelijsku ulogu igraju neutrofil, makrofagi, dendritične i NK ćelije (od engl. **natural killer**). Osim borbe protiv infekcija, urođeni imunski odgovor stimuliše stečenu imunost tako što putem dendritičnih ćelija obezbeđuje signale koji su ključni za započinjanje odgovora antigen-specifičnih T- i B-ćelija (Banchereau i Steinman, 1998).

Stečeni imunitet se razvija u kontaktu sa uzročnicima bolesti koje ćelije urođenog imunskog sistema ne mogu da uklone, ne postoji pre prvog kontakta i potrebni su dani, nedelje, meseci da bi se razvio. Iako je dosta sporiji, stečeni imunski odgovor je izuzetno specifičan i efikasan. Za razliku od PRR-a, receptori na T- i B-limfocitima su jedinstveni za svaku ćeliju i pokazuju različitu specifičnost. Odmah nakon vezivanja za specifični antigen, T- i B-ćelije se dele i stvara se ćelijska armija sastavljena od velikog broja ćelijskih klonova sa istom specifičnošću ka patogenu kao i ćelija roditelj. Proizvodnja dovoljnog broja klonova traje približno nedelju dana. Nakon aktivacije i proliferacije, B-ćelije će početi da prave specifična antitela naspram antigena, a T-ćelije će izvršavati svoje efektorske funkcije koje uključuju eliminaciju patogena, usmeravanje i regulisanje imunskog odgovora. Bitna odlika stečenog imunskog sistema je produkcija memorijskih T- i B-ćelija, koje godinama nakon inicijalne infekcije cirkulišu našim sistemom spremne da iniciraju adekvatan imunski odgovor na patogen pri svakoj ponovnoj infekciji istim. Rekrutovanje ćelija imunskog sistema će u ovom slučaju trajati samo nekoliko dana. Memorijske ćelije nam pružaju dugogodišnju zaštitu od mnogih patogena i omogućavaju imunost u pravom značenju te reči (Murphy, 2012).

2.1.1. Čelije imunskog sistema

Kako je imunski sistem veoma kompleksan i u određenim situacijama uključuje udruženu reakciju velikog broja ćelija i tkiva, u ovom odeljku će biti opisane samo ćelije relevantne za ovu doktorsku disertaciju.



Slika 2.1. Dijagram koji pokazuje razvoj različitih ćelija imunskog sistema iz matičnih hematopoetinih ćelija u zrele ćelije. Preuzeto i modificovano iz (Chaplin, 2010).

2.1.1.1. Monociti

Monociti su velike ćelije, prečnika 15-18 μm , jedro im je bubrežastog oblika i nije segmentirano (mononukleusne ćelije), stvaraju se u koštanoj srži. U normalnom,

neinflamatornom stanju, monociti putem krvi dospevaju u sve delove organizma, gde napuštaju krvotok, odlaze u tkiva i transformišu se u makrofage i nezrele dendritične ćelije, održavajući njihov broj konstantnim. Monociti čine 5-8% leukocita u perifernoj krvi, poseduju umerenu fagocitoznu sposobnost, a na svojoj površini ekspimiraju pored ostalih i receptore za hemokine i PRR-ove. Ukoliko dođe do inflamacije, monociti se brzo grupišu oko mesta inflamacije (8-12h), preuzimaju patogene ili toksične supstance, luče inflamatorne citokine, dele se i diferenciraju u efikasnije makrofage i dendritične ćelije. (Geissmann, 2010).

Do sada su opisane tri podgrupe humanih monocita, koje se na osnovu stepena ekspresije CD14 i CD16 molekula klasifikuju na: $CD14^{++}CD16^{-}$ ili klasične monocite, $CD14^{+}CD16^{++}$ ili neklasične monocite i $CD14^{++}CD16^{+}$ ili prelazne monocite. Monociti koji na svojoj površini ekspimiraju veliki broj CD14 molekula ($CD14^{++}$) čine oko 90% monocita u perifernoj krvi dok monociti koji ekspimiraju CD14 i CD16 čine svega 8% (Ziegler-Heitbrock, 1993).

2.1.1.2. Dendritične ćelije

Dendritične ćelije (DĆ) su najvažnije antigen-prezentujuće ćelije sa jedinstvenom sposobnošću stimulacije proliferacije antigen-specifičnih naivnih T-limfocita. Osim toga, DĆ-e indukuju polarizaciju efektorskih funkcija posredovanih pomoćničkim T-ćelijama, regulišu imunski odgovor i stimulišu B-ćelije, NK-ćelije i druge imunske ćelije. Identifikovane su dve različite razvojne linije DĆ-a: DĆ-e mijeloidnog i limfoidnog porekla. Mijeloidne DĆ-e su najzastupljenije i potiču od zajedničkog mijeloidnog progenitora u kostnoj srži i od monocita periferne krv. Nakon migracije u periferna tkiva ove ćelije se transformišu u epidermalne DĆ-e (Langerhansove ćelije) ili dermalne, intersticijalne DĆ-e koje su funkcionalno nezrele. Plazmacitoidne DĆ-e, koje su predominantni tip limfoidnih DĆ-a, i koje su lokalizovane uglavnom u limfoidnim organima, su ključne ćelije koje produkuju interferone tipa I u odgovoru na virusne infekcije. Nakon kontakta sa patogenima ili stranim supstancama, nezrele mijeloidne DĆ-e preuzimaju i obrađuju antigene, migriraju u regionalna limfoidna tkiva gde postaju zrele i

sposobne da aktiviraju T-ćelije. U toku sazrevanja, DĆ-e menjaju svoj fenotip, smanjuje im se moć fagocitoze, a na površini se eksprimira veliki broj MHC II (od engl. **m**ajor **h**istocompatibility complex) i kostimulatornih molekula poput CD40, CD80, CD86 i CD83. Pored uloge aktivatora T-ćelija, DĆ-e su uključene u održavanje tolerancije na sopstvene antigene mehanizmima klonalne delecije autoreaktivnih T-ćelija, indukcijom funkcionalne anergije T-ćelija ili indukcijom stvaranja regulatornih T-ćelija (Banchereau i Steinman, 1998).

2.1.1.3. T-ćelije

T-ćelije su limfociti koji su dobili naziv po mestu sazrevanja- timusu. Progenitorne ćelije migriraju iz koštane srži u timus gde se diferenciraju u naivne T-ćelije. U toku diferencijacije tj.sazrevanja, dolazi do rearanžmana T-ćelijskog receptora (TĆR), čime se povećava panel njegove specifičnosti i ćelije počinju da ekspimiraju CD4 i CD8 koreceptore TĆR-a, koji će kasnije odrediti njihov T-ćelijski profil. Takođe, vrši se selekcija T-ćelija na osnovu afiniteta njihovih TĆR-a za komplekse MHC molekula i peptida sopstvenih antigena. T-ćelije koje se ne vezuju i one sa visokim afinitetom se uklanjaju, a preživljavaju T-ćelije sa niskim afinitetom. U toku selekcije ćelije prestaju da ekspimiraju oba koreceptora i tako nastaju CD4⁺ pomoćničke T-ćelije, uključujući i regulatorne T-ćelije, koje prepoznaju peptide u skopu MHC II kompleksa, ili CD8⁺ citotoksične T-ćelije koje prepoznaju peptide u skopu MHC I kompleksa (Abbas i Lichtman, 2008).

2.1.1.3.1 Pomoćničke T-ćelije, Th

Dve dominantne subpopulacije pomoćničkih T-ćelija, Th1 i Th2 (Th, od engl. **T** helper), su opisane u literaturi pre oko 20 godina (Parronchi, 1991). U poslednjih 8 godina otkrivene su i druge subpopulacije Th ćelija koje su dobile naziv po citokinima koje većinski luče a to su Th17, Th22, Th9 (Chang, 2010; Harrington, 2005). Bitno je napomenuti da

podklase Th ćelija nisu formirane primarno na osnovu njihovog citokinskog profila već na osnovu ekspresije njima specifičnih transkripcionih faktora.

Glavni citokin koji Th1 ćelije proizvode je IFN- γ dok IL-4, IL-5, IL-13 sekretuju Th2 ćelije. Th1 i Th2 ćelije potiču od zajedničkih prekursorskih ćelija, tzv. Thp ćelija koje nisu bile u kontaktu sa antigenom. Nakon izlaganja Thp ćelija antigenu, one se aktiviraju, ekspimiraju IL-2 i receptor za IL-2, dele i diferenciraju u prelazne Th0 ćelije koje sekretuju IL-2, IL-4, INF- γ i IL-13 (Kourilsky i Truffa-Bachi, 2001). Th1 ćelije nastaju iz Th0 ćelija pod dejstvom IL-12 koji stimulise ekspresiju transkripcionog faktora T-bet, pod čijom je kontrolom ekspresija INF- γ (Smits, 2001). Sa druge strane, pod dejstvom IL-4 podstiče se ekspresija transkripcionog faktora GATA-3 u Th0-ćelijama, koji dalje podstiče sekreciju Th2 citokina i diferencijaciju Th2 ćelija (Seki, 2004). Bitno je napomenuti da Th1 i Th2 ćelije međusobno ispoljavaju inhibitorni efekat (Mosmann i Coffman, 1989; O'Garra i Murphy, 1994).

Th1 ćelije, tj INF- γ koga luče, stimulišu aktivnost makrofaga, produkciju izotipova antitela koji pospešuju fagocitozu mikroorganizama tako što se vezuju za Fc receptore na makrofagima, ili aktiviraju kompliment čiji se produkti aktivacije zatim vezuju za receptore za komplemet na makrofagima. Ova subpopulacija T-ćelija predstavlja ključnu komponentu u reakcijama celularnog imuniteta koje su važne za odbranu od intracelularnih infektivnih uzročnika. Th2 ćelije proizvode IL-4 koji stimulise produkciju IgE antitela koja se vezuju za receptore na mastocitima i eozinofilima, IL-5 koji aktivira eozinofile, IL-13 koji zajedno sa IL-4 podstiče izbacivanje parazita iz mukoznih organa. Reakcije posredovane mastocitima, eozinofilima i IgE antitelima odgovorne su za eradikaciju helminata i drugih ekstracelularnih parazita. Takođe, Th2 ćelije imaju važnu regulatornu ulogu u imunološkom sistemu, jer prelazak sa Th1 na Th2 odgovor obezbeđuje zaštitni efekat kada intenzitet i hroničnost inflamatornog Th1 odgovora može da dovede do oštećenja tkiva domaćina. Iako oba tipa Th odgovora ispoljavaju zaštitni efekat protiv određenih infektivnih uzročnika, oni mogu biti i patogeni: Th1 odgovor može imati ulogu u autoimunim bolestima, dok je poremećaj regulacije Th2 odgovora prisutan u različitim atopijskim bolestima (Romagnani, 2000).

2.1.1.4. B-ćelije

B-ćelije čine oko 15% limfocita u perifernoj krvi, sazrevaju u koštanoj srži od matičnih ćelija, a pod uticajem IL-7 koga luče stromalne ćelije. Njihova glavna funkcija je proizvodnja antitela kao odgovor na antigene, što ih čini medijatorima humoralne imunosti. Na svojoj površini B-ćelije eksprimiraju membransku formu antitela i to IgM ili IgD, koji služe kao receptori za prepoznavanje antigena i sledbenu aktivaciju. Svaka B-ćelija ima različitu specifičnost i produkuje jednu vrstu antitela koja je po specifičnosti jednaka onoj membranski vezanog imunoglobulina (Ig). Ukoliko su dva ili više antigenskih molekula udružena u agregat, ili ima ponovljenih epitopa na antigenskom molekulu (multivalentni antigeni poput polisaharida), dolazi do vezivanja antigena za međusobno bliske Ig na membrani što za posledicu ima aktivaciju B-ćelija. Sa druge strane, većina solubilnih proteina aktivira B-ćelije uz pomoć Th ćelija jer ne mogu unakrsno da umreže veći broj receptora. Nakon aktivacije, nastupa klonska ekspanzija B-ćelija, kao i njihova diferencijacija u ćelije koje sekretuju antitela tj. plazma ćelije. Diferencijacija ćelija je praćena promenom klase antitela u više specijalizovane izotipove kao što su IgG i IgE i sazrevanjem afiniteta antitela. Neke od visokoafinitetnih B-ćelija ne luče aktivno antitela, već postaju memorijske ćelije koje su spremne da brzo odgovore ako se antigen ponovo nađe u organizmu (Chaplin, 2010; Murphy, 2012).

2.1.1.5. Mastociti i bazofili

Mastociti i bazofili su efektorske ćelije imunskog sistema i učestvuju u reakcijama rane preosetljivosti. Mastociti se nalaze u tkivima, a bazofili cirkulišu krvotokom. Mastociti ovalne ćelije sa ovalnim nukleusom prečnika do 20 μm dok su bazofili manji, prečnika od 5 do 8 μm , ovalnog oblika sa potkovičastim nukleusom. U citoplazmi bazofila ima manje granula nego u citoplazmi mastocita, ali su one veće po veličini. Ove ćelije na svojoj membrani eksprimiraju Fc receptore (Fc ϵ RI) visokog afiniteta za ϵ -teški lanac IgE antitela koja nastaju u odgovoru na antigen. Nakon vezivanja IgE za Fc ϵ RI, mastociti i bazofili bivaju „senzitivisani“, i pri sledećem susretu sa alergenom, aktiviraju se i sekretuju sadržaj

svojih granula, sintetišu i sekretuju lipidine medijatore i citokine koji su odgovorni za akutnu reakciju krvnih sudova, glatke muskulature i zapaljenje što su glavna obeležja rane preosetljivosti (Stone, 2010).

2.2. Molekuli glavnog kompleksa tkivne podudarnosti, MHC

Produkti glavnog kompleksa gena tkivne podudarnosti (MHC, od engl. **m**ajor **h**istocompatibility complex) uslovljavaju formiranje repertoara T-ćelija, i omogućavaju T-ćelijama prepoznavanje antigena i sledstvenu aktivaciju. Osnovne karakteristike ovog genskog kompleksa su poligenost (sadrži preko dvesta gena), polimorfizam (geni u vrsti postoje u više alternativnih oblika- alela) i kodominantna ekspresija (ekspimirana su oba roditeljska alela svakog MHC gena). Ovaj kompleks kod čoveka se označava kao HLA, kao skraćenica za humane leukocitne antigene. Geni ovog kompleksa kao i njima kodirani produkti podeljeni su u tri klase. Najbolje su proučeni membranski molekuli koji su omogućili otkriće celog sistema, a koji su kodirani genima I i II klase MHC. Geni I klase MHC kodiraju polimorfne membranske glikoproteine koji prezentuju strane i sopstvene peptide CD8⁺ T-ćelijama, dok produkti gena II klase kao membranski molekuli prezentuju peptide CD4⁺ T-ćelijama (Abbas i Lichtman, 2008).

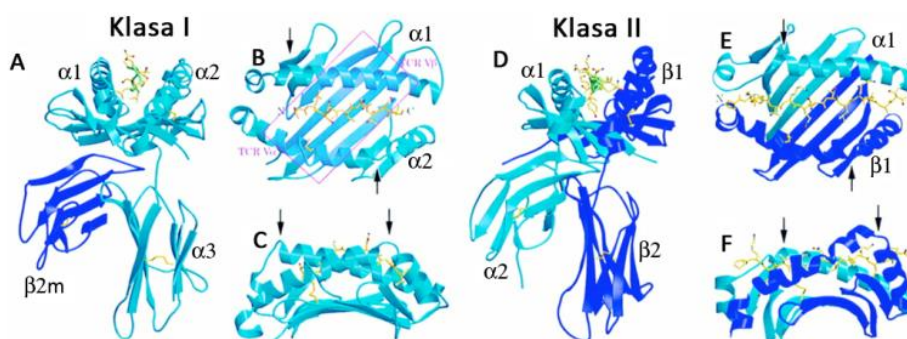
2.2.1. Molekuli I klase MHC

Molekuli I klase MHC ispoljeni su na svim somatskim ćelijama sa jedrom, ali nivo ekspresije može značajno varirati od tkiva do tkiva. Zreli MHC I molekuli na površini ćelije sastoji se od tri nekovalentno združene komponente: teškog lanca, β2 mikroglobulina i kratkog antigenskog peptida (Slika 2.2). Polimorfni, teški ili α lanac, je glikoprotein molekulske mase od 44 kDa i njega kodira odgovarajući MHC gen na 6. hromozomu kod ljudi. Drugi lanac čini protein molekulske mase 12 kDa, označen kao β2 mikroglobulin. On je kodiran nepolimorfnim genom koji ne pripada MHC grupi. Ekstracelularni region se može podeliti u tri domena od po 90 aminokiselina koji su označeni kao α1, α2 i α3, gde prva dva prave udubljenje u kome se nalazi strani ili sopstveni antigeni peptid, najčešće od

8 do 10 ili 11 aminokiselina, u izduženoj konformaciji. Peptid predstavlja integralni deo proteinskog kompleksa I klase, pošto su "prazni" molekuli I klase MHC nestabilni. Polimorfizam molekula I klase odnosi se pre svega na raspored aminokiselina u $\alpha 1$ i $\alpha 2$ domenima ekstracelularnog dela (Abbas i Lichtman, 2008; Chaplin, 2010).

2.2.2. Molekuli II klase MHC

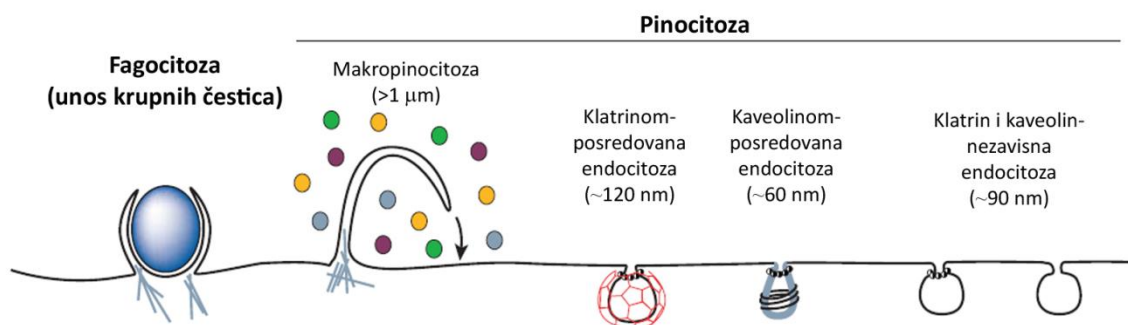
Nasuprot molekulima I klase, MHC II molekuli su eksprimirani na ograničenom broju ćelijskih tipova, i to makrofagima, monocitima, dendritičnim ćelijama i B-ćelijama. Molekuli II klase MHC su takođe heterodimerni membranski glikoproteini koji se sastoje od 2 lanca, α i β (Slika 2.1). Za razliku MHC I, oba lanca molekula II klase kodirani su MHC genima. Svaki lanac je organizovan u jedan ekstracelularni, jedan transmembranski i jedan intracitoplazmatski region. Ekstracelularni deo α i β lanca sastoji se od dva domena, $\alpha 1$ i $\alpha 2$, odnosno $\beta 1$ i $\beta 2$. Domeni $\alpha 1$ i $\beta 1$ formiraju udubljenje za vezivanje antigenskog peptida. Razlika između udubljenja na vrhu molekula I i II klase odnosi se na zatvorene krajeve u slučaju MHC I, odnosno otvorene krajeve udubljenja u MHC II molekulima. Ova razlika uslovljava dužinu peptida koji se nalazi u udubljenju i koja, za razliku od MHC I molekula, iznosi 12-25 aminokiselina. Kao i kod MHC I, „prazni“ MHC II molekuli su nestabilni i podležu razgranji (Chaplin, 2010; Murphy, 2012).



Slika 2.2. Molekularni modeli izvedeni iz kristalnih struktura klase I (A, B, C) i klase II (D, E, F) humanih MHC molekula pre (A, D) i nakon vezivanja peptida označenog žutom bojom (B i C, E i F). Preuzeto i modifikovano iz (Chaplin, 2010).

2.2.2.1. Obrada antigena za prezentaciju u sklopu MHC II molekula

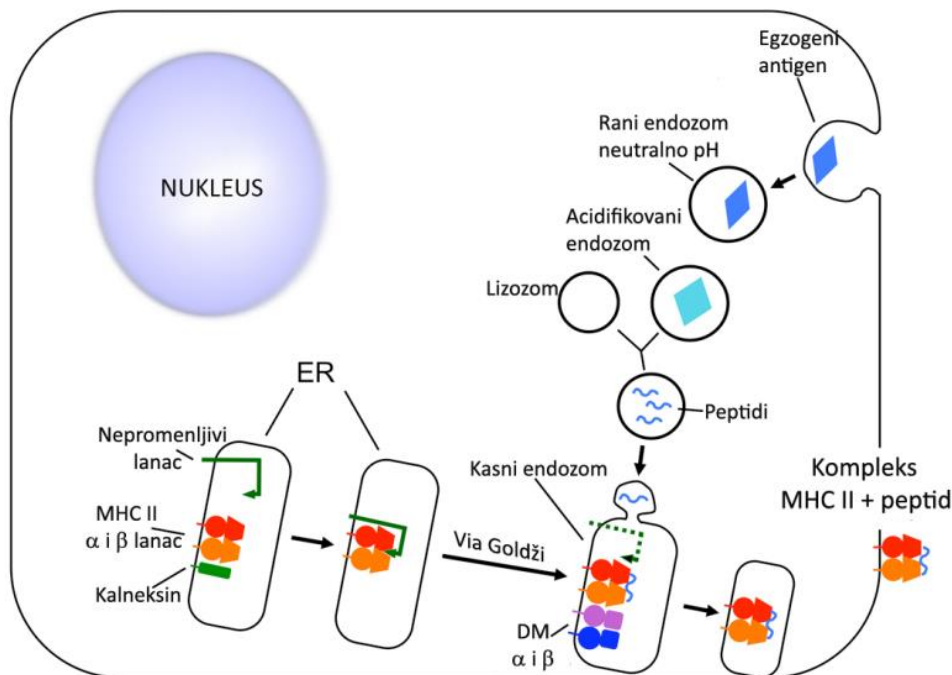
Antigen prezentujuće ćelije (APĆ) preuzimaju mikroorganizme ili njihove proteine iz okolne sredine fagocitozom ili pinocitozom. Fagocitoza je aktivan proces unošenja krupnijih čestica (npr. ćelija), koji je posredovan specifičnim receptorima na membrani APĆ-a (npr. Fc receptori na površini makrofaga prepoznaju antitelima opsonizovane mikroorganizme). Pinocitoza je proces preuzimanja manjih molekula, uglavnom je posredovana vezivanjem molekula za specifični receptor na APĆ-ma i podrazumeva makropinocitozu, endocitozu posredovanu klatrinom ili kaveolinom, i endocitozu neposredovanu klatrinom i kaveolinom (Slika 2.3) (Conner i Schmid, 2003).



Slika 2.3. Mehanizmi internalizacije antigena od strane antigen prezentujućih ćelija. Preuzeto i modifikovano iz (Conner i Schmid, 2003).

Kada uđu u APĆ-u bilo kojim od navedenih puteva, proteini mikroorganizama nalaze se u acidifikovanim intracelularnim vezikulama koje se nazivaju fagozomi ili endozomi i koje se kasnije spajaju sa lizozimima (Slika 2.4). U endolizozomima se proteini razgrađuju pod dejstvom proteolitičkih enzima (endo- i egzoproteaze) pri čemu nastaju peptidi različitih dužina i sekvence. MHC II molekuli se sintetišu u endoplazmatskom retikulumu. Svaki novonastali MHC II molekul je udružen sa proteinom „nepromenljivi lanac“ koji sadrži peptidnu sekvencu CLIP kojom je vezan čvrsto za udubljenje gde će se kasnije vezati antigeni peptid. Nakon spajanja sa endolizozomalnom vezikulom, protein DM, koji je po strukturi sličan MHC II molekulu, uklanja CLIP i udubljenje za vezivanje

peptida postaje dostupno. Ukoliko se neki od novonastalih antigenih peptida veže za udubljenje, kompleks MHC II i peptid se transportuje na površinu ćelije i prezentuje. Iako tokom proteolitičke razgranje proteinskog antigena nastane veliki broj peptida, samo se pojedini vezuju dovoljno jakim afinitetom za MHC II, i oni se nazivaju imunodominantni peptidi tj. epitopi antigena (Bird, 2009).



Slika 2.4. Obrada antigena za prezentaciju u sklopu MHC II molekula. Preuzeto i modificirano iz (Chaplin, 2010).

2.3. Alergije

Alergijske bolesti nastaju kao rezultat aberantnog imunskog odgovora na inače bezopasne antigene iz sredine (alergene), na koje kod zdravih osoba postoji razvijena imuna tolerancija (Johansson, 2004). Alergeni su prisutni u polenu, kućnoj prašini, grinjama, sporama gljiva, životinjskim dlakama, hrani, venomima insekata i.t.d. Neposredni alergijski simptomi su rinitis, konjuktivitis, urtikarija i angiodema, u hronične simptome

spada astma, a u retkim slučajevima ishod može biti i fatalan usled anafilaktičkog šoka. Svaka alergijska reakcija je posredovana ili antitelima, ili celularnim odgovorom uz odsustvo antitela. U poslednjih par decenija učestalost pojave alergija posredovanih IgE antitelima je u konstantnom porastu, i po nekim studijama pogađa oko 25-30% populacije u industrijalizovanim zemljama (Alfven, 2006; Asher, 2006) od čega čak 50% dece (Bousquet, 2011).

Smatra se da razvoj alergijskih reakcija zavisi od predispozicija pojedinca (genetička predispozicija, pol, godine) i od spoljašnjih uticaja (preležane infektivne bolesti u toku ranog detinjstva, zagađenje, izloženost različitim dozama alergena i promene u ishrani). Genetička predispozicija za razvoj alergijskih bolesti pokazana je u nekoliko naučnih istraživanja. Osobe koje imaju izraženu sklonost da razviju ovaj tip reakcija se nazivaju atopičari. Verovatnoća da će jednojajčani blizanci imati iste alergije procenjuje se na 70%, dok je taj procenat kod dvojajčanih blizanaca nešto manji, 40% (Galli, 2000). Roditelji koji pate od alergijskih bolesti će najverovatnije preneti alergiju na decu, a ta deca će imati ozbiljnije alergijske reakcije nego deca nealergičnih roditelja. Identifikovanje lokusa na hromozomima odgovornih za pojačanu genetičku predispoziciju individua prema razvoju alergijskih oboljenja ukazuje da je razvoj alergije povezan sa modifikovanjem imunog odgovora usled prisustva naslednih formi citokina kod dece i roditelja i nema veze sa tipom alergena uzročnika (De Swert, 1999; Lonjou, 2000). Pokazano je i da različiti alergični lokusi kod različitih rasa (belci, azijati, afrikanci, hispano) imaju uticaja na razvoj astme (Barnes, 2007). Rizik razvoja alergijskih oboljenja se smanjuje sa godinama, naime, nivo IgE antitela je najviši kod dece i opada tokom godina (između 10 i 30). Što se tiče uticaja faktora sredine na razvoj alergijskih reakcija, primećeno je da se alergije češće javljaju u industrijalizovanim zemljama nego u zemljama koje se bave poljoprivredom, kao i u urbanim u usporedbi sa ruralnim sredinama, mada ovaj uticaj nije još uvek u potpunosti razjašnjen (Cooper, 2004). Postulirana je takozvana higijenska hipoteza koja pretpostavlja da izlaganje mikroorganizmima, bakterijama i virusima, tokom ranog detinjstva, doprinosi smanjenju rizika, a za razvoj alergija na osnovu rezultata studija u kojima je praćena pojava alergija kod dece koja potiču iz velikih porodica i seoskih domaćinstava (Cooper, 2004). Neka naučna istraživanja su pokazala da paraziti koji napadaju intestinalni trakt (npr.

intestinalni crvi) suprimiraju imunski odgovor, i tako sprečavaju organizam da ih napadne (Carvalho, 2006), na osnovu čega su neki naučnici pretpostavili da je koevolucija parazita i ljudskog imunog sistema dovela do toga da u odsustvu parazita imunski sistem reaguje preosetljivo (Yazdanbakhsh, 2002).

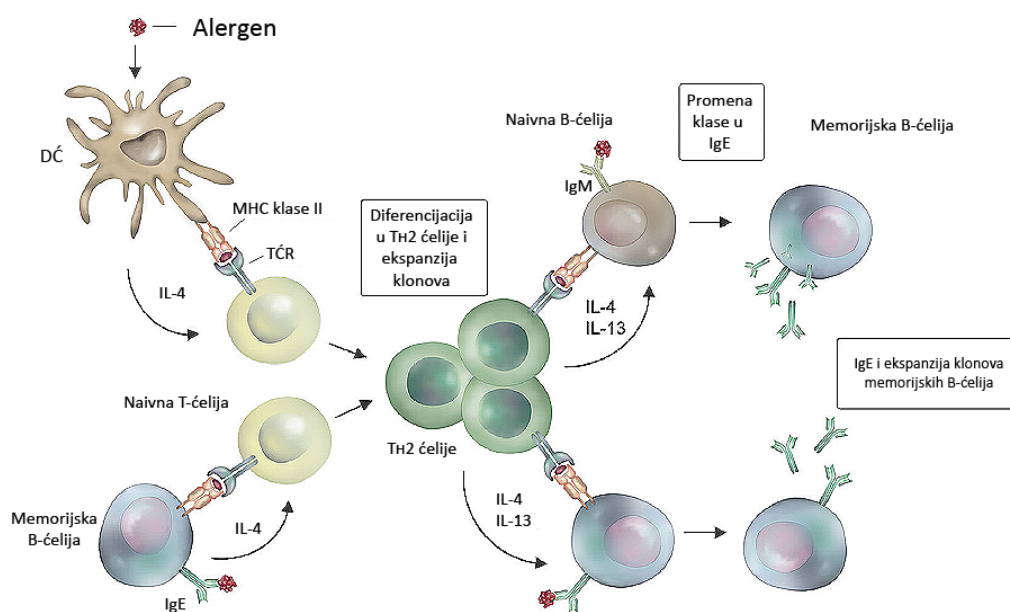
Pre čitanja teksta koji sledi, potrebno je definisati sledeće pojmove: antigen, imunogen, alergen. Antigen (od engl. **antibody generator**) je svaka supstanca koja biva prepoznata i vezuje se za T-ćelijske receptore i antitela. Imunogen je svaka supstanca koja može da izazove specifičan imunski odgovor (B- ili T-ćelijski). Razlika se najjasnije uočava na primeru haptena koji su antigeni, ali nisu imunogeni *per se* već samo u prisustvu nekog nosača koji je imunogen. Alergen (od engl. **allergy generator**) je svaka supstanca koja izaziva alergijski imunski odgovor, ili grubo receno svaka supstanca koja indukuje sintezu IgE antitela.

2.3.1. Mehanizmi alergijskih reakcija

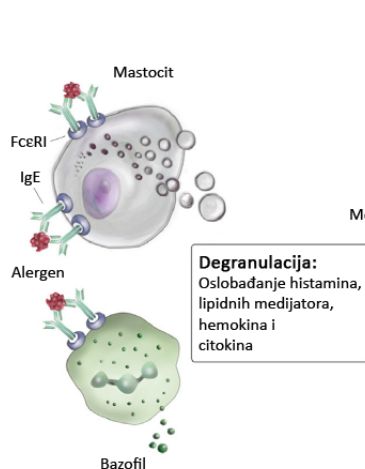
Mehanizam alergijskih reakcija se može podeliti na tri faze: fazu senzitivacije i indukcije memorije, rane i kasne preosetljivosti (Slika 2.5) (Larche, 2006).

Faza senzitivacije i indukcije memorije. Pri prvom susretu sa alergenom APC prikupljaju i obrađuju alergen. Zatim dolazi do prezentovanja ovih peptida, u kompleksu sa odgovarajućim MHC molekulima klase II naivnim CD4⁺ T-ćelijama. Prepoznavanjem peptid-MHC kompleksa preko TCR-a naivne T-ćelije bivaju stimulisane da se umnožavaju (klonalna ekspanzija) i diferenciraju u alergen-specifične Th2 ćelije koje proizvode IL-4 i IL-13. U isto vreme, susedne naivne B-ćelije će pomoću antigen-specifičnih membranski vezanih IgM antitela prepoznati i preuzeti antigen i predstaviti ga Th2-ćelijama. Zajedno sa dejstvom IL-4 i IL-13, ovo će stimulisati promenu klase antitela u B-ćelijama iz IgM u IgE i njihovu diferenciraju u latentne memorijske B-ćelije. Klonalna ekspanzija alergen-specifičnih memorijskih B-ćelija će rezultirati visokom sekrecijom IgE antitela koja će se vezati za FcεRI receptore, koji su locirani na površini mastocita i bazofila (faza senzitivacije ili senzibilizacije ćelija na prisustvo specifičnog alergena).

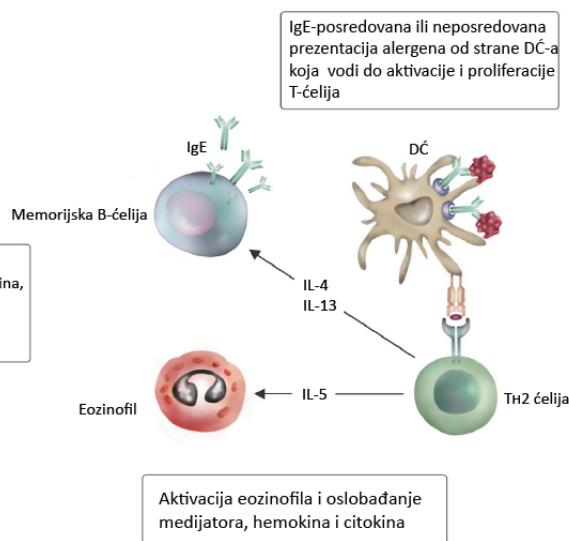
A. Senzitivizacija i indukcija memorije



B. Rana faza: IgE-posredovana reakcija



C. Kasna faza odgovora



Slika 2.5. Mehanizam alergijskih reakcija se može podeliti na tri faze: fazu senzitivizacije i indukcije memorije, fazu rane (A) i kasne (B) preosetljivosti. Preuzeto i modifikovano iz (Larche, 2006). TĀR- T-ćelijski receptor, DĀ- dendritična ćelija, Th2- pomoćnička T-ćelija tipa 2, FcεRI- visokoafinitetni receptor za IgE na mastocitima i bazofilima.

Rana faza preosetljivosti: reakcije posredovane IgE antitelima. Pri sledećem susretu sa alergenom dolazi do njegovog vezivanja za IgE. Multivalentno vezivanje alergena za IgE, koji je pak vezan za FcεRI, i sledstveno agregiranje FcεRI, su okidač za aktivaciju mastocita i bazofila. Agregiranje FcεRI ima za posledicu oslobađanje hemokina, citokina i inflamatornih medijatora iz sekretornih granula koje sadrže histamin, leukotrijene, prostaglandine, proteaze, faktore aktivacije krvnih pločica. Ovi molekuli već u prvih nekoliko minuta uzrokuju patofiziološke promene, kao što su kontrakcija glatkih mišića, produkcija mukusa i povećana propustljivost krvnih sudova, koje su odgovorne za akutne simptome alergijske reakcije.

Kasna faza preosetljivosti. Za odvijanje ove faze alergijskog odgovora potrebni su sati ili dani pa otuda i naziv. Pored trenutnih simptoma, oslobađanje medijatora od strane bazofila i mastocita, trigeruje i prolongirane inflamatorne procese koji su vezani za privlačenje raznih imunih ćelija na mesta izlaganja alergenu, uključujući Th2 limfocite, eozinofile, bazofile i monocite. Nakon migracije do mesta izlaganja alergenu, alergen-specifične Th2 ćelije se reaktiviraju antigen-prezentujućim DĆ i B-ćelijama. Reakcije kasne faze su pospešene IgE antitelima. Pokazano je da tretman alergičnih pacijenata anti-IgE antitelima smanjuje intenzitet imunskog odgovora u kasnoj fazi. Takođe, smatra se da imunopatološke reakcije kasne faze direktno utiču na razvoj astme.

2.4. Alergije na hranu

Do neželjenog odgovora organizma na neku inače bezopasnu hranu dolazi usled intolerancije hrane ili alergije na hranu. Alergije na hranu se često poistovećuju sa intolerancijom ali se one suštinski razlikuju. Kod osoba alergičnih na hranu dolazi do aberantnog imunskog odgovora organizma na alergene hrane (najčešće proteine). Alergije na hranu su u sve većem porastu i u industrijalizovanim zemljama pogađaju 4-8% dečje populacije i do 1-2% odraslih (Baral i O'B Hourihane, 2005). Posledice alergijskih reakcija na komponente hrane mogu da budu vrlo ozbiljne, u retkim slučajevima čak i kobne, i javljaju se svaki put kad se allergen hrane unese u organizam i često su nezavisne od doze. Od oko 10 000 proteina iz hrane koju konzumiramo samo je mali broj sposoban da izazove

alergijsku reakciju (Lehrer, 2002) jer će se na proteine administrirane oralnim putem pre razviti oralna tolerancija nego aktivni imunski odgovor. U skladu sa tim, gubitak oralne tolerancije je u tesnoj vezi sa inflamatornim bolestima, kao što su celijačna bolest i alergije na hranu (Kraus, 2004a; Kraus, 2004b)

2.4.1. Uspostavljanje oralne tolerancije u gastrointestinalnom traktu

Gastrointestinalni trakt (GIT) predstavlja najveći imunološki organ u ljudskom organizmu, poseduje najveću površinu izloženu spoljašnjoj sredini i svakodnevno se susreće sa mnoštvom molekula koji dospevaju u organizam oralnim putem. Njegova uloga nije samo u digestiji i apsorpciji hranljivih sastojaka već i u razlikovanju patogenog od bezopasnog i kontroli tj. supresiji imunskog odgovora na antigene hrane.

GIT štiti domaćina od neželjenih imunskih odgovora na sadržaj iz okoline pomoću fizičke barijere koju čine ćelije epitela spojene čvrstim vezama i obložene debelim slojem mukusa koji „hvata” bakterije, viruse i druge čestice. U odbrani organizma od patogena pomažu i faktori koji podstiču njihovu razgranju a to su enzimi četkaste ivice epitelijskih ćelija, emulgatori poput žučnih kiselina i jako kiselo pH u želucu (1.2-2.5 u normalnom stanju). Imunološku komponentu GIT-a koja pruža aktivnu fiziološku barijeru čine ćelije i molekuli urođenog (polimorfonuklearni neutrofili, makrofagi, NK ćelije, epitelijske ćelije, receptori slični Toll proteinu) i stečenog imunskog sistema (intraepitelijski i lamina propria limfociti, Pejerove ploče, sekretorni IgA i citokini). Povećana učestalost alergija na hranu kod dece je upravo posledica nedovoljno zrele mukozne barijere i imunskog sistema GIT-a (suboptimalne enzimske aktivnosti kod novorođenčadi, nekompletnog sekretornog IgA sistema do četvrte godine života) (Sicherer i Sampson, 2010).

U slučaju potencijalno štetnih i opasnih antigena, podvrsta CD4⁺ T-ćelija pokrenuće brzi inflamatorni odgovor kako bi se obranio domaćin, ali u slučaju da se radi o proteinima iz hrane ili bezopasnim organizmima, T regulatorne ćelije (Th3, Tr1, CD4⁺CD25⁺ T-ćelije, CD8⁺ supresivne T-ćelije, $\gamma\delta$ T-ćelije) aktiviraju se sa ciljem razvoja imune tolerancije (Chehade i Mayer, 2005). I enterociti (epitelijske ćelije koje oblažu lumen crevnog trakta) mogu preuzeti, obraditi antigene i prezentovati ih T-ćelijama u sklopu MHC II kompleksa,

međutim kako im nedostaje dodatni signal ne mogu da aktiviraju T-ćelije pa dolazi do funkcionalne anergije. Enterociti se stoga ponašaju kao neprofesionalne antigen prezentujuće ćelije i imaju ulogu u razvoju tolerancije pre nego u senzitivaciji. Iako GIT predstavlja nepropustljivu barijeru, pokazano je da oko 2% proteina iz hrane prolazi crevnu barijeru u „imunološki” intaktnoj formi (Husby, 1985).

2.4.1.1. Faktori koji utiču na uspostavljanje oralne tolerancije

Faktori koji utiču na postizanje i održavanje oralne tolerancije se dele na one inherentne antigenu (doziranje i frekvencija izlaganja antigenu, priroda antigena) ili domaćinu (starosna dob, genetička predispozicija, intestinalna mikroflora).

Studije na miševima su pokazale da se oralna tolerancija postiže bilo administracijom jedne visoke ili više manjih doza, ali je mehanizam drugačiji. U uslovima visoke koncentracije antigena indukuje se anergija ili uklanjanje antigenom-aktiviranih T-ćelija dok se u uslovima niske koncentracije antigena tolerancija postiže dejstvom regulatornih T-ćelija (Chehade i Mayer, 2005). Smatra se da kod osoba sa alergijom na hranu dolazi do poremećaja u regulaciji imunskog odgovora na antigene u niskim koncentracijama.

Uticaj i sastav mikroflore crevnog trakta na održavanje oralne tolerancije i supresiju imunskog odgovora je od značaja. Naime, miševi koji su bili tretirani antibioticama ili su bili deficijentni za Tol proteinu sličan receptor 4 (od engl. **Toll-like receptor 4**, TLR 4) koji reaguje na bakterijski LPS su bili podložniji senzitivaciji alergenima kikirikija u poređenju sa netretiranim ili normalnim miševima (Bashir, 2004). Takođe, pokazano je da se oralna tolerancija postiže isključivo u normalnim miševima ali ne i u gnotobiotskim miševima (miševi koji se rađaju carskim rezom u sterilnoj zoni u kojoj ostaju sve do kraja života tako da nemaju kontakt sa mikroorganizmima) (Prioult, 2003). Osim na mišijim modelima, uticaj probiotskih bakterija (sastavni deo intestinalne mikroflore) je razmatran i na pacijentima. Taniuchi i saradnici (Taniuchi, 2005), su za eksperimente odabrali bebe koje su alergične na proteine mleka, imaju alergijski dermatitis i manje od 30% *Bifidobacteria* u crevnoj mikroflori. Jednoj grupi je oralno davana liofilizovana *Bifidobacteria*

(*Bifidobacterium breve* M-16V) u toku 3 meseca, a drugoj, kontrolnoj, nije. Nakon administracije *Bifidobacteria* u test grupi je primećeno značajno povećanje *Bifidobacteria* u fekalnoj mikroflori i alergijski simptomi su u celini redukovani u odnosu na period pre testiranja i u odnosu na kontrolnu grupu. Mehanizam smanjenja alergijskih simptoma usled prisustva ili administracije komensalnih bakterija, kod miševa i ljudi, se smatra posledicom: interakcije lipoteihoične kiseline ćelijskog zida bakterija sa TLR-4 na APC-ma koje potom sekretuju IL-12 i aktiviraju Th1 imunski odgovor, regulacije Th1/Th2 balansa preko T regulatornih ćelija ili proteolize glavnih epitopa alergena.

2.4.2. Alergeni hrane

Najčešći uzročnici alergija na hranu su jaja, mleko, morski mekušci, riba, pšenica, kikiriki, soja i orašasto voće mada se svaki izvor hrane smatra potencijalno alergenim. Sa druge strane, svi poznati alergeni hrane se mogu svrstati u samo nekoliko proteinskih superfamilija, tačnije 27 od poznatih 8183 proteinskih familija (Bateman, 2004). Čak 65% alergena hrane pripada prolaminskoj i kupinskoj superfamiliji, BetV1 familiji i profilinima. Poređenjem alergena životinjskog porekla sa njihovim humanim homologima (homologija utvrđena na osnovu proteinske familije, aminokiselinske sekvence i evolutivnih veza), Jenkins i saradnici, su zapazili da ukoliko postoji sličnost u aminokiselinskoj sekvenci veća od 62% ispitivani protein neće izazivati alergije kod ljudi (Jenkins, 2007).

Većina alergena hrane je rastvorljiva u vodi, molekulske mase od 10 do 70 kDa, otporna na visoke temperature, kiselo pH i proteolizu. Njihova stabilnost se povećava nakon vezivanja liganda koji može biti metalni jon ili neki lipid; termostabilnost β -laktoglobulina iz mleka i nespecifičnog lipid-prenosnog proteina (nsLTP, od engl. **n**on **s**pecific **l**ipid **t**ransfer **p**rotein) iz pšenice povećava se nakon vezivanja odgovarajućih lipidnih molekula (Creamer, 1995; Douliez, 2001). Još jedna strukturna odlika koja doprinosi stabilnosti tercijarne strukture ovih alergena je formiranje intramolekulskih disulfidnih mostova. 2S albumin iz semena slačice je član prolaminske superfamilije koji poseduje 4 disulfidna mosta (Domínguez, 1990), a zeamatin je taumatinu sličan protein čija je struktura „umrežena“ sa 8 disulfidnih mostova (Roberts i Selitrennikoff, 1990). Veliki

broj alergena hrane je N-glikozilovan, što povećava njihovu alergenost. Glikozilovana forma Ara h 1, alergena kikirikija, je za razliku od neglikozilovane inicirala Th2 zavisnu aktivaciju dendritičnih ćelija (Shreffler, 2006). Takođe, pre par godina, po prvi put je prijavljeno da se generišu IgE antitela naspram šećerne komponente proteina, galaktozo- α -1,3-galaktoze kod pacijenata sa alergijom na crveno meso (Commins, 2009). Neki alergeni hrane poseduju posebne karakteristike koje su razlog njihove potentosti, poput tropomiozina koji poseduje do 40 uzastopnih ponovaka sekvence duge 7 aminokiselina (Brown, 2001), ili kazeina koji ne poseduje tercijernu strukturu već se nalazi u stabilnoj strukturi sličnoj stopljenoj globuli (Holt i Sawyer, 1993) .

Iako mehanizmi kojim alergeni hrane senzitivizuju nisu još uvek jasni, za većinu njih se zna da senzitivizuju putem GIT-a, pa su iz tog razloga njihova digestibilnost i apsorpcija u GIT-u ključni faktori koje treba razmotriti, jer su upravo oni možda presudni za objašnjenje njihovog alergnog potencijala. Takođe, usled narušavanja strukture proteina u uslovima GIT-a, alergeni čiji su dominantni epitopi senvencijalni tj. linearni indukuju perzistentne i jake alergije.

2.4.2.1. Digestibilnost alergena hrane

Rezistentnost na pepsinsku digestiju je jedna od zajedničkih osobina alergena hrane (Metcalf, 1996), pa je u skladu sa tim, i predloženo da se test pepsinske digestije u simuliranom želudačnom soku (SGF, od engl. **s**imulated **g**astric **f**luid) uvede kao jedan od obaveznih za procenu alergnosti proteina hrane (FAO/WHO, 2001). Astwood i sar. (Astwood, 1996) su korišćenjem tog testa primetili da su proteini hrane koji su alergeni, rezistentniji na pepsinsku digestiju ili tokom proteolize osobađaju stabilne peptide, u poređenju sa nealergenim proteinima koji se kompletno digestuju u toku 15s.

Jedna stvar koja je diskutabilna kod ovakvih pepsinskih testova u SGF-u je velika varijabilnost u uslovima pod kojima različiti autori primenjuju test digestibilnosti. Jedan od parametara koji se često samoinicijativno menja od strane autora je odnos pepsin/protein, a koji utiče na period stabilnosti proteina. Na esej takođe utiču i čistoća preparata pepsina, efekat matriksa hrane u kom se alergen nalazi, afinitet proteina za boje koje se koriste za

vizualizaciju traka nakon elektroforetskih tehnika. Iako su Thomas i sar. (Thomas, 2004), u multi-laboratorijskoj studiji na više proteina postavili temelje za standardizaciju pepsinskog testa, u literaturi se mogu naći šarenoliki rezultati, pa se pri upoređivanju mora obratiti pažnja na eksperimentalne uslove. Ofori-Anti i sar. (Ofori-Anti, 2008), su pokušali da daju objektivne detekcione limite za test digestibilnosti proteina genetski modifikovane hrane. Na osnovu njihovih rezultata (koristeći 10 U pepsina po μg proteina, kao što propisuje US Pharmacopeia) proteini koji se ne digestuju 90% za 20 min i oni koji digestijom daju fragmente veće od 5 kDa predstavljaju potencijalne alergene. Jiang i sar. (Jiang, 2007), su predstavili kompjuterski model digestije koji može da kvantifikuje digestabilnost ciljnog proteina. U budućnosti kompjuterska simulacija može zameniti manuelne eksperimente sa prednošću da se uvek radi pod istim uslovima. Međutim, da bi se dobila potpuna informacija o alergenu potencijalu hrane *in vitro* analiza mora detektovati nativni protein, peptide nastale digestijom, kao i imunoreaktivnosti oba a poželjno je potvrditi rezultate i *in vivo*.

Studije novijeg datuma su iznele nekoliko sumnji po pitanju predviđanja alergnosti proteina hrane na osnovu njihove pepsinske digestibilnosti navodeći primere koji odstupaju od gore iznetog pravila. Danas je prihvaćena podela alergena hrane na prave alergene koji mogu da senzitivizuju putem GIT-a i nekompletne alergene koji ne mogu sami da senzitivizuju.

2.4.2.1.1 *Alergeni koji senzitivizuju preko gastrointestinalnog trakta (pravi, kompletni alergeni hrane)*

Većina alergena hrane biljnog porekla za koje se smatra da senzitivizuju preko GIT-a pripadaju proteinskim superfamilijama prolamina i kupina. Njihova zajednička karakteristika je rezistencija na degradaciju proteazama usled kompaktne strukture. Superfamilija prolamina, kojoj pripadaju 2S albumini, nsLTP-ovi, α -amilazni/proteazni inhibitori iz žitarica, u svojoj strukturi poseduju konzerviranu kičmu cisteinskih aminokiselinskih ostataka koju najčešće formiraju četiri disulfidna mosta (Breiteneder i Radauer, 2004; Kreis, 1985). Kupinska superfamilija proteina, poseduje u strukturi β -burence koje važi za najstabilniji strukturni motiv (Mills, 2002). Pripadnici ove

superfamilije su vicilini i legumini među kojima su Ara h 1 iz kikirikija i β -konglicinin iz soje (Maleki, 2000).

Sa druge strane, postoje i alergeni koji su osetljivi na pepsinsku degradaciju ali ipak senzitivizuju preko GIT-a, što je primećeno kod tropomiozina iz rakova, kazeina, α -laktalbumina i goveđeg serum albumina (BSA) iz mleka, ovomukoida iz jaja (Moreno, 2007). Iako se degraduju u prvih nekoliko minuta (BSA: 0-2min), njihovi fragmenti koji nastaju su stabilniji (BSA: 15 min), i omogućavaju im uspešnu senzitivizaciju (Astwood, 1996). Da bi neki peptid, fragment proteina nastao digestijom, mogao uspešno da senzitivizuje mora biti minimalne mase 3-5 kDa (van Beresteijn, 1995).

Naravno, postoje i izuzeci, poput zeina iz kukuruza i konkanavalina iz „jack bean“ mahunarke koji su rezistentni na proteolizu pepsinom ali ne pokazuju alergena svojstva i ne mogu da stimulišu imunski sistem ili izazovu alergijsku reakciju (Fu, 2002). Stoga, rezistentnost ka pepsinu ne može da se uzme kao jedini faktor alergenosti proteina hrane već se mora interpretirati uz dodatak drugih faktora koji će skupa diskriminisati alergene od nealergenih proteina hrane.

2.4.2.1.2 *Alergeni koji ne senzitivizuju (nekompletni alergeni hrane)*

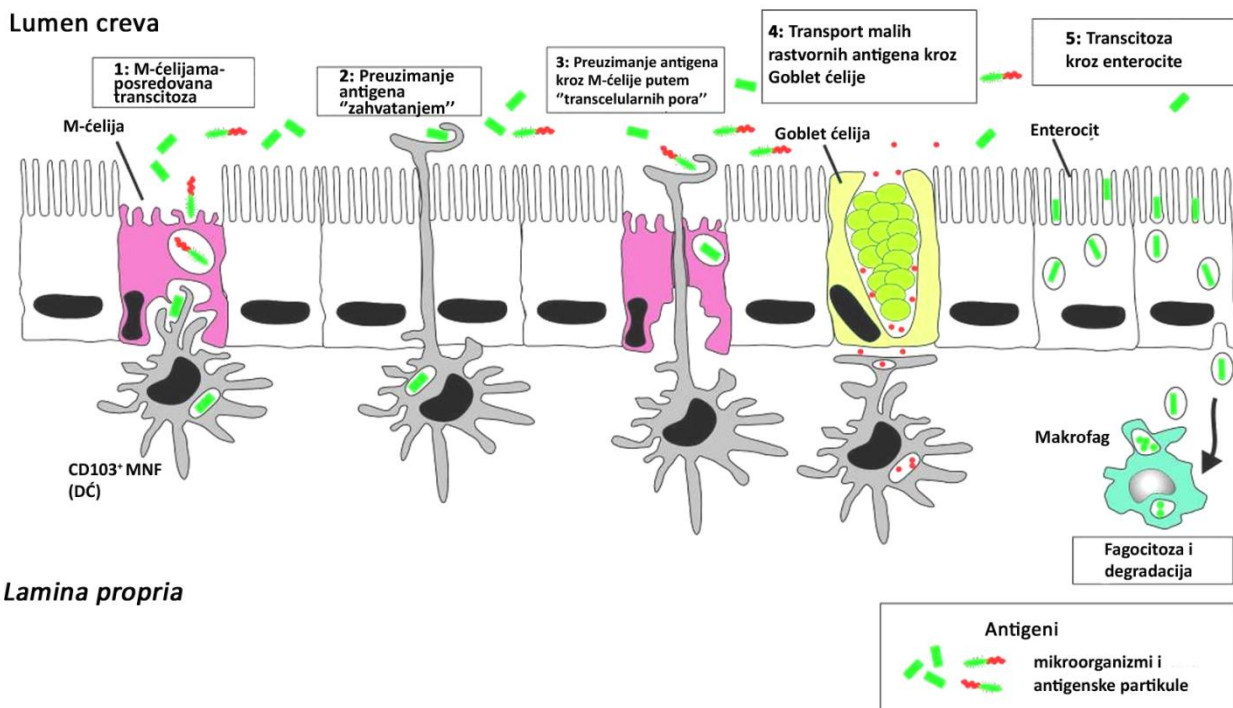
Nekompletni alergeni hrane za razliku od kompletnih ili pravih ne mogu da senzitivizuju direktno i brzo se degraduju u uslovima GIT-a. Ovo je još jedan od izuzetaka pravila da su alergeni hrane samo oni koji su rezistentni na degradaciju pepsinom.

Primeri ove klase alergena su proteini koji su uključeni u lateks-voće/povrće sindrom ili polen-voće/povrće sindrom. Simptomi kod pacijenata sa ovim sindromima se manifestuju u usnoj šupljini pa odatle i naziv oralni alergijski sindrom. Za razliku od pravih alergena hrane, ovde se senzitivizacija vrši inhalacijom tj. disajnim putem od strane alergena lateksa ili polena, a pacijenti reaguju na proteine voća i povrća zbog njihove strukturne sličnosti sa alergenom koji je odgovoran za primarnu senzitivizaciju. Tako se kod osoba alergičnih na havein iz lateksa javlja i alergija na Pers a 1 (avokado), Cas s 5 (kesten), Mus xp hitinazu (banana); kod osoba sa alergijom na Bet V1 iz polena breze se javlja i alergija na Mal d 1 (jabuka), Cor a 1.04 (lešnik) i Api g 1 (celer) (Dreborg i Foucard, 1983;

Yagami, 2000). Naravno i ovde ima izuzetaka od pravila kao što je slučaj sa alergenima lešnika koji su ukršteno-reaktivni sa proteinima polena breze a sa druge strane mogu i sami da senzitivizuju bez pomoći alergena polena, tj. poseduju osobine i kompletnih i nekompletnih alergena hrane (Schocker, 2000).

2.4.2.2. Apsorpcija alergena hrane u gastrointestinalnom traktu

Proteini uneti putem hrane se degraduju enzimima u želucu i duodenumu na aminokiseline i peptide koji se apsorbuju od strane enterocita u tankom crevu. Do sada je pokazano da apsorpcija alergena hrane umnogome zavisi od osobina samog proteina, koje diktiraju njegov put ulaska u sistemska cirkulaciju tj. njegovu apsorpciju. Antigeni hrane ili njihovi fragmenti koji „prežive“ digestiju u duodenumu mogu biti preuzeti u crevnom traktu od strane enterocita, M-ćelija, goblet ćelija i dendritičnih ćelija koje ispuštaju svoje dendrite u lumen creva (Slika 2.6) (Chehade i Mayer, 2005; Mabbott, 2013).



Slika 2.6. Apsorpcija antigena hrane u gastrointestinalnom traktu. Preuzeto i modifikovano iz (Mabbott, 2013). MNF- mononuklearni fagocit, DĆ- dendritična ćelija.

Pokazano je da su mukozni i sistemski imunski odgovor najčešće inicirani preuzimanjem alergena putem M-ćelija Pejerovih ploča, jer se na taj način intaktni proteini ili proteinski agregati direktno preuzimaju iz lumena, i kao takvi dopremaju do DĆ-a koje zatim aktiviraju T- i B-ćelije smeštene u folikulima, što rezultuje jakim imunskim odgovorom. Iako enterociti uglavnom transportuju peptide i aminokiseline, oni mogu da preuzmu i intaktne proteine, ali je transcelularni put preuzimanja u njima degradivan. Međutim, ima i izuzetaka gde enterociti transportuju intaktne alergene jer oni bivaju zaštićeni vezivanjem za IgE koji je vezan za CD23 receptor na apikalnoj strani enterocita, ili prolaze paracelularno između ćelija. Ovako transportovani intaktni proteini omogućavaju uspešnu aktivaciju mastocita i inicijaciju reakcije hiperosetljivosti (Yang, 2000)

Potrebno je naglasiti da i konstituenti matriksa hrane mogu povećati ili usporiti pa čak i inhibirati transport kroz GIT. Polifenolna jedinjenja inhibiraju transport ovalbumina kroz Caco-2 ćelijski monosloj dok surfatrankti poput monoestara saharoze i masnih kiselina povećavaju paracelularni transport ovomukoida u istom model sistemu enterocita (Caco-2) (Kobayashi, 2003; Mine i Zhang, 2003)

2.5. Alergeni mleka

Kravlje mleko sadrži u proseku 3.55% proteina (Đorđević, 1987), ili izraženo u odnosu na suhu materiju mleka 28%, što ga čini dobrim izvorom proteina. Najveći deo proteina mleka čine kazein, oko 3.0%, i proteini surutke, najvažniji su β -laktoglobulin, α -laktalbumin, goveđi serum albumin i imunoglobulini, oko 0.55% (Đorđević, 1987). Po svojoj nutritivnoj vrednosti proteini mleka zauzimaju mesto odmah posle proteina jaja kao dobar izvor esencijalnih aminokiselina. Stoga se proteini mleka koriste za povećanje biološke vrednosti nekih namirnica, u proizvodnji dečje hrane, dijetetske hrane, konditorskoj i pekarskoj industriji.

Alergija na proteine kravljeg mleka je najčešći uzrok alergije kod dece, sa incidencom od 2-6% (Boyce, 2010; Garcia-Ara, 2004; Robichaux, 1997), mada je procenat samo prijavljenih veći 1.2-17% (Rona, 2007). Od alergije na mleko najčešće oboljevaju novorođenčad jer je to prvi izvor hrane sa kojim se njihov još uvek nedovoljno razvijeni

GIT susreće. Oko 80-85% dece preraste alergiju na mleko do svoje 3 ili 5 godine, mada je u skorašnjoj studiji uviđeno da je samo oko 50% dece preraslalo alergiju na mleko u istom periodu (Venter, 2008; Wood, 2013). Među onom decom koja ne prerastu alergiju do tog uzrasta, razvija se perzistentna alergija koja može da ih prati kroz adolescenciju pa čak i odraslo doba. Pojava alergija na mleko kod odraslih je retka, 0.1-0.5%, ali sa izrazito jakim simptomima i kod pacijenata se može javiti po prvi put i u zreloom dobu (posle 16 godine) (Woods, 2002).

Glavni alergeni mleka su ujedno i najzastupljeniji proteini, na prvom mestu kazein a odmah iza njega β -laktoglobulin (Breiteneder i Mills, 2005; Docena, 1996; Natale, 2004; Shek, 2005; Wal, 2002), mada i ostali proteini mleka prisutni u nižim koncentracijama imaju ulogu u procesu senzitivizacije. U jednoj grupi italijanskih pacijenata koja je sadržala 18-oro dece sa dijagnostifikovanom alergijom na mleko, detektovana su IgE antitela u 2D-immunoblotu na pojedinačne proteine mleka. Pedesetpet procenata dece je posedovalo IgE na α_{s1} -kazein, 90% na α_{s2} -kazein, 15% na β -kazein, 50% na κ -kazein, 45% na β -laktoglobulin, 45% na goveđi serum albumin, 95% na teški lanac IgG-a, 50% na laktoferin i 0% na α -laktalbumin (Natale, 2004). U sličnoj studiji novijeg datuma, u većoj grupi od 115-oro japanske dece sa potvrđenom alergijom na mleko, detektovan je IgE na kazein i β -laktoglobulin u CAP-RAST-u i pokazano je da 97.3% prepoznaje kazein, 46.6% β -laktoglobulin, a 43.6% prepoznaje i jedan i drugi alergen (Nakano, 2010).

2.5.1. Struktura i funkcija β -laktoglobulina

β -laktoglobulin (BLG) je najzastupljeniji protein mlečnog seruma kravljeg mleka i čini oko 50% ukupnih proteina surutke i 12% proteina mleka (Morr, 1985). Do skoro se smatralo da se nalazi samo u mleku preživara, ali danas se zna da i mleko nekih vrsta nepreživara (svinje, konji, delfini, mačke) sadrži BLG. Iako postoje podaci da se ovaj protein nalazi u malim količinama i u humanom mleku smatra se, u globalu, da je odsutan u mleku ljudi i pacova (Hambling, 1992). To je mali, rastvoran, globularni protein, član lipokalinske superfamilije proteina sa molekulskom masom oko 18.3 kDa (Brautnizer, 1973). U kravljem mleku se javlja u 6 genetskih varijanti (A, B, A_{DR}, B_{DR}, C i D) (Gordon i

Kalan, 1974), pri čemu su A i B izoforme najčešće zastupljene. Razlika između A i B izoformi je u dve aminokiseline: Asp₆₄ i Val₁₁₈ u A izoformi su zamenjeni sa Gly i Ala, redom, u B izoformi (Eigel, 1984). Izoelektrična tačka BLG je oko pH 5.3 (Hurley i Rejman, 1986).

Primarnu strukturu BLG-a čine 162 aminokiselinska ostatka (Brautnizer, 1973) u okviru kojih je 84 ostatka esencijalnih amino kiselina: 8 treonina, 5 cisteina, 10 valina, 4 metionina, 10 izoleucina, 22 leucina, 4 tirozina, 4 fenilalanina, 2 triptofana i 15 ostatka lizina. U molekulu se formiraju dve disulfidne veze: jedna se ostvaruje između Cys₆₆ i Cys₁₆₀, a druga je dinamičkog karaktera i ostvaruje se između Cys₁₀₆ i Cys₁₁₉ ili Cys₁₂₁, što znači da je jedna sulfidrilna grupa Cys₁₁₉ ili Cys₁₂₁ slobodna (Swaisgood, 1986).

Slobodna -SH grupa ima povećanu reaktivnost na pH 7, kada je protein u manje kompaktnoj konformaciji, te je tada mogućnost intra- i inermolekulske sulfidril-disulfidne izmene veća, naročito u temperaturnom intervalu 60-65⁰C (Caessens, 1997). Asocijacija i formiranje agregata BLG-a zavise od pH sredine i temperature. Na pH 2-3 i preko pH 9 egzistira kao monomer (s'tim što iznad pH 9 podleže ireverzibilnoj denaturaciji), kao dimer postoji u širem opsegu pH (pH 3-3.7 i 5.1-9), a u opsegu pH 3.7-5.1 kao oktamer (Barteri, 2000). BLG je izuzetno stabilan u kiseljoj sredini, tako da i na pH 2 ostaje u nativnoj konformaciji. Prilično je otporan na kiselu i enzimsku digestiju u gastrointestinalnom traktu, zahvaljujući svojoj izuzetnoj kompaktnoj trodimenzionalnoj strukturi (Papiz, 1986).

Trodimenzijska struktura BLG-a je poznata, u njoj dominiraju antiparalelne β -pločice (ukupno njih devet), od kojih osam formira hidrofobnu β -burencu strukturu oivičenu sa jedne strane α -heliksom. BLG sadrži i tri kratka, neuređena heliksa (Yagi, 2003). Hidrofobna unutrašnjost β -burenceta je izdužena, podseća na čašicu cveta (engl. calyx) i osnova je biološke funkcije BLG-a. Smatra se da BLG ima ulogu u transportu ili akumulaciji lipofilnih jedinjenja, kao što su masne kiseline i retinol. Izuzetna stabilnost BLG na digestiju u želucu je relevantna za njegovu biološku funkciju jer predstavlja pravi transporter provitamina A, retinola, sa krave na tele (de Wit, 1998).

Glavna biološka funkcija BLG-a bi bila transport hidrofobnih liganada, ali danas se smatra da i sam protein i njegovi peptidni fragmenti imaju različite bioaktivnosti. Peptidni fragmenti BLG-a, koji su intaktni u sklopu nativnog proteina se aktiviraju za vreme

digestije u GIT-u, reapsorbuju u krv i imaju hormonima-slične funkcije. Neke od bioloških aktivnosti za koje je pokazano da ih poseduju su antihipertenzna, antioksidantna, antimikrobna i imunostimulirajuća. Peptidi su dužine od 3-20 aminokiselinskih ostataka, a njihova primarna sekvenca definiše njihovu biološku aktivnost (Mullally, 1997; Pellegrini, 2001)

BLG ima visoku nutritivnu i funkcionalnu vrednost pa se koristi u prehrambenoj industriji kao aditiv za emulgovanje, želiranje, vezivanje vode, obrazovanje pene, postizanje tamnije boje proizvoda, kao zamena za kazeinate i belance jajeta. Upravo zbog širokog spektra tehnološko-funkcionalnih osobina, u poslednjih par godina pažnja se posvećuje i bioaktivnim funkcijama BLG-a, naročito imunostimulirajućoj.

Alergene osobine BLG-a su ekstenzivno proučene i njegovi epitopi su okarakterisani (Clement, 2002; Heinzmann, 1999; Rouvinen, 1999; Sélo, 1999). Imunoreaktivne strukture su široko rasprostranjene duž 162 aminokiseline dugog molekula. Neke od njih su kratke linearne sekvence, dok su ostale veliki fragmenti koji svojim uvijanjem formiraju konformacione epitope (Wal, 2001). U intenzivnoj studiji diskontinualnih epitopa monoklonskim antitelima određeno je 12 antigenskih mesta (Clement, 2002). Smatra se da moraju postojati kratki fragmenti, u hidrofobnim delovima BLG-a, koji čine visoko konzervirane sekvence odgovorne za IgE ukrštenu reaktivnost sa odgovarajućim proteinima mleka ostalih sisara, uključujući i čoveka (Maier, 2006). Stoga autori studija o alergenom potencijalu proteina moraju biti svesni kako opadanja tako i porasta alergnog potencijala kao rezultata razvijanja proteina tokom prerade hrane.

2.5.2. Modifikacije β -laktoglobulina

Kako je BLG izvor esencijalnih aminokiselina, poseduje niz poželjnih tehnološko-funkcionalnih osobina, i lako je dostupan, predstavlja često korišćen sastojak u prehrambenoj industriji. Sa druge strane BLG je svrstan u alergene hrane. Jedini efikasan tretman alergija na mleko je izbegavanje mleka i mlečnih proizvoda, ali s obzirom na sve veću primenu proteina surutke, čija je on glavna komponenta, to postaje problem. Postavlja se pravo pitanje kako modifikovati protein tako da se pospeše ili ostanu neizmenjene

njegove osobine bitne za industriju, a istovremeno smanji njegova alergnost. U velikom broju publikacija koje se bave ovom problematikom, za smanjenje alergnosti proteina uspostavljene su brojne metode za modifikaciju proteina uključujući enzimsku digestiju (Bernasconi, 2006), denaturaciju (Peyron, 2006), genetske modifikacije (Totsuka, 1997) i hemijske modifikacije proteina (Fagnani, 1990).

Enzimski digestija i denaturacija pokazuju dobro rešenje u pogledu smanjenja imunogenog potencijala proteina, ali se pri tome dobijaju peptidi koji daju gorak ukus proizvodima, tako da ne predstavljaju pravo rešenje u proizvodnji hipoalergenih proizvoda. Genetske modifikacije su dobro ali skupo, i automatski za industriju loše rešenje. Hemijske modifikacije su se pokazale dobrim rešenjem, pa je tako recimo, vezivanje ugljenih hidrata za BLG jedno od boljih rešenja, s obzirom da se šećernim komponentama menja alergnost i imunogenost proteina zbog zaklanjanja epitopa i promene u procesovanju od strane antigen prezentujućih ćelija (Hattori, 2000b), i poboljšavaju funkcionalnih osobina (Hattori, 2000a).

Mleko se obično tretira termički kako bi mu se produžio rok trajanja ili zarad dobijanja željenih tehnoloških osobina. Izlaganjem mleka visokim temperaturama dolazi do promena u mleku i sastojcima mleka kao što su sniženje pH, precipitacija kalcijum fosfata, denaturacija proteina surutke i njihova interakcija sa kazeinom, Majlardova reakcija, promene na kazeinu i u strukturi kazeinskih micela. Proteinske modifikacije mogu rezultirati u smanjenju nutritivne vrednosti, usled gubitka esencijalnih aminokiselina i smanjenja digestibilnosti, ali ujedno mogu imati i suprotne, korisne efekte po zdravlje ljudi.

Kada se BLG zagreva do temperatura nižih od 90 °C dolazi do povećanja njegove alergnosti usled razvijanja i izlaganja prethodno skrivenih epitopa. Tretmanom temperaturama višim od 90°C opada alergnost BLG-a, zahvaljujući gubitku konformacionih epitopa i maskiranju sekvencionalnih epitopa tokom agregiranja, kao i termalno indukovanim modifikacijama proteina (formiranje glikozida u Mailardovoj reakciji) (Davis i Williams, 1998; Fritsche, 2003; Rytönen, 2002). Tretman BLG-a na 90 °C tokom 15 min je značajno smanjio njegov IgE vezujući kapacitet. Međutim ni tretman BLG-a na 90°C tokom 60 min nije potpuno eliminisao IgE vezujuću aktivnost (Ehn, 2004).

Štaviše, pretpostavlja se da termalno indukovana denaturacija (90 °C) povećava alergenost BLG izlažući prethodno skrivena antigena mesta (Kleber, 2004). Stoga termalni tretman ne može biti efektivan pristup za eliminisanje alergnosti BLG-a i razvoj hipoalergenih proizvoda baziranih na mleku.

Tretmani mleka visokim pritiscima mogu značajno promeniti karakteristike mleka, na primer mogu da dovedu do promena pri kristalizaciji masti, denaturacije proteina, povećanog izlaganja hidrofobnih ostataka u molekulima proteina. BLG se na pritiscima iznad 500 MPa u potpunosti razvija (Considine, 2005), pa je podložniji hidrolizi većinom proteaza, što u kombinaciji predstavlja dobru strategiju za redukciju alergnosti proteina (Bonomi, 2003).

Pokazano je da umrežavanje proteina građenjem intermolekulskih veza predstavlja jedan od načina manipulacije proteinima hrane u cilju dobijanja boljih osobina prehrambenih proizvoda bez narušavanja njihove nutritivne vrednosti (Gerrard, 2002). Ukazano je takođe, da bi se ovakvim modifikovanjem proteina, potencijalnih alergena hrane kao što je BLG, povećala digestibilnost proteina i smanjio alergeniti potencijal bez narušavanja IgE vezujućih epitopa (Stanic, 2009).

2.6. Nove tehnike za obradu hrane

2.6.1. Ultrazvuk

Ultrazvuk se definiše kao bilo koji zvuk sa frekvencijom koja je iznad praga ljudskog sluha (Leighton, 2007), tj. iznad 16 kHz pa do 10 MHz (Ince, 2001). Ultrazvučni talasi u tečnim medijumima postižu brzinu 1000-1600 m/s, sa talasnom dužinom 10-0.01 cm. Kako ove dimenzije nisu u rangu molekula jasno je da efekti ultrazvuka ne utiču direktno na molekulske vrste. Naprotiv hemijski efekti ultrazvuka, sonohemija i sonoluminiscencija, proističu od akustičnih kavitacija: formiranje, rast i implozivni kolaps mikro mehurova u tečnoj fazi. Kavitacioni kolaps proizvodi inenzivno lokalno zagrevanje (~5000 K), visoki pritisak (~1000 atm), i ogromne zagrevanje/hlađenje prelaze (>10⁹ K/sec), mikromešanje i nastanak mikrostruja. Mehurovi pucaju jako brzo, za nekoliko

mikrosekundi. Akustična kavitacija omogućava jedinstvenu interakciju između energije i materije, i ultrasonična iradijacija tečnosti omogućava dešavanje visoko-energetski zavisnih reakcija, često praćenih emisijom svetlosti (Suslick, 1989).

Formiranje slobodnih radikala je direktna posledica sonolize vode u prisustvu monoatomske gasa. Kada dođe do kavitacije dolazi do disocijacije vodene pare na vodonikove atome i hidrosil radikle koji se mogu iskombinovati, pri čemu kao glavni proizvodi sonolize vode nastaju H_2 , H_2O_2 , HO_2^\bullet . Isparljiva i hidrofilna jedinjenja reaguju, na granici faza, između kavitacionog mehura i tečne vodene faze sa superkričnom vodom i van nje, sa nastalim slobodnim radikalima. Hidrofobna i jednostavnija isparljiva jedinjenja pirolizuju unutar kavitacionog mehura (Suslick, 1989). Slobodni radikali mogu hemijski modifikovati biomolekule kao što su enzimi, DNA, lipidi (Barnett, 1998). Kompresijom gasa se generiše toplota. Do kompresije kavitacionog mehura, pri njegovom pucanju, dolazi brzo (mikrosekunde) i malo toplote stigne da se oslobodi. Sa druge strane, tu oslobođenu toplotu brzo apsorbuje okolna tečna faza koja još uvek nije stigla da se ugrije. Ultrazvukom se stoga, lokalno generišu kratkoživeće, takozvane, vruće tačke (oko 5000 K) u hladnom tečnom medijumu koji ima ulogu prigušivača.

Ultrazvuk je našao primenu u industriji za ubrzavanje hemijskih reakcija, degradaciju polimera i reakcije polimerizacije, za čišćenje površina, degaziranje tečnosti, u procesu kristalizacije. Polimerizacija cikličnih laktone uz otvaranje prstena i formiranje poliestara uz prisustvo ultrazvuka, 20 kHz, se ispostavila bržom u ranijim fazama za dobijanje polimera većih molekulskih masa (Price, 2003). Primena ultrazvuka u kombinaciji sa oksidoredukcionim enzimima, kao što su lakaze, se ispostavila efikasnijom varijantom za degradaciju potencijalno toksičnih azo-boja od pojedinačnog dejstva ultrazvuka i lakaze (Rehorek, 2004). U jednoj drugoj studiji je ta ista kombinacija lakaze i ultrazvuka korišćena za izbeljivanje pamuka. Veća efikasnost enzima je objašnjena većom difuzijom enzima kroz tečnu fazu i tekstil do površine vlakna, pri čemu se mora voditi računa o vremenu izlaganja enzima i intenzitetu ultrazvuka, usled inaktivacije i denaturacije enzima; pri jačini ultrazvuka od 7 W enzimska aktivnost se nije bitno menjala pola sata (Basto, 2007).

Danas se ultrazvuk koristi i u obradi hrane za degaziranje i kontrolu pene, mešanje, emulzifikaciju i omekšavanje mesa. Jedno od ograničenja za upotrebu ultrazvuka za konzerviranje hrane je taj što je intenzitet ultrazvuka, koji je potreban za uništavanje mikroorganizama, utiče i na sastojke hrane. U mlečnoj industriji ultrazvuk se pored homogenizacije mleka, koristi i za ubrzavanje ultrafiltracije surutke i čišćenje membrana, redukciju vremena fermentacije jogurta, povećanje njegove sposobnosti da vezuje vodu i povećanje viskoznosti tj. za pravljenje jogurta sa boljim reološkim osobinama.

2.6.2. Umrežavanje proteina hrane

Umrežavanje proteina (engl. cross-linking) se odnosi na formiranje kovalentnih veza unutar proteina, intramolekularno umrežavanje, ili između proteina, intermolekularno umrežavanje (Feeney i Whitaker, 1988). U toku procesa obrade hrane često se polazni materijal izlaže visokim temperaturama, ekstremnim pH, oksidaciji, nekontrolisanoj enzimskoj obradi. Takvi procesi za rezultat mogu imati umrežavanje proteina, što dovodi kako do funkcionalnih (Singh, 1991), tako i do nutritivnih promena finalnog produkta (Friedman, 1999a).

Veze koje se formiraju pri umrežavanju proteina su disulfidni mostovi (Cys), izopeptidne veze (Asp, Glu, Lys), heterogene veze kao posledica Majlardovih reakcija (Lys, Arg, moguće i Trp, His, Pro), ditirozinske i izoditirozinske veze (Tyr). Disulfidni mostovi između proteina mogu nastati za vreme tretiranja polaznog materijala visokim temperaturama, koriste se za geliranje proteina mleka, soje, jaja, mesa i nekih proteina povrća. Gelovi se formiraju povezivanjem proteina u trodimenzionalnu mrežu koja daje proizvodu određenu teksturu, tako se tretiranjem mleka visokim temperaturama omogućava interakcija denaturisanog BLG-a sa κ -kazeinom preko formiranja disulfidnih veza čime se sprečava precipitacija BLG-a. Intermolekulske disulfidne veze, koje nastaju za vreme mešanja brašna i vode rezultuju u formiranju proteinske mreže koja ima odgovarajuća viskoelastična svojstva potrebna za pravljenje hleba (Singh, 1991).

Tretman alkalijama se koristi u toku obrade hrane za uklanjanje toksičnih konstituenata, solubilizaciju proteina itd. Međutim tretman alkalijama može dovesti do niza sporednih neželjenih reakcija. Tako alkalni uslovi u kombinaciji sa termalnim izlaganjem mogu indukovati nastanak kovalentnih veza i dehidroproteinskih mostova kao što su dehidroalaninski i lizinoalaninski što za posledicu može imati slabiju digestiju finalnog prehrambenog proizvoda i manji stepen iskorišćenja uz opasnost za nastanak mutagenih produkata (Friedman, 1999a, b).

Ditirozinski mostovi su prisutni i u biološkim sistemima, npr. u zidovima biljnih ćelija (Singh, 1991), i u pšenici gde se formira mreža glutena (Tilley, 2001). *In vitro* mostovi se formiraju nakon tretmana proteina vodonikperoksidom, peroksidazama ili polifenol oksidazama kao što su lakaza i tirozinaza.

2.6.2.1. Hemijske metode za umrežavanje proteina

Za umrežavanje proteina koriste se reagensi sa aktivnim grupama na oba kraja i kao targeti se uglavnom koriste tirozin i cistein. Mana ove metode su poteškoće u predviđanju reaktivnosti reagenasa. Reagensi su skupi i često nisu dozvoljeni u prehrambenoj industriji, što ograničava njihovu upotrebu. Sa druge strane, oni predstavljaju odlično sredstvo za pokazivanje efekta umrežavanja određenih proteina na njihovu strukturu i funkcionalnost, što podrazumeva prvi korak, za kojim sledi modifikacija postupka u cilju smanjenja cene postupka i upotrebe reagenasa koji nisu štetni po zdravlje čoveka i životinja. U te svrhe su korišćeni glutaraldehid da se pokaže potencijalni efekat kontrolisane Majlardove reakcije na teksturu proizvoda od brašna (Gerrard, 2002), i formaldehid za umrežavanje proteina mleka radi povećanja njihove termičke stabilnosti (Singh, 1991).

2.6.2.2. Enzimske metode za umrežavanje proteina

Upotreba enzima za modifikaciju funkcionalnih osobina proteina u industriji ima svoje prednosti u odnosu na tretmane hemikalijama upravo zato što je to prirodniji i zdraviji

način obrade hrane, reakcije se odvijaju u blagim uslovima, sa katalitičkim količinama enzima koji imaju veću specifičnost i uz manju verovatnoću za nastanak toksičnih materija potencijalno štetnih po zdravlje potrošača (Singh, 1991). Enzimi koji se koriste u ove svrhe su transglutaminaza, oksidaze poput lakaze, tirozinaze, peroksidaze, disulfid izomeraze itd. Trenutno je transglutaminaza (EC 2.3.2.13), enzim koji katalizuje transfer acil grupe između gama-karboksiamino grupe glutamil ostatka i amino grupe lizinskog ostatka, vodeći enzim koji se koristi u industriji ishrane.

2.6.2.2.1 *Lakaze*

Fenol oksidaze (tirozinaze i lakaze) su enzimi koji sadrže jone bakra i oksiduju fenolna jedinjenja transferom elektrona sa supstrata na molekularni kiseonik. Ovi enzimi mogu katalizovati reakcije polimerizacije, uključujući proteine (Riva, 2006). Lakaze (EC 1.10.3.2) su difenol oksidaze koji katalizuju oksidaciju različitih fenolnih jedinjenja, kao što su difenoli, polifenoli, različiti supstituisani fenoli, aromatični amini i benzotiololi (Canfora, 2008), generišući slobodno-radikalne intermedijere. Reaktivni slobodni radikali dalje mogu podleći neenzimskoj polimerizaciji ili mogu interagovati sa supstratima koji imaju visok redoks potencijal (uključujući aminokiseinske ostatke u proteinima). Lakaze katalizuju formiranje fenoksil radikala jednoelektronskom oksidacijom fenolnih hidroksilnih grupa sa kiseonikom kao akceptorom elektrona (Yaropolov, 1995).

Lakaze su uglavnom nalaze u gljivama (Baldrian, 2006). Pronađene su u skoro svakoj od viših gljiva, nekim višim biljkama i bakterijama (Rosconi, 2005). Nisu poznate sve funkcije lakaza, ali se smatra da su biljne lakaze uključene u koracima sinteze lignina katalizujući polimerizaciju monomernih jedinica (p-kumaril, koniferil i sinapil alkohola). Glavne fiziološke funkcije lakaza iz gljiva su degradacija lignina, učešće u razvoju i morfogenezi, patogenezi i detoksikaciji (Zhao i Kwan, 1999).

Do sada je izolovano i okarakterisano više od 100 lakaza. To su glikoproteini sa rasponom molekularnih masa od 50-130 kDa. Ugljenohidratne komponente čine 10-45% molekulske mase proteina (Baldrian, 2006), i smatra se da imaju ulogu u postizanju pravilne prostorne konformacije i u zaštiti proteina od proteolize i inaktivacije slobodnim

radikalima (Bolobova, 2002). U aktivnom centru lakaze se nalaze četiri jona bakra koji su klasifikovani u tri grupe, T1-T3, u zavisnosti od njihovih spektroskopskih i ESR parametara (Solomon, 1996). T1 centar pokazuje različite spektroskopske i ESR karakteristike od ostalih i odgovoran je za plavu boju rastvora enzima, predstavlja mesto oksidacije supstrata, T2 centar je mononuklearan, dok je T3 binuklearan, i jedan i drugi formiraju mesto redukcije molekula kiseonika uz nastanak i oslobađanje vode.

Široka supstratna specifičnost lakaza, tj. njihova sposobnost da oksiduju različita fenolna kao i nefenolna jedinjenja, čini ove enzime atraktivnim za primenu u različitim biotehnološkim procesima. Lakaze su našle primenu u nekim procesima za prečišćavanje voda, detoksifikaciju toksičnih efluenata u industriji drveta, tekstilnoj i petrohemijskoj industriji, u medicinskoj dijagnostici, bioremedijaciji, a od skora i u prehrambenoj industriji za poboljšanje reoloških osobina proteinskog matriksa (Si, 1994).

Lakaza polimerizuje neke peptide i proteine (Lantto, 2005; Mattinen, 2005), direktnom oksidacijom ostatka tirozina i cisteina (Mattinen, 2005). Radikaliski posredovana oksidacija slobodnih sulfhidrilnih grupa proteina se ubrzava u reakcijama katalizovanim lakazom u prisustvu egzogenih fenolnih kiselina (Figuroa-Espinoza i Rouau, 1999), ali se isto tako formiraju i polimeri između fenolnih kiselina i tripeptida ili proteina koji sadrže tirozin (Mattinen, 2005). Fragmentacija proteina, primećena prilikom oksidacije proteina mesa katalizovane lakazom, pripisana je nastanku slobodnih radikala samih proteina nastalih dejstvom lakaze (Lantto, 2005).

Oksidacijom ostataka tirozina lakazom nastaju tirozil radikali. Tirozil radikali kod nestrukturiranih proteina (pr. α -kazein) su skloniji formiraju ditirozinskih veza u odnosu na strukturirane proteine (BSA i BLG) (Ostdal, 2000). Smatra se da je svega oko 25% tirozinskih ostataka globularnih proteina direktno izloženo rastvaraču (Herskovits i Sorensen, 1968), i tako dostupno oksidaciji lakazom. Međutim, globularna struktura stabilizuje radikale u unutrašnjosti proteina (Ostdal, 1999). Ovakvi unutrašnji radikali mogu nastati transferom oksidacionih ekvivalenata od oksidabilnih aminokiselina bliže spoljašnjosti proteina, čime se ove aminokiseline štite od oksidativnog oštećenja (Hawkins i Davies, 2001). Ovakve reakcije mogu objasniti brzu oksidaciju Trp, Tyr i Phe ostataka u mnogim proteinima, uprkos tome što su zavučeni duboko u hidrofobno jezgro i nedostupni

reaktivnim vrstama u okolnom rastvoru. Ovo je objašnjenje za transfer elektrona kroz proteine sa ultimativnim formiranjem fenoksi radikala nastalih od tirozina (Stadtman, 1990).

3. IZOLOVANJE I PREČIŠĆAVANJE NATIVNOG β -LAKTOGLOBULINA

Za izučavanje strukturnih i funkcionalnih osobina protein mora biti u nativnom obliku, tj. izolovan i prečišćen iz polaznog materijala nekim nedestruktivnim metodama. U ovom poglavlju je opisan proces kojim smo iz mleka na efikasan i jednostavan način izolovali BLG visokog kvaliteta, koji je korišćen u svim ostalim eksperimentima koji slede, kao i komparacija ove metode sa drugim u literaturi dostupnim.

Razne tehnike bazirane na specifičnim osobinama BLG-a korišćene su za njegovo izolovanje i prečišćavanje od ostalih proteina surutke: selektivna solubilizacija BLG-a u prisustvu 30 g/kg trihlorsirćetne kiseline (Caessens, 1997; Konrad, 2000), selektivna solubilizacija BLG-a na niskom pH uz prisustvo soli (Alomirah i Alli, 2004), digestija ostalih proteina pepsinom i razdvajanje peptida od BLG-a membranskom filtracijom (Konrad, 2000), kombinacija nekoliko hromatografskih tehnika (Lozano, 2008; Neyestani, 2003), jonoizmenjivačka (Ye, 2000) i afinitetna hromatografija (Vyas, 2002). Ipak, nedostaci ovih metoda su primena uslova koji mogu nepovoljno da utiču na nativnu strukturu proteina (visoka koncentracija soli, nisko pH, tretman proteazama) ili vreme trajanja postupka koji često uključuje više koraka, što ujedno i povećava cenu izolovanja.

Glavni problem pri izolovanju proteina surutke je razdvajanje dva glavna proteina α -laktalbumina (ALA) i BLG-a koji su približnih molekulskih masa, 14.4 i 18.3 kDa, i sličnih izoelektričnih tački, 4.8 i 5.3, redom (Gjesing, 1986). Za njihovo razdvajanje na laboratorijskoj i semi-preparativnoj skali dve blage tehnike su metode od izbora: gel filtracija i jonoizmenjivačka hromatografija. U našim uslovima, gel filtracija je davala pristojne rezultate na baznom pH kada je BLG u formi dimera isključivo ukoliko su korišćene HPLC (od engl. **high performance liquid chromatography**) kolone i uređaj. Hromatografija je dugo trajala, dolazilo je do preklapanja proteina u bitnim frakcijama, kapacitet kolone je bio mali čak iako je zapremina matriksa bila 200 ml, matriksi za HPLC su skupi a ekstrakt surutke i nakon odmašćivanja i intenzivne dijalize sadrži polifenole i lipidne molekule koji se lepe za čestice matriksa i smanjuju životni vek kolone. Sa druge strane, hromatografija pod normalnim pritiskom (tzv. sobna hromatografija) na jeftinom

anjonskom matriksu je bila značajno brža, prinos je bio dosta veći usled visokog kapaciteta za vezivanje proteina i efikasno smo se rešili kontaminirajućih malih molekula. Kvalitet dobijenog preparata je okarakterisan u poređenju sa komercijanim standardom pomoću spektroskopije cirkularnog dihroizma, raznih enzima kojima su target različite aminokiseline proteina i ELISA testa sa BLG-specifičnim poliklonskim zečjim IgG antitelima.

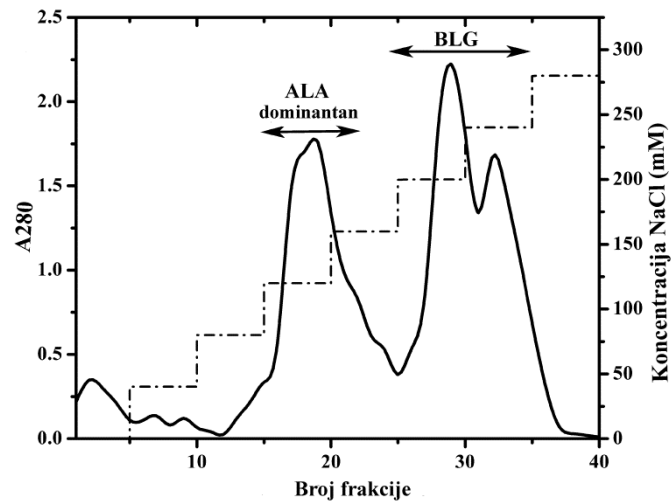
3.1. Rezultati

3.1.1. Analiza elucionog profila jonoizmenjivačke hromatografije

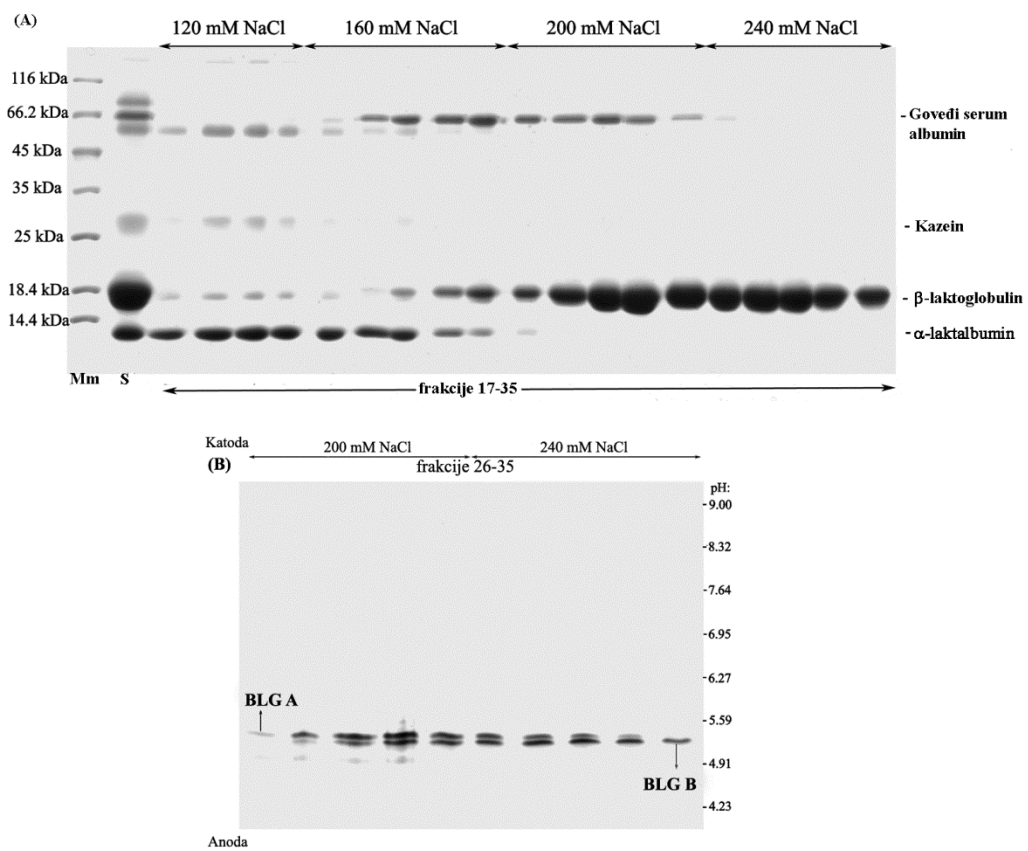
Na pH 7.5, na kom je rađena hromatografija, većina proteina surutke se vezala za DEAE-Sephadex. Vezani proteini su eluirani sa kolone step-gradijentom NaCl i skupljene frakcije su analizirane SDS-PAG elektroforezom i izoelektričnim fokusiranjem (IEF). ALA je eluiran sa kolone kao dominantna komponenta sa 120 i 160 mM NaCl, a BLG sa 200 i 240 mM NaCl (Slika 3.1). BSA je u tragovima bio prisutan u BLG frakcijama eluiranim sa 200 mM NaCl, dok su BLG frakcije eluirane sa 240 mM NaCl sadržale čist protein (Slika 3.2.A). Frakcije u kojima je eluiran BLG su analizirane i IEF-om gde je uočeno prisustvo A i B izoformi BLG-a (pI 5.26 i 5.34, redom), kao i njihovo razdvajanje u pojedinim frakcijama. Prvo je eluirana izoforma B, ubrzo praćena izoformom A, dok je pred kraj elucije izoforma A bila dominantna (Slika 3.2.B). Na kraju su BLG frakcije spojene i dalja analiza je nastavljena sa dve, manje čistom eluiranom sa 200 mM NaCl i čistijom eluiranom sa 240 mM NaCl, sa izuzetkom onih frakcija u kojima je po jedna izoforma.

3.1.2. Analiza prečišćenog BLG-a i poređenje sa standardom

Na osnovu hromatograma reverzno fazne hromatografije visokih performansi (RP-HPLC) određena je čistoća preparata: $97.41 \pm 0.21\%$ za BLG eluiran sa 200 mM NaCl, $98 \pm 0.12\%$ za BLG eluiran sa 240 mM NaCl, 98.60 ± 0.14 za frakciju sa izoformom A i



Slika 3.1. Elucioni profil jonoizmenjivačke hromatografije



Slika 3.2. Eluirane frakcije su analizirane A) SDS-PAG elektroforezom i B) izoelektričnim fokusiranjem. Mm-molekulski markeri, S-surutka.

90.60±0.85% za frakciju sa izoformom B. Za potvrdu reproduktivnosti, hromatografija je urađena ponovo sa 250 ml surutke (proporcionalno količini uzorka je povećana zapremina matriksa i zapremina elucionog pufera) i dobijen je isti elucioni profil i slična čistoća frakcija BLG-a (Tabela 3.1).

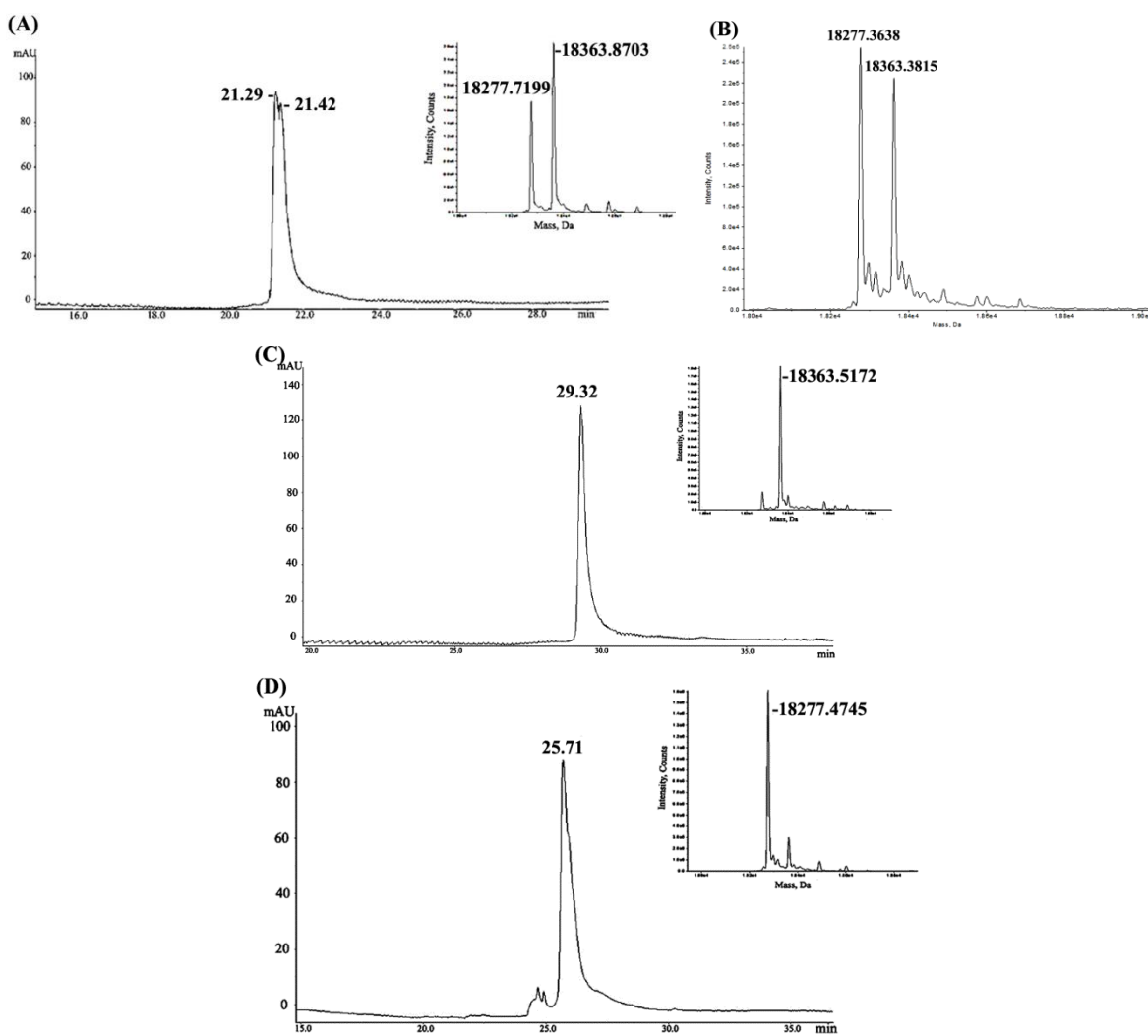
Tabela 3.1. Prinos i čistoća BLG-a izolovanog iz 130 ml (I) i 250 ml (II) surutke

	Frakcije BLG-a	Čistoća (%)	Prinos (%)	Ukupni prinos (%)	Ukupni prinos (mg)
I	eluiran sa 240 mM NaCl	98.58 (± 0.12)	42	80	312
	eluiran sa 200 mM NaCl	97.41 (± 0.21)	38		
II	eluiran sa 240 mM NaCl	98.62 (± 0.16)	60	82	615
	eluiran sa 200mM NaCl	96.95 (± 0.21)	22		

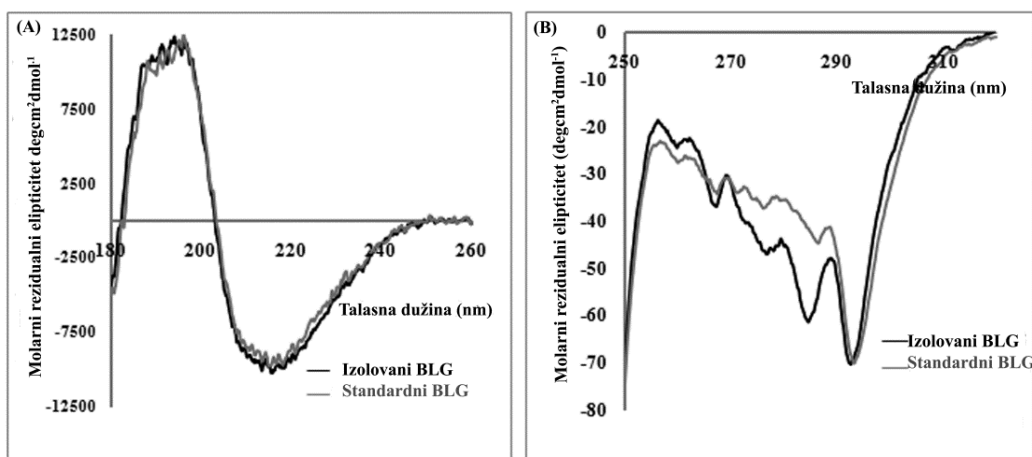
Na Slici 3.3.A, prikazan je hromatogram sa RP-HPLC-a i odgovarajući ESI-maseni spektar, sa kojih se uočava da ukupni BLG (frakcija 200+240 mM) poseduje izoforme A i B u približno istom odnosu i da su njihove određene mase 18277.7199 i 18363.8703 Da u skladu za literaturnim podacima i masama dobijenim masenom analizom standarda (Slika 3.3.B). Takođe, RP-HPLC hromatogrami i maseni spektri razdvojenih izofomi su potvrdili njihov identitet i pružili uvid u stepen njihove čistoće (Slika 3.3. C i D). Izoforma A je 99% čista dok izoforma B sadrži primese drugih proteina i njena čistoća je 91%, kontaminacija jedne izofome drugom je minimalna.

CD spektri, umrežavanje enzimima i imunohemijska karakterizacija su rađeni sa BLG-om veće čistoće (240 mM frakcija). CD spektri snimljeni u dalekoj UV oblasti između 180 i 260 nm pružaju informacije o sekundarnim strukturama proteina. Spektri izolovanog BLG-a i standarda se preklapaju i poseduju karakteristični minimum na 218 nm koji pokazuje da u njihovoj strukturi dominiraju β-pločice (Slika 3.4.A). Pomoću CONTIN algoritma je izračunat i udeo β-pločica u odnosu na ostale strukturne motive, udeo je bio približno isti u izolovanom i standardnom BLG-u i iznosio je 41.2±0.03 i 40.9±0.03%, redom. Izolovani i standardni BLG poseduju istu sekundarnu strukturu koja je u skladu sa ranije objavljenim rezultatima (Blanc, 2008; Lozano, 2008). Za razliku od spektara u dalekoj UV oblasti, spektri proteina snimljeni u bliskoj UV oblasti između 250-

320 nm nisu identični, a oni pružaju informacije o tercijarnoj strukturi proteina (Slika 3.4.B). U spektru standarda se uočava smanjenje intenziteta pika na 285 nm koji se pripisuje Trp₁₉ tj. gubitku aromatičnog dihroizma koji nastaje usled nerigidnog pakovanja aminokiselinskih ostataka. Kako u spektru izolovanog proteina to nije uočljivo izvodi se zaključak da izolovani protein poseduje nativnu strukturu koja se karakteriše kompaktnom globulom, dok je tercijarna struktura standarda nešto narušena.



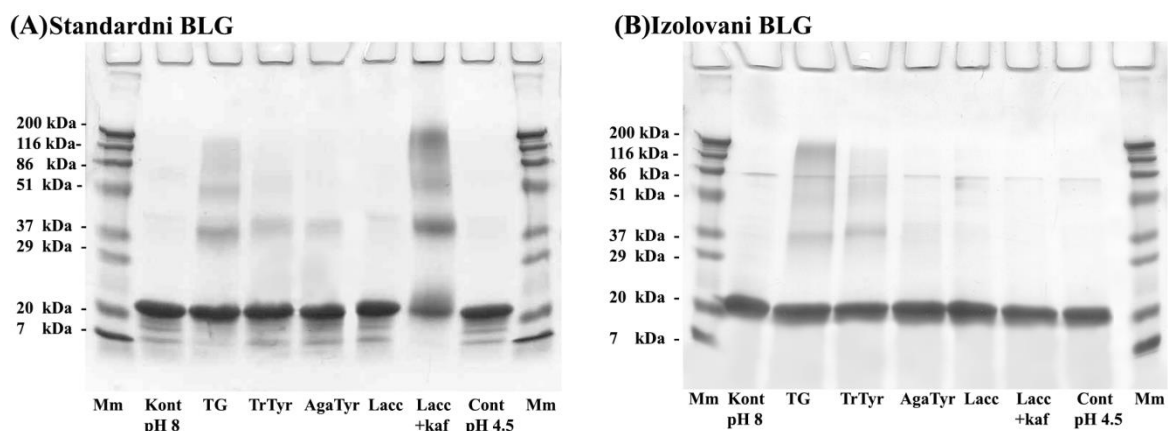
Slika 3.3. Hromatogrami sa RP-HPLC-a i odgovarajući ESI-MS spektri izolovanog ukupnog BLG-a (A), izoforme A (C) i izoforme B (D). B) ESI-MS spektar standarda BLG-a.



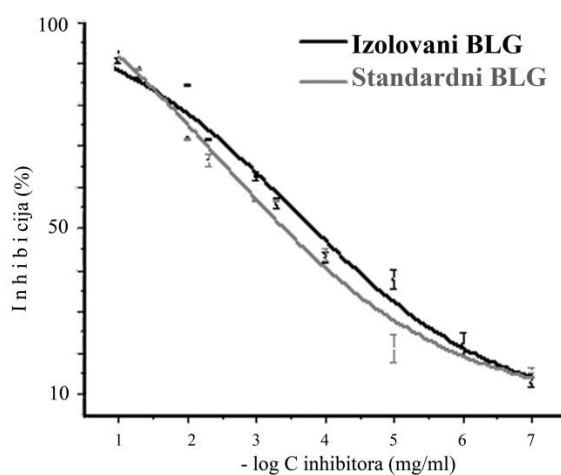
Slika 3.4. CD spektri izolovanog (crna linija) i standardnog (siva linija) BLG-a u dalekoj UV (A) i bliskoj UV (B) oblasti.

Fine razlike u strukturi standardnog i izolovanog BLG-a su dodatno analizirane u reakcijama sa enzimima koji umrežavaju molekule proteina: transglutaminaza (TG), lakaza (Lacc) i dve tirozinaze iz različitih izvora (AgaTyr i TrTyr). Ukoliko jedan od dva testirana BLG-a poseduje narušenu tercijernu strukturu, aminokiselinski ostaci koji se modifikuju u ovim enzimskim reakcijama će biti dostupniji enzimu i prinos reakcije će biti veći. Transglutaminaza je acil-transferaza koja katalizuje reakciju intra- i intermolekulskog umrežavanja proteina putem izopeptidnih veza između aminokiselinskih ostataka glutamina i lizina. Lakaza i tirozinaza predstavljaju oksidoreduktaze koje povezuju proteine katalizom građenja veza između nukleofilnih aminokiselinskih ostataka (npr. Tyr, Cys), reakcija se pospešuje dodavanjem malih fenolnih molekula (Selinheimo, 2008). Reakcije sa TG i Tyr su rađene na pH 8, a sa lakazom na pH 4.5 jer je enzim nestabilan u alkalnoj sredini (Xu, 1997). Efikasnost reakcije je praćena povećanjem proteinskih polimera visokih molekulskih masa što se uočava SDS-PAG elektroforezom. Standardni BLG je najefikasnije bio umrežen dejstvom Lacc uz prisustvo kafeinske kiseline kao medijatora, a zatim TG-om; na gelu se uočavaju novonastali dimeri (oko 37 kDa), trimeri (oko 55 kDa) i polimeri molekulskih masa iznad 116 kDa (Slika 3.5.A). Dejstvom TrTyr, AgaTyr i Lacc bez kafeinske kiseline nagradili su se dimeri i malo trimera standarda BLG-a. Nije uočeno

umrežavanje izolovanog BLG-a dejstvom Lacc (sa i bez kafeinske) i AgaTyr. Dejstvom TrTyr formirali su se dimeri i trimeri kao kod standarda, TG je bila najefikasnija i količina polimera većih od 116 kDa je bila nešto veća nego kod standarda (Slika 3.5.B).



Slika 3.5. SDS-PAGE analiza u redukujućim uslovima proizvoda reakcija umrežavanja standarda (A) i izolovanog BLG-a (B) enzimima. TG- transglutaminaza, TrTyr i AgaTyr-tirozinaze, Lacc-lakaza, Kont-naetretirani BLG na pH 8 i 4.5 na kojima su rađene reakcije.



Slika 3.6. Inhibicija vezivanja IgG antitela za standardni BLG pomoću standardnog i nativnog BLG-a.

Na kraju, ispitana je i imunoreaktivnost izolovanog BLG-a u inhibitornom ELISA testu sa zečjim anti-BLG antitelima i standardom kuplovanim za čvrstu fazu. I izolovani i standardni BLG pokazuju sličan sigmoidni profil i postižu maksimum inhibicije sa koncentracijom od 100 $\mu\text{g/ml}$ (Slika 3.6). IC_{50} vredosti se malo razlikuju, za standardni ona iznosi 0.414 $\mu\text{g/ml}$ a za izolovani je nešto manja 0.163 $\mu\text{g/ml}$.

3.2. Diskusija

Mnoge metode su korišćene za izolovanje BLG-a i njegovo prečišćavanje od ostalih proteina surutke, prednosti i mane nekih su već napomenute u uvodu. Efikasnost naše metode je upoređena sa šest ranije publikovanih metoda (Tabela 3.2). U našem eksperimentu, ukupni prinos BLG-a je bio 80%, a čistoća 97-99%. Prinos BLG-a u drugim metodama se kreće od 47 do 70%, sa izuzetkom metode de Jong i sar. (de Jongh, 2001), gde je prinos 80%. Čistoća preparata uglavnom varira između 83-95%, opet sa izuzetkom metode predložene od strane de Jong i sar. gde je čistoća >98%. Od šest metoda, jedino se postupak de Jonga i sar. pokazao podjednako efikasan kao i naš. Međutim, ista metoda uključuje dva koraka, jonoizmenjivačku i gel filtracionu hromatografiju, što je čini skupljom i sporijom procedurom.

Takođe, predloženom metodom u pojedinim frakcijama dobili smo razdvojene izoforme čistoće 99 i 91%. Razdvajanje izoformi BLG-a je do sada uspešno rađeno HPLC-om (Konrad, 2000; Neyestani, 2003; Xavier Felipe i Law, 1997) čija je efikasnost daleko bolja ali je kapacitet kolona manji i ceo postupak je znatno skuplji. Ye i sar. (Ye, 2000) su takođe uspeali da razdvoje izoforme BLG-a jonoizmenjivačkom hromatografijom pod normalnim pritiskom, ali usled loše interpretiranih rezultata, nismo mogli da uporedimo njihove rezultate sa našim.

Detaljnou karakterizacijom strukture izolovanog BLG-a i poređenjem sa standardom, dokazali smo da je izolovani protein visokog kvaliteta. Snimanjem CD spektara u dalekoj i bliskoj UV oblasti, pokazali smo da izolovani i standardni BLG poseduju istu sekundarnu strukturu kao i da izolovani protein poseduje nativnu strukturu

koja se karakteriše kompaktnom globulom, dok je terciјarna struktura standarda nešto narušena.

Tabela 3.2. Poređenje prinosa i čistoće BLG-a izolovanog predloženom metodom sa drugim metodama.

Metoda za izolovanje BLG-a	Prinos BLG-a (%)	Čistoća BLG-a (%)
Naša metoda	80	97-99
Metoda bazirana na rastvorljivosti BLG-a na niskom pH uz prisustvo soli (Lozano, 2008)	47-69	84-95
DEAE hromatografija u baču i gel filtracija (de Jongh, 2001)	>80	>98
Hidroliza svih ostalih proteina pepsinom i ultrafiltracija (Alomirah i Alli, 2004)	67	94
Precipitacija sa 3% TCA: 1) (Konrad, 2000); 2) (Alomirah i Alli, 2004)	1) 60; 2) 45	1) 95; 2) 92
Isolјavanje 1) (Matte, 1994); 2) (Konrad, 2000)	1) 65; 2) 47	1) 95; 2) 87
Selektivna termalna precipitacija (Alomirah i Alli, 2004)	50	83

Usled finih razlika u terciјarnoj strukturi standardnog i izolovanog BLG-a, efikasnost polimerizacije proteina u reakcijama sa transglutaminazom, lakazom i tirozinazom se razlikovala. Ove razlike se mogu objasniti pojavom pH-zavisnih konformacionih promena BLG-a. Naime, na pH 8 na kome su rađene reakcije sa TG i TrTyr protein se nalazi u „otvorenijoj“ strukturi tzv. R-stanje, pa je stepen umrežavanja standarda i izolovanog proteina, u skladu sa tim, sličan. U kiseloj oblasti, na pH 4.5 na kome je izvođena reakcija sa Lacc, protein je u kompaktnijoj i „zatvorenijoj“ strukturi tzv. Q-stanje. Na pH 4.5 je efikasnost umrežavanja izolovanog proteina značajno manja što se objašnjava njegovim kompaktnijim pakovanjem, usled čega su aminokiselinski ostaci Tyr zaklonjeniji i manje dostupni lakazi. Očuvanost epitopa za vezivanje zećjih anti-BLG IgG-a kod standardnog i izolovanog BLG-a je bila slična, a nešto jači afinitet za vezivanje antitela zapažen kod izolovanog BLG-a se pripisuje očuvanijoj terciјarnoj strukturi. Ovakav pristup i detaljna analiza nisu opisani u drugim pomenutim metodama.

3.3. Materijal i metode

3.3.1. Jonoizmenjivačka hromatografija i elektroforetska analiza frakcija

3.3.1.1. Priprema surutke

Domaće sirovo (termički netretirano) mleko je kupljeno na lokalnoj pijaci i obrano centrifugiranjem na 4°C, 30 minuta brzinom 4000g (lipidni kolač koji se formira na površini se odbaci). Kazein je staložen iz obranog mleka kiselom precipitacijom dodavanjem 1 M HCl do pH 4.6. Nakon centrifugiranja (4°C, 30 min, 4000g), supernatant koji zaostaje je surutka. Dobijena surutka je dodatno odmašćena dodavanjem tri zapremine CCl₄ na jednu zapreminu surutke i energičnim mešanjem. Organski sloj u kome se nalaze lipidni molekuli je razdvojen od surutke centrifugiranjem na sobnoj temperaturi na 12000g, 15 min. Postupak je ponovljen tri puta. Ovako odmašćena surutka je skupljena i dijalizovana naspram ekvibracionog pufera za hromatografiju, 20 mM Tris pH 7.5 sve dok provodljivost i pH surutke nisu bili ekvivalentni onim u puferu. Tek ovako spremljena surutka može da se koristi za hromatografiju.

3.3.1.2. Hromatografija na DEAE-Sephadex-u

Dietilaminoetil (DEAE) Sephadex A-50 je kupljen od kompanije GE Healthcare Bio-Sciences (Upsala, Švedska). Matriks je pripremljen za hromatografiju po uputstvu proizvođača. Suvi matriks je nabubren u ekvibracionom puferu za hromatografiju, 20 mM Tris pH 7.5. Sedamdeset mililitara nabubrelog matriksa je spakovano u staklenu kolonu dimenzija 2.5x20 cm. Nakon nekoliko zapremina ekvibracionog pufera, na kolonu je naneto 130 ml surutke koncentracije proteina 6 mg/ml pod protokom 1 ml/min. Nevezani protein su isprani sa 100 ml ekvibracionog pufera pa su zatim vezani proteini eluirani step-gradijentom NaCl-a u ekvibracionom puferu, sa po 100 ml u svakom koraku pod protokom od 2 ml/min. Gradijent soli je bio u opsegu 40-280 mM NaCl, pri čemu je koncentracija soli u svakom koraku bila za 40 mM veća nego u prethodnom. Sakupljane su

frakcije od po 20 ml i analizirane elektroforetski. Frakcije u kojima se nalazio čist BLG su spojene, rasoljene dijalizom, određena je čistoća proteina reverzno faznom HPLC hromatografijom i prinos.

3.3.1.3. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u surutki je određena Warburg-Christian-ovom spektroskopskom metodom (Warburg i Christian, 1941).

Koncentracija čistog BLG-a je utvrđena merenjem apsorbanca na 280 nm i korišćenjem Lamber-Ber-ovog zakona. Ekstinkcioni koeficijent BLG-a je izračunat po ugledu na rad Pace i sar.(Pace, 1995):

$$\epsilon \text{ (ml/mg cm)} = (5500n_w + 1490n_y + 125n_c)/M,$$

gde su $n_w=2$, $n_y=4$, $n_c=2$ brojevi Trp, Tyr i Cys po molekulu BLG-a, M je molekulska masa BLG-a i iznosi 18285 kDa. Finalno, izračunati koeficijent iznosi 0.9412 mg/ mg cm.

3.3.1.4. Natijum-dodecil sulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAG elektroforeza, SDS-PAGE)

SDS-PAG elektroforeze su rađene po originalnoj Laemmli-jevoj proceduri (Laemmli, 1970). Elektroforetska razdvajanja proteina rađena su na Hoeffer SCI aparaturi po instrukcijama proizvođača (Amersham Biosciences, GE-Healthcare) pod uslovima konstantnog napona: 80 V u fazi koncentrovanja uzorka do ulaska boje bromfenol plavo u gel za razdvajanje, a zatim na 250 V dok boja ne stigne na oko 1 cm od donje ivice gela. Sirova surutka i frakcije nakon hromatografije su analizirane na 14% (w/v) gelu pod redukujućim uslovima, tj. uz prisustvo 14.4 mM β -merkaptetanola u puferu za pripremu uzorka za SDS-PAGE (60 mM Tris pH 6.8, 250/1 glicerola, 20 g/l SDS, 10 g/l boje bromfenol plavo). Nakon elektroforetskog razdvajanja proteinske trake su vizualizovane bojenjem sa Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB, Sigma-Aldrich, Taufkirhen, Nemačka) i upoređene sa komercijalnim standardom proteinskih molekulskih markera (SMO431, Fermentas, Vilnius, Litvanija).

3.3.1.5. Izoelektrično fokusiranje (IEF)

U frakcijama sa BLG-om profil izofromi je određen IEF-om na sistemu Multiphor II (Amersham Biosciences) uz amfolite širokog opsega (3.5-10) na 5% (w/v) poliakrilamidnom gelu po instrukcijama proizvođača. Kao katodni rastvor korišćen je prethodno prokuvani sveže napravljene 150 mM NaOH, kao anodni rastvor korišćen je 5 mM H₂SO₄. Predfokusiranje na 800 V je trajalo 30 min, zatim su naneti uzorci koji su naknadno fokusirani na 400 V tokom 10 min, zatim na 600 V tokom 10 min, 800 V tokom 30 min, 1000 V tokom 10 min i još 5 min na 1200 V (maksimalna jačina struje 50 mA, maksimalni napon 2000 V i maksimalna snaga 10 W). Nakon završetka IEF-a, protein su fiksirani u gelu sa 30% (w/v) trihlorsirćetnom kislelinom tokom 1h. Nakon fiksiranja gel je ispran od trihlorsirćetne kiseline u toku noći vodom i proteinske trake su vizualizovane bojenjem sa CBB-om kao kod SDS-PAGE. Gradijent pH je određen tako što su redom sečeni jednaki komadići gela (5x5 mm) celom dužinom odmah nakon završetka IEF-a. Komadići gela su inkubirani u 10 mM KCl 30 min kako bi amfoliti fokusirani u tom region difundovali u vodenu fazu u kojoj je zatim mereno pH. Crtanjem grafika pH u funkciji od rastojanja dobijena je prava linearnog gradijenta sa koje je potom očitavano pI proteina.

3.3.2. Određivanje čistoće, potvrda mase i karakterizacija strukture BLG-a

3.3.2.1. Reverzno-fazna HPLC hromatografija (RP-HPLC)

Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) rađena je na ÄKTA Purifier 10 HPLC sistemu (Amersham Biosciences). Za vođenje hromatografija i obradu dobijenih podataka korišćen je UNICORN 4.0 program (Amersham Biosciences). Neposredno pre analize svi uzorci su centrifugirani tokom 10 min na 12000g. RP-HPLC je rađena na Discovery BIO Wide Pore C5 HPLC (10 cm x 4,6 cm) koloni (Supleco, Sigma-Aldrich), zapremine 4,5 ml. Kolona je ekvilibrirana sa eluentom A (0,1% trifluorsirćetna kiselina, TFA) i po 1 ml uzorka je injeciran na kolonu. Komponente su eluirane linearnim gradijentom od 0 do 100% eluenta B (0.1% TFA u 90% (v/v) acetonitrilu) tokom 10

zapremina kolone, pri protoku od 0.70 ml/min. Hromatografija je praćena merenjem apsorbanca na 280 nm i 215 nm, pri ćemu su sakupljane frakcije od po 0,5 ml. Integraljenjem površina ispod proteinskih pikova na 280 nm, izraćunata je ćistoća preparata BLG-a koja je izraćena kao procentualni udeo pika BLG-a, naspram ukupne površine detektovanih proteinskih pikova. Na ovaj naćin odrećen je i procenat BLG-a u surutki pre hromatografije koji je iznosio 51%.

3.3.2.2. Elektron-sprej jonizaciona masena spektrometrija (ESI-MS)

Identitet BLG-a i njegovih izoformi, tj. potvrda molekulskih masa uraćena je na tećno-masenom sistemu 6210 Time-of-Flight LC/MS (G1969A, Agilent Technologie, Santa Klara, Kalifornija, SAD) koji je spregnut sa 1200 Series HPLC sistemom (Agilent Technologies). Korišćeni su proteinski uzorci prethodno prećišćeni od nisko molekulskih interferirajućih supstanci RP-HPLC-om kao što je opisano. Acetonitril i TFA su upareni iz uzoraka i zaostali suvi talog proteina je rastvoren u mobilnoj fazi za MS. Mobilna faza se sastojala od 1:1 smeše eluenta A (0,2% (v/v) mravlja kiselina u vodi) i eluenta B (acetonitril), pri ćemu je protok bio 0.2 ml/min. MS analiza raćena je u pozitivnom ESI modusu sa odnosom masa/naelektrisanje (m/z) u opsegu 100-3200 m/z. Za prikupljanje podataka korišćen je Agilent MassHunter Workstation Software, a za obradu podataka Agilent MassHunter Workstation Software and Analyst QS program (Agilent Technologies Ltd, Berkšir, UK).

3.3.2.3. Spektroskopija cirkularnog dihiroizma (CD spektroskopija)

Karakterizacija sekundarne i tercijarne strukture izolovanog i komercijano dostupnog BLG-a (90%, Sigma-Aldrich) vršena je pomoću CD spektroskopije. CD spektri su snimljeni na spektropolarimetru JASCO J-710 (JASCO, Tokijo, Japan). Sistem je kalibrisan sa rastvorom amonijum D-10-kamforsulfonata koncentracije 0.6 g/l i poznatog elipticiteta +190.4 mdeg na 290.5 nm. Spektri uzoraka (1 mg/ml BLG u 10 mM Na-fosfatnom puferu pH 6.5) su snimani na 25°C u dalekoj UV oblasti (180-260 nm) u kivetu

sa dužinom svetlosnog puta od 0.1 mm i u bliskoj UV oblasti (260-320 nm) u kiveti sa dužinom svetlosnog puta od 10 mm. Spektri su snimani u inkrementima od 0.2 nm brzinom 20 nm/min u atmosferi azota. Svaki spektar je snimljen po 4 puta u dva nezavisna eksperimenta i uzeta je njihova uprosečena vrednost. Rezultati su predstavljeni kao srednji molarni elipticitet aminokiselinskih ostataka proteina:

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

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

Spektri snimani u dalekoj UV oblasti su korišćeni za određivanje procentualnog udela motiva sekundarne strukture, a analiza je odrađena pomoću softvera CONTIN i SP29 proteinske baze koja je dostupna u CDPro softverskom paketu.

3.3.2.4. Ispitivanje podložnosti BLG-a raznim enzimima za umrežavanje

Za ispitivanje finih promena u strukturi, prečišćeni i standardni BLG-a su umreženi sa nekoliko enzima koji se koriste za protein-protein umrežavanje: TG, TrTyr, AgaTyr, Lacc po protokolu koji su opisali Stanic i sar. (Stanic, 2010). Tirozinaza iz *Agaricus bisporous* (AgaTyr) je kupljena od kompanije Sigma-Aldrich. Transglutaminaza iz *Streptovercillium mobaraense* (TG) je nabavljena od Ajimomoto Co.Inc. (Tokijo, Japan) i dodatno prečišćena sledeći protokol Lantto i sar. (Lantto, 2005). Lakaza iz *Trametes hirsute* (Lacc) i tirozinaza iz *Trichoderma reesei* (TrTyr) su prečišćene i okarakterisane u Finskoj na institutu VTT (Rittstieg, 2002; Selinheimo, 2006). Ukratko, reakcione smeše su sadržale: BLG koncentracije 1.7 mg/ml, jedan od enzima TG, TrTyr, AgaTyr, Lacc finalne enzimske aktivnosti 1000 nkat/g supstrata (BLG-a). Reakcija sa TG, TrTyr, AgaTyr je izvođena u 50 mM Na-fosfatnom puferu pH 8, dok je reakcija sa Lacc izvođena u 50 mM acetatnom puferu pH 4.5 sa i bez 1 mM kafeinske kiseline. Sve reakcije su trajale 20h, održavane su na 40°C u otvorenim sudovima uz konstantno mešanje. Reakcije su zaustavljene dodatkom redukujućeg pufera za uzorke za SDS-PAG elektroforezu (odeljak 3.2.2.4.) i kuvanjem 5 min na 95°C. Sve reakcije su rađene u duplikatu a kontrole su postavljene reakcije bez enzima. Step en polimerizacije proteina je analiziran SDS-PAG

elektroforezom po Laemmli-ju (Laemmli, 1970) na komercijalnim 12% gelovima ((Bio-Rad Laboratories, Ričmond, SAD) pod redukujućim uslovima, korišćenjem Bio-Rad sistema (Bio-Rad Laboratories). Vizualizacija traka je postignuta bojenjem sa CBB-om, korišćeni su markeri širokog opsega molekulskih masa (Bio-Rad).

3.3.3. Imunohemijska karakterizacija BLG-a

3.3.3.1. Proizvodnja zečjih poliklonskih antitela

Poliklonska antitela na BLG su dobijena imunizacijom zečeva prema Harboe & Ingild proceduri (Harboe i Ingild, 1973). Emulzija kojom su subkutano imunizovani zečevi prilikom prve imunizacije je pripremljena dodatkom jednake količine Freund-ovog adjuvansa rastvoru antigena, dok je za svaku sledeću imunizaciju korišćen nekompletni Freund-ov adjuvans. Imunizacija je izvršena 0, 14, 28 i 42og dana, a posle na svakih 28 dana. Pedeset prvog dana i svake druge nedelje od tada zečevi su krvareni iz ušne vene radi određivanja titra antitela. Titar antitela je određivan u direktnoj ELISA-i gde je za bunare mikrotitar pločice kuplovan BLG. U serumu posle četvrtog krvarenja su detektovana anti-BLG IgG antitela viskog titra koja su dodatno delimično prečišćena precipitacijom sa amonijum sulfatom, intenzivno dijalizovana naspram PBS i skladištena na -70°C .

3.3.3.2. Inhibicija vezivanja IgG u ELISA testu

Inhibitorna ELISA (od engl. enzyme-linked immunosorbent assay) rađena je na mikrotitar pločama sa ravnim dnom "MaxiSorb" (Nunc, Roskild, Danska) i 96 bunara. Svi koraci su rađeni na sobnoj temperaturi. U svaki bunar mikrotitar pločica je odmereno po 100 μl standarda BLG-a koncentracije 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ u karbonatnom puferu pH 9.6 (15 mM Na_2CO_3 , 35 mM NaHCO_3); kuplovanje je trajalo preko noci u vlažnoj atmosferi. Sutradan su nevezani molekuli proteina isprani iz bunara 3 puta sa po 300 μl TTBS-a (30 mM Tris sa 9 g/l NaCl (TBS) sa 1 g/l Tween 20). Nakon ispiranja bunari mikrotitar pločica su inkubirani 1h sa po 250 μl 1% ovalbumina (OVA, Sigma-Aldrich) u TTBS-u radi

blokiranja antigenom neokupiranih mesta u bunarima. Za vreme blokiranja, zečja anti-BLG antitela su inkubirana 1h sa različitim razblaženjima standardnog i izolovanog BLG-a (100 pg-100 µg-ml) u triplikatu u 0.1% OVA u TTBS-u. Finalno razblaženje antitela (1:10000) u inhibitornoj ELISA-i je bilo dovoljno da se postigne 80% vezivanja IgG za kuplovani BLG (utvrđeno prethodno u direktnoj ELISA-i). Nakon inkubiranja, 100 µl smeše antitela i proteina je odmereno u prethodno blokirane bunare i inkubiranje je nastavljeno još 2h. Zatim su bunari isprani 3x sa TTBS-om i dodato je po 100 µl antitela naspram zečjih imonoglobulina G konjugovanih sa alkalnom fosfatazom (Sigma-Aldrich), rablaženih po uputstvu proizvođača u 0.1% OVA u TTBS-u. Nakon jednočasovnog inkubiranja sa sekundarnim antitelima, bunari su isprani 2x TTBS-om i 1x TBS-om i dodato je 100 µl supstrata za alkalnu fosfatazu, koji daje rastvoran proizvod. Rastvor 0.1% p-nitrofenilfosfata (pNPP) u 10 mM dietanolaminskom puferu pH 9.5 napravljen je neposredno pred upotrebu. Apsorbanca razvijene žute boje izmerena je na A_{405nm} u ELISA čitaču (Pharmacia Biosciences).

Pre analize, od apsorbance uzorka oduzeta je apsorbanca negativne kontrole (bez primarnog antitela, ostalo je isto). Pozitivna kontrola se pravi sa dodatkom 0.1% OVA u TTBS-u primarnim antitelima umesto BLG-a tj. inhibitora. Procenat inhibicije se računa po formuli:

$$\text{Inhibicija (\%)} = [1 - (A \text{ uzorka sa inhibitorom}) / (A \text{ pozitivne kontrole})] \times 100.$$

IC_{50} vrednost inhibitora pretstavlja onu koncentraciju inhibitora koja je potrebna da bi se dobilo 50% inhibicije u odnosu na pozitivnu kontrolu i određuje se metodom linearne regresije na linearnom delu prave (% inhibicije = f(log konc. inhib.)). Analiza uzorka i crtanje grafika je rađeno u programu Origin Pro 8 (OriginLab Corporation, Northampton, SAD).

4. INTERAKCIJE IZMEĐU POLIFENOLNIH JEDINJENJA I β -LAKTOGLOBULINA

Polifenolna jedinjenja su ubihinonski konstituenti viših biljaka široko rasprostranjeni u biljkama koje se koriste uobičajeno u ishrani kao što su voće, povrće, ceralije i leguminoze, kao i u ostalim namernicama koje su biljnog porekla kao što su vino, čaj, kakao i kafa (Cheynier, 2005; Manach, 2005). Ova jedinjenja su sekundarni metaboliti biljaka obično uključeni u odbrani od ultraljubičastog zračenja ili patogena. Opisano je nekoliko hiljada polifenolnih jedinjenja koja su grupisana u različite klase na osnovu njihove osnovne hemijske strukture (kao što su tip i broj fenolnih prstenova), i u različite podklase, na osnovu specifičnih supstitucija u bazičnoj strukturi. Bitnu grupu fenolnih jedinjenja čine flavonoidi koji obuhvataju flavonole, flavone, flavanole, flavanone, antocijanidine i izoflavone (Manach, 2005). Prosečni unos polifenola je 1g dnevno. Njihovo konzumiranje smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti, kancera i dijabetesa (Lambert i Elias, 2010; Yang, 2009). U *in vivo* i *in vitro* studijama polifenoli su pokazali anti-inflamatorno, antioksidativno, hemopreventivno i neuroprotektivno dejstvo i efekat na metabolizam ugljenih hidrata, lipida i proteina (Hanhineva, 2010; McDougall, 2008; Tachibana, 2009; Wu, 2009)

U ranijim studijama pokazano je da se formiraju nekovalentne interakcije između polifenolnih jedinjenja i globularnih proteina hrane koje dovode do građenja kompleksa proteina i polifenola (Chaudhuri, 2011; Li, 2010), stabilizacije sekundarne strukture proteina (Kanakis, 2011), razvijanja proteina i precipitacije (Ma, 2011; Papadopoulou i Frazier, 2004; Siebert, 1996), promene antioksidativne moći polifenola (Arts, 2002; Niseteo, 2012). U studijama novijeg datuma su otkriveni novi efekti protein-polifenol interakcija: polifenoli su pokazali koncentracijski zavisnu inhibitornu aktivnost na agregiranje alfa sinukleina dok su istovremeno povećali razdvajanje već postojećih oligomera (Caruana, 2011), inhibirali su digestivni enzim- elastazu iz pankreasa (Brás, 2010), i smanjili vezivanje IgE antitela za alergene kikirikija (Chung i Champagne, 2009; Chung i Reed, 2012).

Na jačinu interakcija koje se formiraju utiče veličina i struktura polifenola i aminokiselinska sekvenca proteina (Frazier, 2010). Strukturna karakterizacija interakcija je ključna za razumevanje efekata građenja ovih veza. Korišćenje spektroskopske metode gašenja fluorescencije triptofana (glavna fluorofora u proteinima) se pokazalo pogodnom metodom i njome je okarakterisano vezivanje polifenola iz različitih izvora za proteine mleka (kazein i BLG), lizozim, hemoglobin, goveđi serum albumin i gama globuline (Chaudhuri, 2011; Rahimi Yazdi i Corredig, 2012; Wang, 2011; Xiao, 2011; Yuksel, 2010; Zorilla, 2011)

U većini pomenutih studija ispitivane su interakcije između čistih polifenolnih jedinjenja i model proteina. Ipak, u GIT-u proteini hrane se nalaze okruženi sa mnoštvom polifenolnih jedinjenja zajedno unetih hranom. Stoga je naš cilj bio da ispitamo i okarakterišemo interakcije između jednog globularnog proteina, BLG-a, i smeša polifenola ekstrahovanih iz izvora koji su bogati njima, zelenog i crnog čaja, kafe, kakaoa, na pH vrednostima zastupljenim u GIT-u. Protein-polifenol interakcije su okarakterisane fluorescentnom i CD spektroskopijom, ispitan je njihov uticaj na digestibilnost BLG-a (jedan od glavnih parametara alergenosti proteina hrane) i ukupnu antioksidativnu moć smeše proteina i polifenola.

4.1. Rezultati

4.1.1. Sastav polifenolnih ekstrakata često konzumiranih napitaka: zelenog i crnog čaja, kafe i kakaoa

Polifenolna jedinjenja prisutna u pripremljenim ekstraktima zelenog čaja (ZČPE), crno čaja (CČPE), kakaoa (KKPE) i kafe (KFPE) su identifikovana tečno-masenom spektrometrijom (LC-MS). Tabele sa sastavom svakog pojedinačnog ekstrakta su priložene na kraju teze. Zastupljenost glavnih komponenti polifenolnih ekstrakata korelira sa literaturnim podacima (Tabele 9.1-4, Poglavlje 9). Glavnu fenolnu komponentu u ZČPE-u čine katehini, od kojih je najzastupljeniji epigalokatehin-3-galat (EGCG) koji čini 50–60% od ukupne mase katehina (Cabrera, 2006). Fermentacijom zelenog čaja se dobija crni čaj

čiji se polifenolni sastav menja usled procesa obrade, smanjuje se koncentracija katehina a povećava se koncentracija oksidovanih visoko-molekulskih polimera (Obanda, 1996). KFPE je bogat fenolnim kiselinama; hlorogena kiselina je glavni konstituent i tokom procesa prženja kafe raspada se na kafeinsku i kvinsku kiselinu i laktone (Clifford, 1999; Farah, 2005). Glavni konstituenti KKPE-a su monomerni flavanoli katehini i zastupljeniji polimerni flavanoli proantocijanidini (Porter, 1991)

4.1.2. Analiza interakcija između polifenola i BLG-a

Metoda gašenja fluorescencije (engl. fluorescent quenching) je pogodna za određivanje konstanti vezivanja nekovalentno vezanih molekula P i Q ukoliko je P fluorescentan, a Q ne fluorescira pod istim uslovima (λ ekscitacije i emisije), i ukoliko usled nekovalentnog vezivanja Q dolazi do pada intenziteta fluorescencije, tj. gašenja zbog smanjenja broja molekula P u pobuđenom stanju. Opadanje fluorescencije je proporcionalno jačini vezivanja molekula Q za P i opisano je Stern-Volmer-ovom jednačinom:

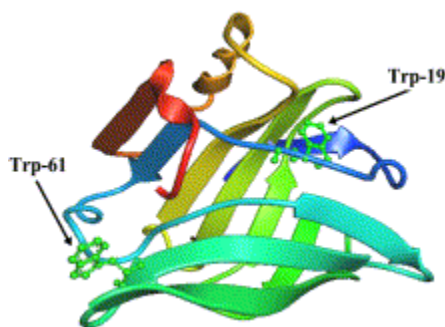
$$F_0/F = 1 + K_{sv} \times [Q] \text{ (Liang, 2007),}$$

gde su F_0 i F intenziteti fluorescencije molekula P pre i nakon dodavanja molekula Q; K_{sv} je Stern-Volmer-ova konstanta a $[Q]$ je koncentracija „kvenčera“ tj. molekula Q. U našoj postavci, P je protein a Q polifenolna jedinjenja.

BLG u primarnoj strukturi ima četiri fluorofore: dva Trp i četiri Tyr. Na 280 nm oba aminokiselinska ostatka se pobuđuju, ali je udeo u emisiji većinski od emisije Trp koja se smatra glavnom fluoroforom proteina (Liang i Subirade, 2012). Trp₁₉, sa emisionim maksimumom na 340 nm, se nalazi u unutrašnjosti globule BLG-a na dnu kaliksa u nepolarnoj mikrosredini i doprinosi 80% ukupnoj fluorescenciji BLG-a. Trp₆₁, sa emisionim maksimumom pomerenim na 350 nm, je delimično izložen polarnom rastvaraču i u blizini je disulfidnog mosta Cys₆₆-Cys₁₆₀, pa je stoga njegov doprinos ukupnoj fluorescence mali (Liang, 2007) (Slika 4.1).

Praćenje gašenja intenziteta fluorescencije BLG-a na 340 nm je korišćeno za procenu vrste i jačine interakcija između BLG-a i polifenola primenom Stern-Volmer-ove

jednačine na pH vredostima prisutnim u želucu, pH 1.2 i 2.5, i pH vrednosti u duodenumu, pH 7.2. Smanjenje intenziteta fluorescencije na 340 nm na pH 7.2, u odnosu na onaj postignut na pH 1.2 i 2.5 pod istim uslovima je posledica gašenja fluorescencije Trp₁₉ usled dimerizacije proteina (Slika 4.2) (Renard, 1998).



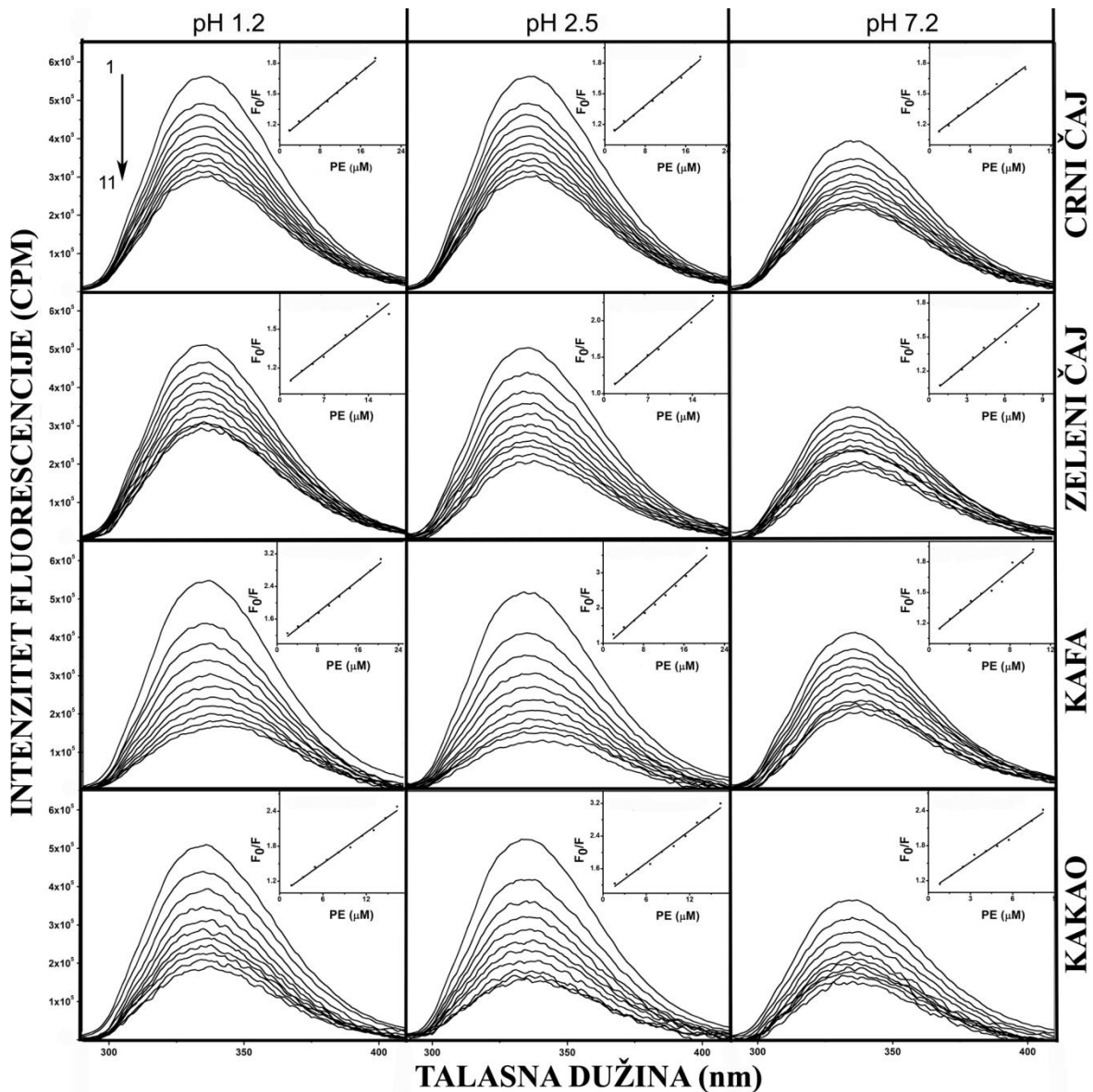
Slika 4.1. Trodimenzionalna struktura BLG-a na kojoj su označeni Trp₆₁ i Trp₁₉ (Kanakis, 2011).

Pošto polifenolna jedinjenja apsorbuju svetlosnu energiju na talasnoj dužini ekscitacije i nešto manje na talasnoj dužini emisije proteina (efekat unutrašnjeg filtera), pre primene Stern-Volmer-ove jednačine bilo je potrebno korigovati izmerene intenzitete fluorescencije na talasnoj dužini gde je maksimum emisije proteina, $\lambda = 340$ nm:

$$F = F_u \times 10^{Q_L \times (\epsilon_{\lambda_{ex}} + \epsilon_{\lambda_{em}})} \text{ (Shpigelman, 2010),}$$

gde je F_u nekorigovani izmereni intenzitet fluorescencije, $\epsilon_{\lambda_{ex}}$ i $\epsilon_{\lambda_{em}}$ su izračunati molarni ekstinkcioni koeficijenti polifenolnih ekstrakata na talasnoj dužini ekscitacije (280 nm) i emisije (340 nm) proteina izraženi u $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $[Q]$ koncentracija „kvenčera“ tj. polifenola, L dužina svetlosnog puta kivete.

Crtanjem grafika zavisnosti količnika F_0/F od koncentracije polifenola, dobija se Stern-Volmer-ov grafik sa koga se iz nagiba određuje K_{sv} (Slika 4.2). Takođe, na osnovu izgleda grafika, može se uočiti da li je efekat gašenja fluorescencije statički (usled formiranja kompleksa) ili dinamički (usled sudara molekula), i da li je prisutna samo jedna vrsta fluorofore. Ukoliko je prava linearna, u proteinu je prisutna jedna vrsta fluorofore ili je smanjenje fluorescencije posledica jednog mehanizma gašenja. Odstupanja od linearnosti



Slika 4.2. Gašenje fluorescencije BLG-a usled dodavanja alikvota polifenolnih ekstrakata (1-11, PE). Odgovarajući Stern-Volmer-ovi grafici su ubačeni u gornji desni ugao svakog fluorescentnog spektra.

ukazuju na prisustvo više fluorofora u proteinu koje nisu podjednako dostupne „kvenčeru“ ili da su uključena oba mehanizma gašenja fluorescencije. U najvećem broju slučajeva jedna fluorofora može biti pod uticajem statičkih i dinamičkih promena (Faridbod, 2011).

Sten-Volmer-ovi grafici dobijeni za sve polifenolne ekstrakte pod svim testiranim uslovima su linerani, što znači je smanjenje intenziteta fluorescencije koje smo zabeležili posledica građenja kompleksa proteina i polifenola, a ne njihovih slučajnih sudara tokom kretanja. Na osnovu toga, pristupili smo izračunavanju bimolekularne konstante „kvenčinga“ (k_q) po sledećoj jednačini:

$$K_{sv} = k_q \times \tau_0 \text{ (Lakowicz, 1999; Soares, 2007),}$$

gde je τ_0 poluživot fluorofore u odsustvu „kvenčera“. Maksimalna vrednost za k_q u vodi u slučaju kada je efekat gašenja fluorescencije ograničen difuzijom iznosi $\sim 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Poluživot fluorescencije Trp zavisi od pH i sastava pufera, i u fosfatnom puferu pH 7.0 iznosi 3.15 ns, u hlorovodoničnom puferu pH 1.2 iznosi 0.75 ns a na pH 2.5 u citratno-fosfatnom puferu iznosi 2.33 ns (Gudgin, 1981). Soares i sar. (Soares, 2007) su u ranijoj studiji odredili da je τ_0 za Trp u BLG-u na neutralnom pH 1.28 ns na λ_{ex} 280 nm. Najniža K_{sv} vrednost koji smo odredili u našoj studiji je oko 10^4 M^{-1} (Tabela 4.1), što daje korišćenjem τ_0 vrednosti od 1.28 ns, k_q iznad $10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ što je 100 puta veće od k_q vrednosti za „kvenčing“ koji je limitiran difuzijom, i ukazuje da dolazi do formiranja kompleksa između polifenola i proteina (statički „kvenčing“).

Pošto je utvrđeno da je efekat posledica statičkog „kvenčinga“, pristupili smo izračunavanju konstante vezivanja ili asocijacije (K_a) i broju mesta za vezivanje polifenola na molekulu proteina korišćenjem dvostruko-logaritamske jednačine:

$$\log[(F_0 - F)/F] = \log K_a + n \log [Q] \text{ (Lakowicz, 1999),}$$

gde se poznavanjem F_0 , F i Q , iz odsečka prave na y osi može odrediti K_a a iz nagiba n .

Sve K_a vrednosti koje su dobijene za komplekse BLG-polifenoli su u rangu slabih nekovalentnih interakcija od 10^3 do 10^5 M^{-1} (Tabela 4.1) i u skladu su sa ranije publikovanim vrednostima dobijenim istom metodologijom na neutralnom pH za BLG i polifenole iz različitih izvora: BLG-resveratrol 10^4 – 10^6 M^{-1} (Liang, 2007), BLG-EGCG 10^4 – 10^5 M^{-1} (Kanakis, 2011; Shpigelman, 2010), BLG-katehin/epikatehin $1.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (Kanakis, 2011). Promena pH nije značajno uticala na konstantu vezivanja (K_a) i broj vezivnih mesta (n) polifenola kakaoa i crnog čaja, ipak nešto veća vrednost za K_a kakaoa je zabeležena na pH 7.2. Vrednosti za K_a i n zelenog čaja su bile veće na pH 2.5 i 7.2.

Najveća i statistički značajna razlika je uočena za polifenolna jedinjenja kafe na pH 2.5 gde su K_a i n veći nego na pH 1.2 i 7.2 (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Izračunate konstante vezivanja (K_a) za komplekse BLG-polifenoli i broj polifenola koji se vezuje za molekul BLG-a (n). PE- polifenolni ekstrakt, CČ- crni čaj, ZČ- zeleni čaj, KF- kafa, KK- kakao.

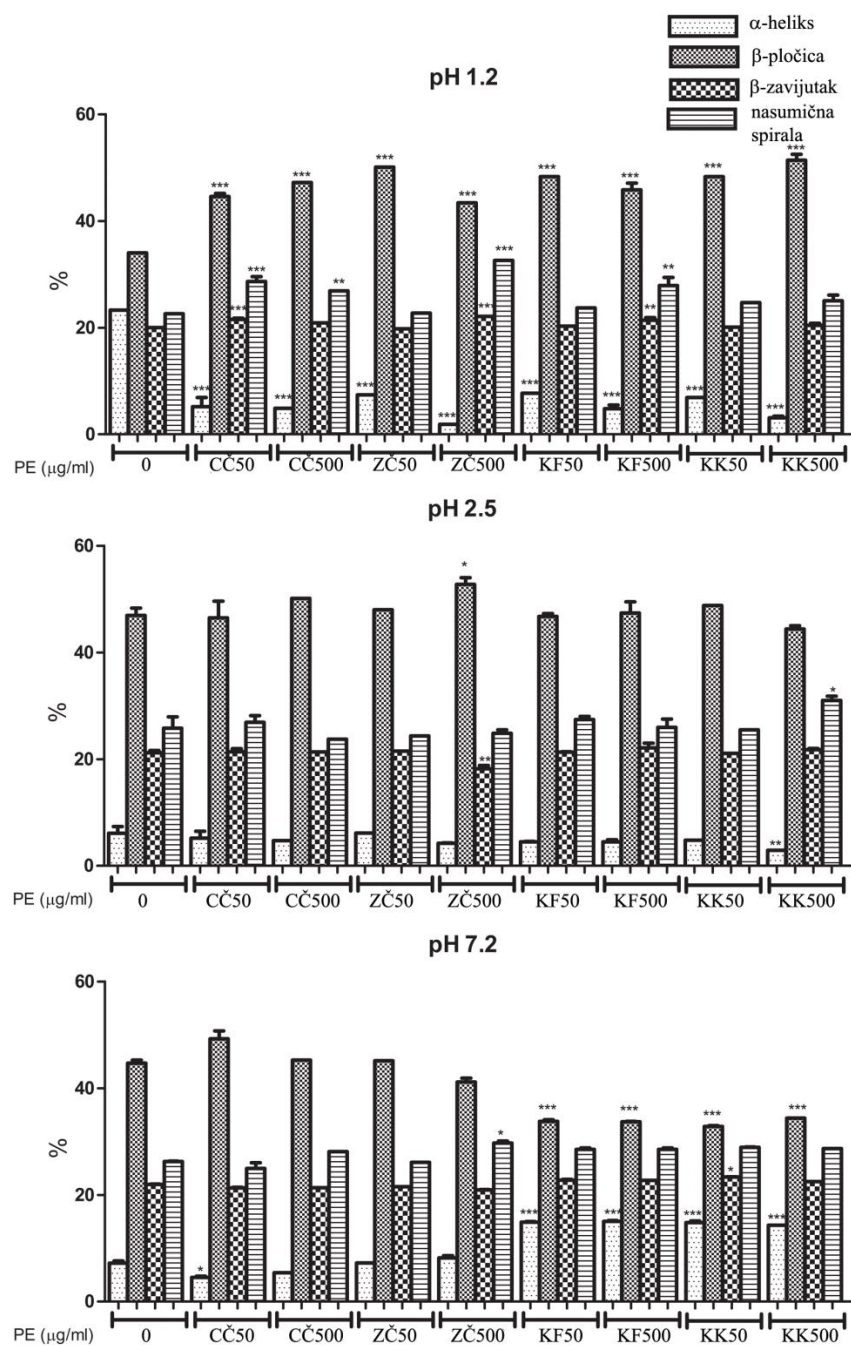
PE		pH 1.2	pH 2.5	pH 7.2
CČ	$K_a (M^{-1})^a$	$(3.08 \pm 1.54) \times 10^3$	$(4.13 \pm 0.60) \times 10^3$	$(5.85 \pm 4.40) \times 10^3$
	n	0.77 ± 0.06	0.78 ± 0.02	0.75 ± 0.10
ZČ	$K_a (M^{-1})$	$(3.82 \pm 2.77) \times 10^3$	$(3.53 \pm 2.87) \times 10^4$	$(6.54 \pm 5.82) \times 10^4$
	n	0.76 ± 0.08	1.03 ± 0.07	0.88 ± 0.21
KF	$K_a (M^{-1})$	$(4.35 \pm 0.90) \times 10^4$	$(1.44 \pm 0.41) \times 10^5$	$(3.11 \pm 4.13) \times 10^4$
	n	0.93 ± 0.02	1.04 ± 0.04	0.84 ± 0.11
KK	$K_a (M^{-1})$	$(8.15 \pm 4.50) \times 10^4$	$(9.56 \pm 1.81) \times 10^4$	$(1.46 \pm 0.81) \times 10^5$
	n	0.98 ± 0.07	0.96 ± 0.01	0.99 ± 0.05

^a Srednja vrednost \pm standardna devijacija

4.1.3. Uticaj vezivanja polifenola na sekundarnu strukturu BLG-a

Snimanjem CD spektara u dalekoj UV oblasti (180-260 nm) dobili smo uvid u promene u sekundarnoj strukturi BLG-a usled vezivanja polifenola na različitim pH, pH 1.2, 2.5 i 7.2. Takođe, izračunali smo procentualni udeo motiva sekundarne strukture pomoću algoritma CONTIN i S29 baze proteina.

Na pH 7.2 i 2.5 sekundarna struktura BLG-a je očuvana, ali je na jako kiselom pH 1.2 ona destabilizovana i dolazi do nenativnog tranzita β -pločice u α -heliks. Ranije je dokumentovano da prilikom razvijanja BLG prolazi kroz seriju intermedijera sa povećanim



Slika 4.3. Uticaj vezivanja polifenola na procentualne udele motiva sekundarne strukture BLG-a. PE- polifenolni ekstrakt, CČ- crni čaj, ZČ- zeleni čaj, KF- kafa, KK- kakao. Razlike su statistički značajne u odnosu na kontrolu (BLG bez PE-a) ukoliko je $p < 0.05$ (*), $p < 0.005$ (**) i $p < 0.001$ (***).

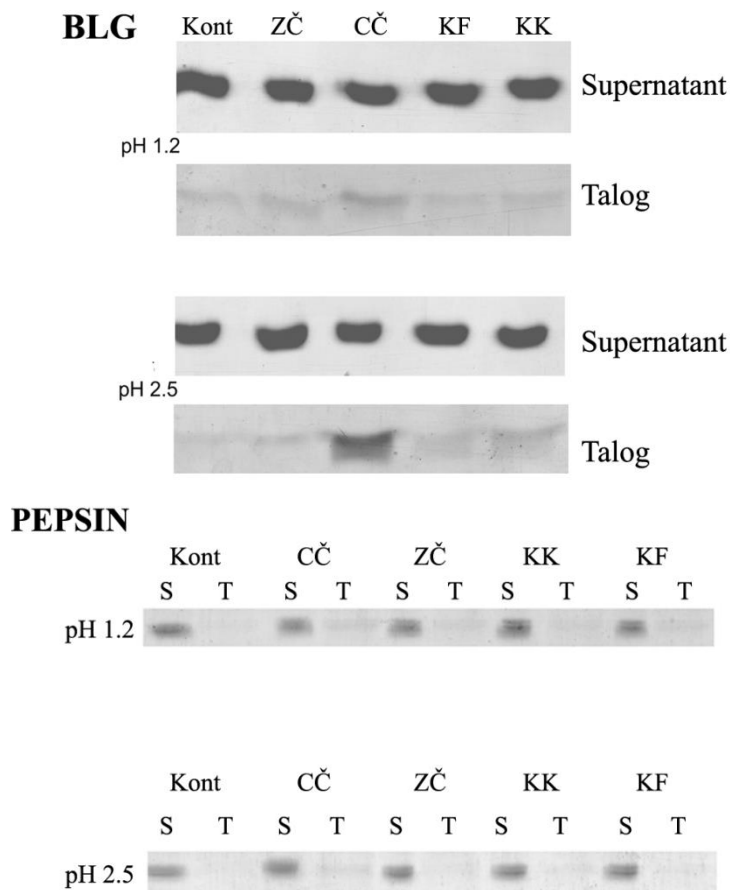
sadržajem α -heliksa u odnosu na nativni protein (Ragona, 1999). Sadržaj α -heliksa je bio veći za 15% na pH 1.2, uglavnom na račun smanjenja % β -pločica (Slika 4.3). Usled vezivanja fenolnih jedinjenja iz sva četiri ekstrakta, na pH 1.2 sekundarna struktura se stabilizovala i očuvao se sadržaj β -pločica kao u nativnom BLG-u. Na pH 2.5 nije zapažen uticaj fenola na sekundarnu strukturu BLG-a, ali su zato na pH 7.2 polifenoli kafe i kakaoa značajno destabilizovali strukturu inicirajući povećanje α -heliksa i zavojnica. Nije uočeno koncentracijski zavisno povećanje efekata, sa 50 i 500 $\mu\text{g/ml}$ polifenola efekat je bio isti jer smo već sa nižom koncentracijom bili u opsegu koncentracija polifenola iznad konstante disocijacije. Ovo je potvrda da su parametri vezivanja određeni Stern-Volmer-ovom analizom relevantni.

4.1.4. Promene u digestibilnosti BLG-a usled vezivanja polifenola

Pošto u ljudskom želucu pH varira u granicama od 1.2 do 2.5, sa izuzetkom nekih patoloških stanja gde može biti i 4.0 (Ulleberg, 2011), uradili smo pepsinsku digestiju BLG-a sa i bez prisustva polifenola upravo na tim fiziološkim granicama kiselosti. Digesti su analizirani SDS-PAG elektroforezom i opadanje intenziteta trake nedegradovanog BLG-je semikvantitativno određeno denzitometrijom. Crtanjem grafika zavisnosti procenta nedigestivnog BLG-a u funkciji vremena i fitovanjem u eksponencijalnu jednačinu prvog reda određene su T_{50} vrednosti, tj. polu-život BLG-a pod datim uslovima. Svi testirani polifenolni ekstrakti su pokazali inhibitorni efekat na digestiju BLG-a pepsinom što se vidi po povećanju T_{50} vrednosti u njihovom prisustvu (Tabela 4.2). Najpotentnijim inhibitorima su se pokazali ekstrakti kafe i kakaoa koji su na pH 1.2 dvostruko usporili digestiju BLG-a. Polifenolni ekstrakt kafe je bio još potentniji na pH 2.5, gde je usporio hidrolizu BLG-a trostruko, što je rezultovalo zaostajanjem 39% intaktnog proteina nakon 6h digestije.

Nekovalentno vezivanje polifenola za protein može dovesti do njegove precipitacije usled formiranja agregata sa smanjenom rastvorljivošću kao što je pokazano ranije za tanine, polifenole polimerne strukture (Martínez i Moyano, 2003). Ukoliko dođe do formiranja nesolubilnih agregata, smanjen je kontakt između proteina i pepsina što dovodi do smanjenja digestije. Test precipitacije je urađen inkubiranjem polifenolnih ekstrakata i

BLG-a ili pepsina u puferima pH 1.2 i 2.5, zatim je centrifugiranjem odvojen supernatant a talog je resuspendovan u početnoj količini pufera i obe frakcije su analizirane SDS-PAG elektroforezom. Na pH 1.2 nije došlo do precipitacije proteina u prisustvu polifenola, a na pH 2.5 mala precipitacija BLG-a ali ne i pepsina je primećena. Na pH 2.5 ekstrakt crnog čaja je pokazao najveći precipitirajući efekat (Slika 4.4).



Slika 4.4. Uticaj dodatka polifenolnih ekstrakata na precipitaciju BLG-a i pepsina na pH 1.2 i 2.5. Kont- protein bez polifenola, CČ- crni čaj, ZČ- zeleni čaj, KF- kafa, KK- kakao. S- supernatant, T- talog.

Intestinalna degradacija proteina *in vitro* je uglavnom rađena sa pankreatinom na pH 7.2. Inhibitorski efekat polifenola na digestiju BLG-a nije bio tako izražen kao u

pepsinskoj digestiji. Jedino su ekstrakti kafe i kakaoa pokazali inhibitorni efekat usporavajući digestiju do 1.5 puta (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Izračunate T_{50} (%) vrednosti za pepsinsku i pankreatinsku digestiju BLG-a u prisustvu polifenolnih ekstraktata (PE), kao i % BLG-a na kraju digestije. CČ- crni čaj, ZČ- zeleni čaj, KF- kafa, KK- kakao.

PE:	$T_{50\%}$ [min] ^b			% BLG-a na kraju digestije (posle 6h) ^{a,b}	
	Pepsin pH 1.2	Pepsin pH 2.5	Pankreatin pH 7.2	Pepsin pH 1.2	Pepsin pH 2.5
0	72 ± 2	82 ± 5	6.5 ± 0.5	3.0 ± 0.1	4.4 ± 0.9
ZČPE	100 ± 3	95 ± 6	2.1±0.5	12±4	15±10
CČPE	117 ± 17	129 ± 45	6.6±0.8	8 ± 1	7 ± 1
KFPE	164 ± 83	264 ± 35	10.8±0.8	21±3	39±5
KKPE	164 ± 13	185 ± 10	11.1±0.2	22 ± 3	26 ± 2

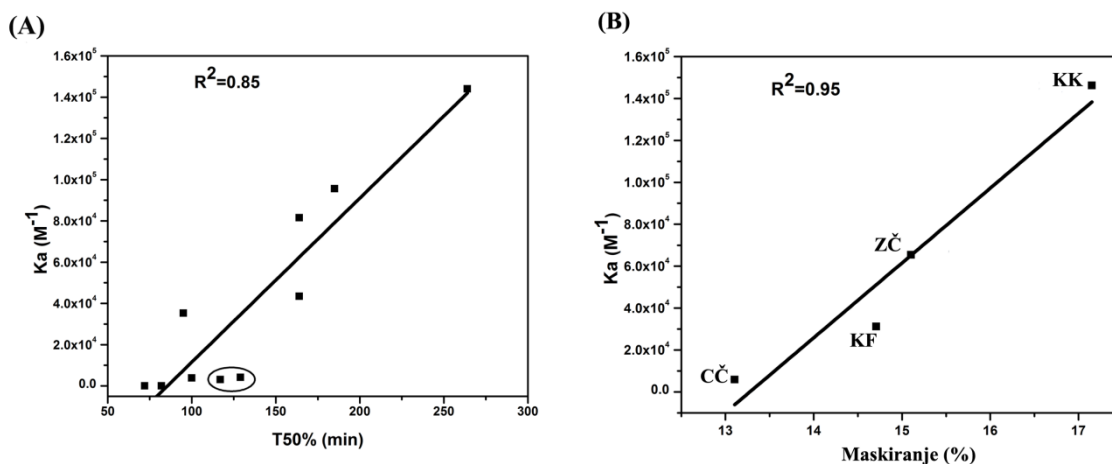
^a Procenat zaostalog proteina u odnosu na polaznu količinu.

^b Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standradna devijacija.

4.1.5. Maskiranje ukupnog antioksidativnog kapaciteta formiranjem kompleksa BLG-polifenoli

Antioksidativna aktivnost polifenolnih jedinjenja je glavni uzrok većine zabeleženih povoljnih efekata po ljudsko zdravlje. Korišćenjem testa dekolorizacije ABTS katjon radikala i sintetičkog analoga vitamina E, Trolox-a odredili smo antioksidativni kapacitet ekstrakata koji izražen u ekvivalentima antioksidativnog kapaciteta Trolox-a, (TEAC, μM polifenola/ μM Trolox), iznosi za zeleni čaj 1.70 ± 0.55 , crni čaj 0.79 ± 0.22 , kafu 1.16 ± 0.32 i kakao 2.10 ± 0.52 . Osim polifenola i proteini pokazuju antioksidativnu aktivnost ali u manjoj meri. Mešanjem proteina i polifenola, ukupni antioksidativni kapacitet smeše može biti smanjen usled formiranja nekovalentnih veza (Khan, 2011). Smanjenje antioksidativnog kapaciteta je izračunato oduzimanjem antioksidativnog kapaciteta smeše proteina i

polifenola od sume antioksidativnih kapaciteta proteina i polifenolog ekstrakta koji su određeni zasebno. Pod fiziološkim uslovima na pH 7.2 zabeleženo je smanjenje antioksidativnog kapaciteta od 13-15% što je u saglasnosti sa ranije objavljenim rezultatima za slične protein-polifenol sisteme (Arts, 2002).



Slika 4.5. A) Korelacija između konstanti vezivanja K_a i poluraspada proteina pri pepsinskoj digestiji na pH 1.2 i 2.5, zaokružene su tačke koje odgovaraju T_{50} vrednostima crnog čaja. B) Korelacija između konstanti vezivanja K_a i % maskiranja antioksidativnog kapaciteta na pH 7.2, KK- kakao, ZČ- zeleni čaj, KF- kafa, CČ- crni čaj.

4.2. Diskusija

Stern-Volmer-ovom analizom ispitane su interakcije između polifenola i BLG-a. Na svim fiziološkim pH vredostima formirale su se nekovalentne interakcije, uticaj pH na jačinu interakcija nije bio dramatičan, ali svakako nije zanemarljiv. Razlike u jačini interakcija na kiselom i neutralnom pH (povećanje K_a i n kod zelenog čaja i kakaoa) se mogu objasniti konformacionim pH zavisnim promenama BLG-a. Ispod pH 2, BLG je monomer koji zadržava većinu svoje sekundarne strukture ali gubi se nativna tercijarna struktura. Oko pH 3 BLG dimerizuje sa malim promenama u strukturi, u pH opsegu 4.5-6 je prelaz između oblika Q sa labavijom tercijarnom strukturom (na pH 4.5) i oblika N sa

kompaktnom globularnom strukturom (pH 6.5), ali bez narušavanja sekundarne strukture. Između pH 6 i 8 dolazi do konformacionih promena, poznatih kao Tanfordovi prelazi sa pikom na pH 7.5 (Taulier i Chalikian, 2001). Glavna strukturna promena do koje dolazi prilikom Tanfordovih prelaza je repositioniranje EF petlje na poziciji od 85-90, koja na pH vrednostima ispod 7 zatvara hidrofobnu unutrašnjost β -burenceta tj. čašicu (eng. calyx). EF petlja se pomera, unutrašnjost postaje dostupnija i otvor β -burenceta postaje negativno naelektrisan usled deprotonizacije Glu₈₉ (Tanford, 1959). Ove promene uslovljavaju jače vezivanje (veće K_a) i bolje usidravanje (n) polifenolnih jedinjenja zelenog čaja i kakaoa. Do promena u vezivnim parametrima polifenola crnog čaja ne dolazi, možda zbog sternih smetnji jer u ekstraktu ima polimerizovanih polifenola. Sa druge strane, polifenoli kafe se značajno jače vezuju na pH 2.5 nego na pH 7.2, što je verovatno posledica elektrostatičkog odbijanja između negativno naelektrisanog otvora β -burenceta i negativno naelektrisanih fenolnih kiselina kojima je ekstrakt bogat. Hlorogena kiselina ima pKa vrednost između 3.4 i 3.6 (Clifford, 1999), kafeinska 4.6, kvinska 3.4 (Farah, 2005). Razlika u jačini vezivanja polifenola kafe između pH 1.2 i 2.5 nastaje verovatno usled nedostatka native strukture proteina.

Da interakcije između polifenola i proteina imaju direktne posledice na njihove biološke funkcije pokazuje i dobra koleracija između jačine K_a na pH 1.2 i 2.5 i povećanja T_{50} vrednosti za digestiju BLG-a pepsinom ($R^2=0.85$) i između K_a na pH 7.2 i smanjenja ili maskiranja ukupnog antioksidativnog kapaciteta ($R^2=0.95$) (Slika 4.5). Polifenoli vezani za BLG štite protein od digestije pepsinom, što se jasno uočava stabilizacijom sekundarne strukture kada je to potrebno na pH 1.2. Do precipitacije BLG-a dolazi samo u prisustvu polifenola crnog čaja na pH 2.5, što se uočava i na grafiku $K_a=f(T_{50})$ odstupanjem ovih tački od linearanosti, ukoliko se one izuzmu koeficijent korelacije je 0.92. Usled precipitacije BLG-a u prisustvu fenola crnog čaja, smanjuje se njegova dostupnost pepsinu, pa je digestija usporena zbog formiranja nerastvornih agregata a ne specifičnih interakcija sa polifenolima. Efekat smanjenja ukupnog antioksidativnog kapaciteta strogo zavisi od jačine interakcija i najviše utiče na one ekstrakte sa najvećim antioksidativnim kapacitetom (kakao i zeleni čaj) što ukazuje da hidroksilne grupe polifenola koje su ključne za njihovu antioksidativnu aktivnost grade vodonične veze sa aminokiselinskim ostacima proteina.

4.3. Materijal i metode

4.3.1. Priprema i karakterizacija polifenolih ekstraktata

4.3.1.1. Ekstrakcija

Polazne sirovine su kupljene u lokalnoj prodavnici. Deset grama prethodno usitnjenih suvih listova crnog i zelenog čaja i mlevene kafe (mešavna Arabike i Robuste) su kuvani 10 min sa po 100 ml destilovane vode. Nakon hlađenja do sobne temperature, 40 ml CH₃OH je dodato vodenom ekstraktu čajeva a 20 ml CH₃OH je dodato vodenom ekstraktu kafe i ekstrakcija je nastavljena još 1h uz stalno mešanje. Zatim su ekstrakti centrifugirani 30 min na 4000g i i supernatant je liofilizovan. Suvi talog polifenola čaja je reuspendovan u odgovarajućoj zapremini destilovane vode. Talog polifenola kafe je nakon liofilizovanja resuspendovan u destilovanoj vodi i odmašćen sa C₂Cl₄ (odjeljak 3.1.1.1), vodeni sloj je sačuvan i dodatno deproteinizovan ultrafiltracijom (cut off membrane 5 kDa). Pet grama kakaoa u prahu je ekstrahovano 1h sa 20 ml 16 mM HCl u 50% CH₃OH (v/v). Nakon centrifugiranja, zaostali talog je opet ekstrahovan još 1h sa dodatkom 20 ml 70 % acetona (v/v). Supernatanti iz prve i druge faze ekstrakcije kakaoa su spojeni, deproteinizovani, liofilizovani pa zatim resuspendovani u minimaloj zapremini destilovane vode.

4.3.1.2. Određivanje koncentracije ukupnih fenolnih jedinjenja

U svim ekstraktima je određena koncentracija fenolnih jedinjenja pre skladištenja na -20°C. Koncentracija je određena pomoću Folin-Ciocalteu reagensa po metodi Chun i sar. (Chun, 2003) i izražena u µg/ml ekvivalenata galne kiseline koja je korišćena kao standard (GAE, od engl. **gallic acid equivalents**). U 0.1 ml razblaženog uzorka dodato je 0.9 ml vode i 0.1 ml Folin-Ciocalteu-ovog reagensa (Sigma-Aldrich). Posle 5 min inkubiranja, dodato je 1.4 ml 5% NaCO₃ i nastavljeno je sa inkubiranjem još 90 min na sobnoj temperaturi. Apsorbanca je merena na 750 nm naspram slepe probe korišćenjem galne kiseline (Sigma-Aldrich) kao standrada u opsegu od 50 do 500 µg/ml. Koncentracija ukupnih fenola je

izražena i u g/mol pomoću uprosečenih molaskih masa izračunatih korišćenjem podataka o sastavu dobijenih LC-MS analizom. Uprosečene molske mase iznose za ekstrakt crnog čaja 420 g/mol, zelenog čaja 459.7 g/mol, kafe 387 g/mol, kakaoa 487.63 g/mol.

4.3.1.3. Određivanje sastava polifenolnih ekstrakata

Sastav polifenolnih ekstrakata okarakterisan je tečno-masenom spektrometrijom, na sistemu LTQ Orbitrap XL hybrid FTMS (Thermo Fisher Scientific, USA) koji je opremljen UPLC-om Accela 600 (Thermo Fisher Scientific) sa C18 Hypersil GOLD kolonom, 50 x 2.1 mm, 1.9 µm veličina čestice (Thermo Fisher Scientific). Za eluciju je korišćen sistem sa dva rastvarača, eluent A je bio vodeni rastvor 0.1% mravlje kiseline a eluent B 98% acetonitril i 0.1% mravlja kiselina. Komponente sa kolone su eluirane lineranim gradijentom eluenta B od 5 do 95% pri protoku od 400 µl/min. Nakon razdvajanja na koloni komponente su jonizovane u sistemu pomoću ESI izvora pri temperaturi od 400°C i voltaži od -4 kV. Analiza je urađena u negativnom modulu u opsegu od masa od 120-1000 m/z pomoću Xcalibur softvera i ToxID Automated Screening softvera (Thermo Scientific). Komponente su identifikovane poređenjem tačnih masa, molekulskih formula izvedenih iz Mass Frontier Spectral Interpretation softvera (Thermo Fisher Scientific) i spektara sa literaturnim podacima i internom bazom spektara standrada polifenolnih jedinjenja.

4.3.2. Karakterizacija polifenol-protein interakcija fluorescentnom i CD spektroskopijom

4.3.2.1. Fluorescentna spektroskopija

Fluorescentni spektri su snimani na spektrofotometru FluoroMax-4 (Horiba Scientific, Kyoto, Japan) na sobnoj temepraturi (25°C) u kvarcnoj kiveti od 10x10 mm. Kako su interakcije između polifenola i BLG-a ispitivane na pH vrednostima koje su zastupljene u GIT-u, snimani su spektri na pH 1.2 (0.1 M HCl sa 2 g/l NaCl) , 2.5 (0.1 M

glicin-HCl) i 7.2 (fiziološki rastvor puferisan fosfatom, PBS). U kivetu je odmereno 2.5 ml rastvora proteina u odgovarajućem puferu koncentracije 2.5 $\mu\text{g/ml}$ (0.14 μM) pripremljen neposredno pred upotrebu. U malim inkrementima, 10 x 2 μl na pH 1.2, 2.5 i 10 x 1 μl na pH 7.2, su dodavani vodeni rastvori polifenolnih ekstrakata koncentracije 1 mg/ml. Nakon dodatka svakog alikvota, smeša je blago promešana okretanjem kivete sa poklopcem i odmah je sniman fluorescentni spektar proteina pod sledećim uslovima: λ ekscitacije 280 nm, λ emisije 290-410 nm, prorez širine 5 nm. Ekscitacijom na 280 nm pobuđuju se aminokiselinski ostaci i Trp i Tyr u proteinu, mada veći udeo fluorescencije potiče od Trp (Lakowicz, 1999). Između dva nezavisna merenja kiveta je ispirana 3x sa odgovarajućim puferom. Zbog osobine polifenola da fluoresciraju, za svaku koncentraciju polifenola je pripremana slepa proba u kojoj je umesto proteina bio samo pufer. Spektar svakog uzorka je pre analize korigovan oduzimanjem spektra slepe probe za odgovarajuću koncentraciju polifenola (Soares, 2007). Svi eksperimenti su rađeni u triplicatu, a njihovi uprosečeni spektri su korišćeni za računanje vezivnih parametara. Za obradu spektara korišćen je softver Origin Pro 8, a za statističku obradu je korišćena jednosmerna ANOVA sa Bonferroni testom.

4.3.2.2. CD spektroskopija

CD spektri BLG-a sa i bez polifenola su snimljeni u dalekoj UV oblasti (180-260 nm) na JASCO J-815 spektrofotometru kao što je opisano u odeljku 3.4.2.3. Koncentracija BLG-a u uzorcima je bila 1 mg/ml, a polifenola 50 i 500 $\mu\text{g/ml}$. Korišćeni su isti puferi kao pri snimanju fluorescentnih spektara, sa izuzetkom pufera na pH 7.2 gde je umesto PBS-a korišćen 20 mM fosfatni pufer. Koncentracija fosfata je ista kao u PBS-u ali bez NaCl koji prisutan u visokoj koncentraciji ometa snimanja. Svaki spektar je sniman po dva puta u dva nezavisna eksperimenta. Za kalkulaciju procentualnog udela motiva sekundarne strukture korišćen je CONTIN program i SP29 baza proteina dostupna u okviru CDPro softverskog paketa. Statistička analiza je urađena pomoću jednosmerne ANOVA sa Dunnett testom.

4.3.3. Testovi digestibilnosti i precipitacije proteina

4.3.3.1. *In vitro* digestija pepsinom

Ukratko, 40 μ l BLG-a (5 mg/ml) sa ili bez 100 μ l polifenola (2 mg/ml) je razblaženo sa 260 μ l miliQ vode i 200 μ l 4 x koncentrovanog simuliranog gastričnog fluida, SGF, (0.4 M HCl sa 8 g/l NaCl, pH 1.2 or 2.5). Smeše su zagrejane na 37°C, provereno je pH i podešeno ukoliko je potrebno do pH 1.2 ili 2.5 pomoću 0.5 M HCl. Zatim je u smešu dodato 200 μ l prethodno termostatiranog rastvora pepsin A (Sigma-Aldrich, 2300 U/mg) koncentracije 4 g/l u 0.02 M HCl sa 0.4 g/l NaCl pH 1.2 ili 2.5. Finalni odnos jedinica enzimske aktivnosti pepsina i μ g BLG-a je bio 10:1, kao što je preporučeno po US Pharmacopeia-i (Thomas, 2004). Digestija se odvijala na 37°C uz konstantno mešanje. Alikvoti od 80 μ l su vađeni nakon 0.25, 0.5, 1, 2, 3 i 6h digestije i reakcija je u njima stopirana prvo sa 11 μ l 2 M Na₂CO₃ a zatim sa dodatkom 22 μ l 5x koncentrovanog redukujućeg pufera za SDS-PAGE (3.4.1.4.) i kuvanjem 5 min na 95°C. Kontrola pepsin je spremljena na isti način kao i uzorci ali bez dodatka BLG-a. Nulto vreme digestije je pripremljeno dodatkom miliQ vode umesto rastvora pepsina. Sve digestije su rađene u dupilkatu i analizirane SDS-PAG elektroforezom na 14% gelu (odeljak 3.4.1.4) uz korišćenje denzitometrijskog programa Gel-Pro Analyzer 3.0 (Media cybernetics, Betesda, SAD).

4.3.3.2. *In vitro* digestija pankreatinom

Pripremljena je smeša koja je sadržala 0.5 mg/ml BLG-a i 0.5 mg/ml PE-a u 20 mM Na-fosfatnom puferu pH 7.2 i termostatirana je na 37 °C. Alikvot od 200 μ l je izvađen i dodat u ependorf koji je sadržao 200 μ l termostatiranog rastvora pankreatina (ekstrakt pankreasa svinje, Sigma-Aldrich) koncentracije 0.4 mg/ml u 80 mM Na-fosfatnom puferu pH 7.2. Digestija se odvijala na 37°C uz konstantno mešanje. Nakon 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 i 60 minuta vađeni su ailkvoti od 40 μ l i reakcija je stopirana dodatkom 10 μ l 5x redukujućeg pufera za SDS-PAGE i kuvanjem 5 min na 95°C. Digestija BLG-a

pankreatinom je urađena i bez prisustva polifenolnih ekstrakata. Kontrola pankretaina je pripremljena bez dodatka BLG-a. Kontrola BLG-a je pripremljena bez dodatka pankreatina. Sve digestije su rađene u duplikatu i analizirane SDS-PAG elektroforezom na 14% korišćenjem denzitometrijskog programa Gel-Pro Analyzer 3.0 (Media Cybernetics, Inc, SAD).

4.3.3.3. Ispitivanje precipitacije BLG-a i pepsina polifenolima

Polifenolni ekstrakti i rastvori proteina su razblaženi puferima pH 1.2 and 2.5. U ependorf tubu je odmereno 150 μ l polifenolnih ekstrakata koncentracije 0.33 mg/ml i 50 μ l BLG-a ili pepsina koncentracije 1 mg/ml. Provereno je pH, po potrebi dodatno podešeno i inkubacija je nastavljena 2h na 37°C uz konstantno mešanje. Nakon isteka vremena, uzorci su centrifugirani 20 min na 12100 g. Supernatant je odvojen pažljivo od taloga i dodato je u njega 50 μ l 5x redukujućeg pufera za SDS-PAGE. Zaostali talog je resuspendovan u 200 μ l 1x redukujućeg pufera za SDS-PAGE. Uzorci su skuvani 5 min na 95% i analizirani na 14% gelu SDS-PAG elektroforezom.

4.3.4. Određivanje totalnog antioksidativnog kapaciteta

Antioksidativna aktivnost je određena testom obezbojavanja plavo-zelenog katjon radikala ABTS-a (2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6-sulfonska kiselina, Sigma-Aldrich) po protokolu Re i sar. (Re, 1999). Monokatjonski radikal ABTS^{•+} se generiše direktno reakcijom ABTS-a sa kalijum persulfatom u molskom odnosu 1: 0.5, tako da dolazi do nekompletne oksidacije ABTS-a. Nastali ABTS^{•+} ima apsorpcione maksimume na 645 nm, 734 nm, 815 nm i 415 nm. Dodatak antioksidansa redukuje preformirani ABTS^{•+} do ABTS-a proporcionalno antioksidativnoj aktivnosti, koncentraciji antioksidansa i trajanju reakcije. Nivo dekolizacije određuje kao procenat inhibicije ABTS^{•+}-a u funkciji od koncentracije i vremena i izračunava se u odnosu na reaktivnost nekog standarda.

Protokol je modifikovan za rad u mikrotitar pločici. Ukratko, 7 mM ABTS u miliQ vodi je pomešan sa 2.45 mM kalijum persulfatom u miliQ vodi i ostavljen da stoji 12-16 h

na mračnom mestu na sobnoj temperaturi pre upotrebe. Neposredno pred rad rastvor ABTS^{•+} je razblažen pomoću PBS-a pH 7.2 tako da mu je apsorbancija na 630 nm bila 0.70 (± 0.02). Odabrane su koncentracije polifenolnih ekstrakata i BLG-a koje dovode do 20-80% inhibicije rastvora ABTS^{•+}. Kao standard korišćen je Trolox u opsegu koncentracija 0-35 μM (u vodi rastvoran analog vitamina E, 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilna kiselina, Sigma-Aldrich). Određen je antioksidativni kapacitet polifenolnih ekstrakata na pH 7.2 i izražen je u ekvivalentima Trolox-a (TEAC, μM polifenola/ μM Trolox). U kivetu je odmereno 125 μl razblaženog ABTS^{•+}-a, 5 μl polifenolnog ekstrakta koncentracije 0.1 mg/ml i 20 μl BLG-a koncentracije 5 mg/ml u PBS-u. Apsorbancija na 630 nm je očitavana na svaki minut tokom 6 min. Prilikom određivanja pojedinačnih antioksidativnih aktivnosti polifenolnih ekstrakata ili BLG-a rađeno je po istom protokolu samo sa dodatkom PBS-a umesto druge komponente. Procenat maskiranja antioksidativnog kapaciteta (AC) je izračunat kao razlika između ($AC_{\text{PE}} + AC_{\text{BLG}}$) i $AC_{(\text{BLG}+\text{PE})}$. Svi eksperimenti su urađeni u triplicatu.

5. MODIFIKACIJE β -LAKTOGLOBULINA ULTRAZVUKOM VISOKOG INTENZITETA

Hidrolizati mleka se već godinama koriste kao zamena za mleko kod novorođenčadi sa razvijenom alergijom na mleko. Međutim, osim neprijatnog gorkog ukusa, korišćenje ovih formula dovodi do zabrinjavajućih posledica po zdravlje dece: smanjenja rasta, smanjenja koncentracije proteina u plazmi i kapaciteta za vezivanje gvožđa, nebalansiranih koncentracija pojedinih aminokiselina u urinu i plazmi (Hernell i Lönnerdal, 2003). Štaviše, životinje koje su hranjene hidrolizatima mleka posedovale su jače proteolitičke aktivnosti tripsina i himotripsina u duodenumu, povišen nivo citohroma u jetri i poremećen metabolizam glukokortikoida (Ross, 2003). Kako su pacijenti sa alergijom na mleko uglavnom novorođenčad koja ne mogu da izbegavaju mleko, postoji pritisak na tržištu za razvojem novih postupaka za obradu mleka koji će prevazići probleme koji nastaju sa hidrolizatima.

Skorija istraživanja u tom pravcu su se fokusirala na ne-termalne metode obrade hrane. Pokazano je da pritisak, ultrazvuk visokog intenziteta i enzimsko umrežavanje proteina mogu efiksano da promene digestibilnost alergena hrane i sposobnost za vezivanje IgE-a (Husband, 2011; Ross, 2003). Ultrazvuk se koristi u industriji mleka za inaktivaciju enzima i bakterija, homogenizaciju, kristalizaciju, degaziranje i ekstrakciju različitih komponenti i za promenu fizičkih karakteristika gelova napravljenih od mleka i koncentrata proteina mleka (Villamiel i de Jong, 2000) .

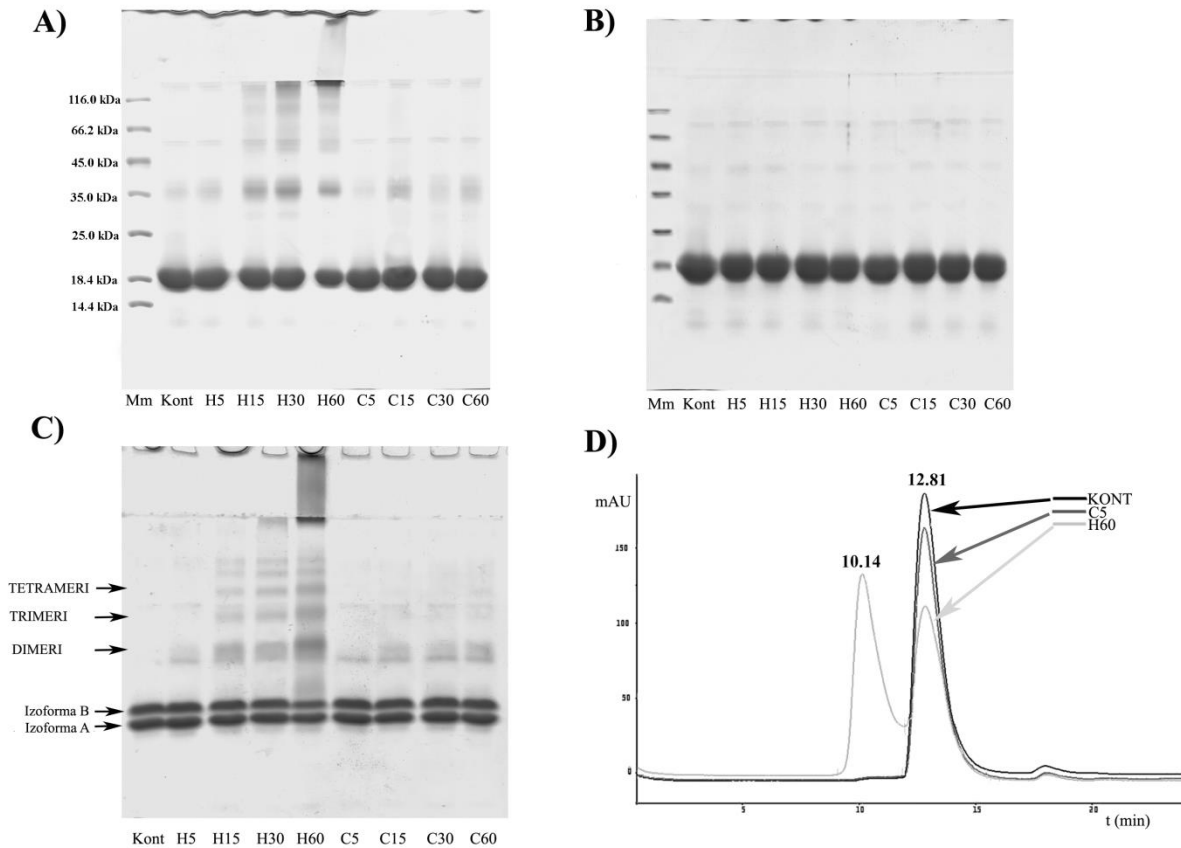
Efekat ultrazvuka na proteine je razmatran u mnogim studijama (Owen, 1957; Conway, 1966; Pavlovskaya, 1992; Suzuki, 1996) praćenjem promena u hidrataciji i konformaciji proteina. Ovi parametri su u vezi sa funkcionalnim osobinama proteina hrane kao što su rastvorljivost, sposobnost pravljenja pene i fleksibilnost. Kako i koliko će tretman ultrazvukom promeniti strukturu proteina može zavisiti od njegove molekulske mase i strukturne organizacije (Marchioni, 2009). Za razliku od drugih metoda, npr. mikrotalasa, pri radu sa ultrazvukom, lakše je odvojeno posmatrati termalne od ne-termalnih efekata ako se sistem efikasno hladi, zbog manjeg generisanja toplote na makroskopskoj skali.

Cilj ovog dela rada bio je da se ispita uticaj nove tehnologije za preradu hrane, ultrazvuka visokog intenziteta, na strukturu i alergenosnost važnog alergena surutke BLG-a, u populaciji pedijatrijskih pacijenata alergičnih na mleko. Naši rezultati ukazuju na potencijal blagih kontrolisanih uslova prerade na smanjenje alergenijskih svojstava kompaktnih globularnih proteina usled narušavanja konformacionih IgE vezujućih epitopa, kao i na klinički značaj dimera i oligomera formiranih sonifikacijom.

5.1. Rezultati

5.1.1. Sonifikacijom uzrokovana polimerizacija BLG-a

BLG je tretiran ultrazvukom 5, 15, 30 i 60 min u uslovima kontrolisane (25-35°C, skraćenica za tretirane forme od engl. cooling- $C_{(\text{vreme izlaganja})}$), ili nekontrolisane temperature u uzorku (max temperatura koja se postiže u uzorcima je 65°C, skraćenica za tretirane forme od engl. heating- $H_{(\text{vreme izlaganja})}$). Razlog za ovakvu postavku eksperimenta je razdvajanje termalnih od ne-termalnih efekata ultrazvuka na strukturu BLG-a (2.7.1). Proteinski uzorci nakon tretmana su analizirani elektroforetski. Zapaženo je formiranje dimera, trimera, tetramera i većih polimera BLG-a u uzorcima koji su sonifikovani u uslovima povećane temperature. U uzorcima koji su hlađeni za vreme tretmana primetno je samo formiranje dimera. Stepem polimerizacije se povećavao sa vremenom tretmana, tako da je nakon 60 min nastala značajna količina polimera velikih molekulskih masa (>116 kDa, slika 5.1.A). Sve intermolekulske veze koje su se formirale mahom nastaju izmenom disulfida, kao što se vidi na SDS-PAGE gelu u redukujućim uslovima nema polimera za razliku od gela u neredukujućim uslovima gde su prisutni (Slika 5.1.B). Obe izoforme BLG-a su učestovale u formiranju agregata, mada ima indikacija da je izoforma B podložnija polimerizaciji (Slika 5.1.C). Gel filtracijom je određeno da nakon 60 min tretmana ultrazvukom bez kontrole temperature 50% BLG-a agrerira u poređenju sa nativnim proteinom ili proteinom tretiranim ultrazvukom uz kontrolu temperature (Slika 5.1.D).

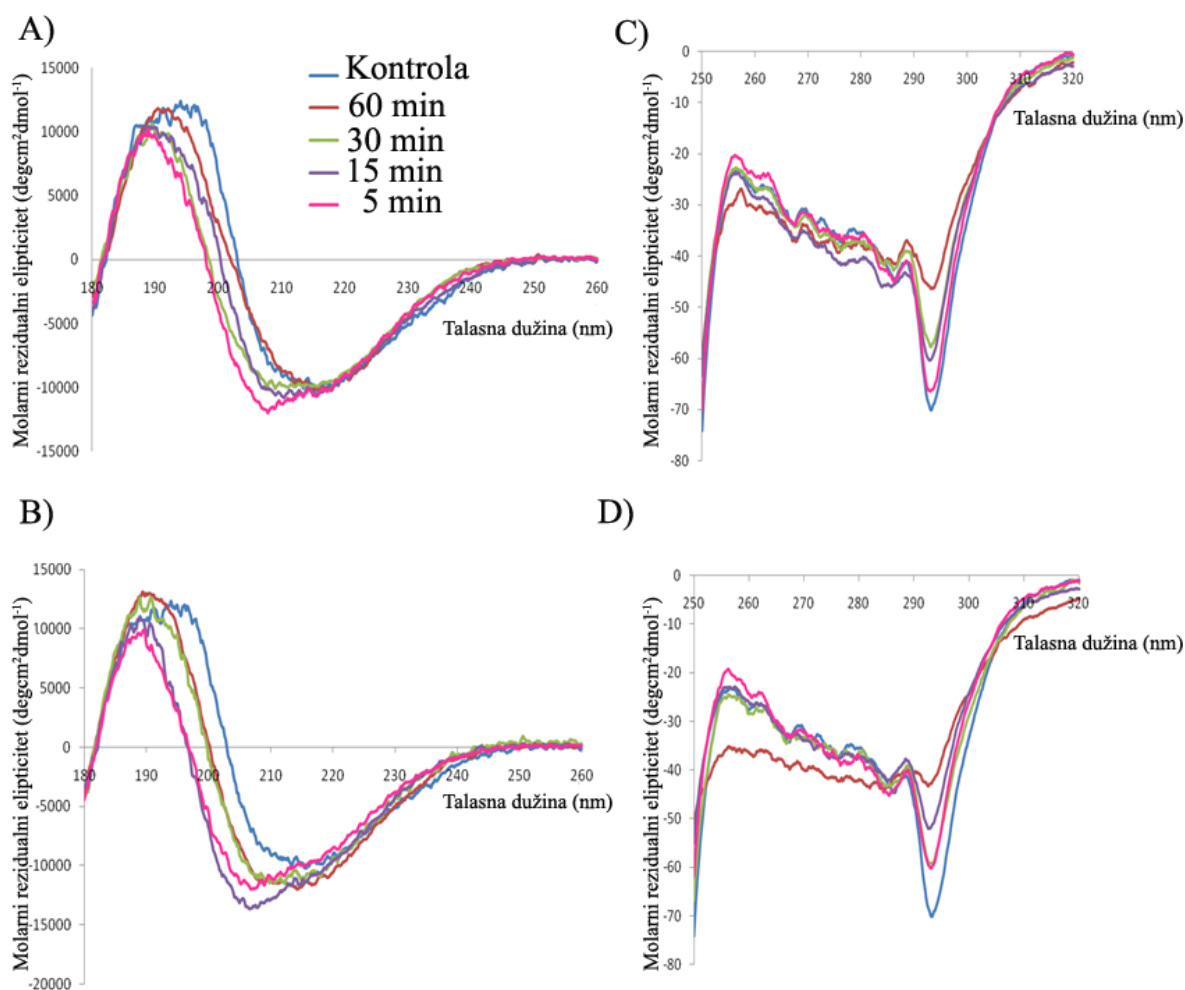


Slika 5.1. Sonifikacija indukuje polimerizaciju BLG-a. Kont: netretirani BLG, C5-60: 5-60 min tretmana ultrazvukom uz hlađenje, H5-60: 5-60 min tretmana ultrazvukom bez kontrolisanja temperature, Mm- molekularni markeri. SDS-PAGE u neredukujućim (A) i redukujućim (B) uslovima, nativna PAGE (C). Hromatogram gel filtracione hromatografije nativnog BLG-a (kont) i sonifikovanih formi C5 i H60 (D).

5.1.2. Promene u sekundarnoj i tercijarnoj strukturi sonifikovanih formi BLG-a

Uticao sonifikacije na strukturu BLG-a je ispitan snimanjem CD-spektara u dalekoj i bliskoj UV oblasti kao i u ranijim eksperimentima (3.2.2, 4.2.3). U spektrima u dalekoj UV oblasti uočava se pomeranje spektara u levo tzv. plavi pomeraj (Slika 5.2 A,B), a nakon

računanja procentualnog udela motiva sekundarne strukture (Tabela 5.1), zapaža se povećanje procenta α -heliksa i zavojnice na račun smanjenja β -pločica, što ide u prilog ranije obrazloženim promenama koje nastaju tokom razvijanja BLG-a. Interesantno je da do promena u sekundarnoj strukturi dolazi odmah po izlaganju ultrazvuku, razlike između 5 i 60 min tretmana nisu velike, ali su promene izraženije u uslovima kontrolisane temperature.



Slika 5.2. CD spektri u dalekoj (A,B) i bliskoj (C,D) UV oblasti nativnog BLG-a (kontrola) i sonifikovanih formi. A) i C) sonifikacija uz hlađenje, B) i D) sonifikacija bez hlađenja sistema 5-60 min.

U spektrima snimanim u bliskoj UV oblasti zapaža se postepeno smanjenje intenziteta oštih pikova na 293 i 285 nm koji su karakteristični za Trp₁₉, dok ih nakon 60 min gotovo i nema (Slika 5.2.C,D). Razvijanje proteina je pospešeno temperaturom.

Na osnovu elektroforetske, CD i fluorescentne spektroskopske analize za dalje eksperimente smo odabrali dve sonifikovane forme BLG-a sa izraženim promenama u sekundarnoj strukturi (C5) i tercijarnoj strukturi (H60).

Tabela 5.1. Određivanje procentualnog udela motiva sekundarne strukture.

	α -heliks ^a	β -pločica + zavijutak	Neuređena spirala
Kontrola	10.7 ± 0.8	66.3 ± 0.6	23.2 ± 0.1
H 60 min	16.5 ± 0.6	53 ± 1	30.9 ± 0.8
H 30 min	13 ± 1	57 ± 3	30 ± 2
H 15 min	10 ± 5	56 ± 7	34 ± 3
H 5 min	9 ± 3	57 ± 2	34 ± 5
C 60 min	16 ± 5	58 ± 2	34 ± 5
C 30 min	15 ± 3	55 ± 7	30 ± 4
C 15 min	14 ± 3	57 ± 3	29.2 ± 0.4
C 5 min	15 ± 2	56 ± 5	29 ± 3

^a Srednja vrednost ± standardna devijacija

5.1.3. Spektrofluorimetrijska analiza strukture sonifikovanih formi i afiniteta za vezivanje retinola

U emisionim fluorescentnim spektrima nakon ekscitacije Trp₁₉ na 280 nm, zapaža se pomeraj emisionog maksimuma ka većim talasnim dužinama tzv. crveni pomeraj. U uzorku koji je tretiran 60 min bez hlađenja (H60) zapaža se pomeraj sa 336 na 348 nm, kao i smanjenje intenziteta što govori o većoj izloženosti Trp polarnom rastvaraču, što je posledica razvijanja proteina (Slika 5.3.A)

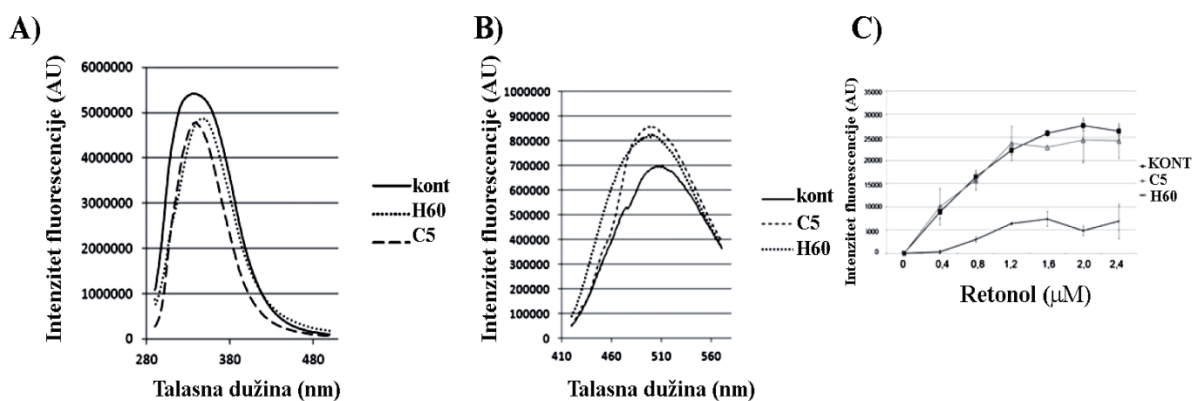
ANS (1-anilino-8-naftalen-sulfonat) je jedinjenje koje poseduje hidrofobni anilino-naftalenski deo i polarnu sulfonatnu grupu, i predstavlja korisnu boju za izučavanje intermedijera prilikom razvijanja proteina zato što su za njegovo efikasno vezivanje potrebni i hidrofobni i pozitivno naelektrisani delovi proteina raspoređeni u bliskom susedstvu. Fluorescencija ANS-a se povećava i emisioni maksimum pomera ka manjim talasnim dužinama kad se nađe nepolarnijoj sredini, a to je nakon vezivanja za hidrofobne delove proteina. Interesantno je da ANS ima veći afinitet za proteine u stanju rastopljene globule nego za denaturisane proteine. Kada je protein denaturisan manja je verovatnoća da će pozitivni i hidrofobni regioni molekula biti dovoljno blizu orijentisani da omoguće jako vezivanje ANS-a što će za posledicu imati difuziju ANS-a sa polipeptidnog lanca. Nakon vezivanja ANS-a za C5 i H60, njegova fluorescencija se povećala za 15% u odnosu na nativni BLG, a emisioni maksimum se pomerio sa 505 na 497-8 nm (Slika 5.3.B). Nije zapaženo povećanje u fluorescenciji ANS-a između C5 i H60 iako su u H60 izloženi hidrofobni regioni proteina iz istog razlog zbog koga je manje vezivanje za denaturisane proteine.

Fluorescencija retinola se dramatično povećava nakon vezivanja za retinol-vezujuće proteine poput BLG-a zbog smanjenja polarosti sredine. Zasićenje mesta za vezivanje retinola je postignuto u molarnom odnosu 1:1 (protein:retinol) za BLG, 1:0.9 za C5 i 1:0.1 za H60. Izračunate konstante za disocijaciju protein-retinol kompleksa su $3 \pm 1 \times 10^{-6}$ M za BLG, $5.5 \pm 0.7 \times 10^{-6}$ M za C5 i $7 \pm 6 \times 10^{-5}$ M za H60. U sonifikovanoj formi H60 je izraženo naršena tercijarna struktura pa je i afinitet za vezivanje retinola drastično smanjen (Slika 5.3.C). Konstanta disocijacije dobijena za nativni BLG je u skladu sa literaturnim podacima (Muresan, 2001).

5.1.4. Uticaj strukturnih promena izazvanih sonifikacijom na digestibilnost BLG-a

Proteini su digestovani pepsinom u simuliranom gastričnom fluidu, digesti su analizirani nativnom PAG elektroforezom. U uslovima digestije pepsinom samo deo nativnog BLG-a se degraduje, dimeri se razgrađuju za 30 min, a značajna količina

monomernog BLG-a ostaje nedigestovana. Nije bilo razlike u digestibilnosti C5 i nativnog proteina. Većina H60 oblika je digestovana u toku 120 min, pri čemu su se dimeri i polimeri brzo degradovali, u toku samo 5 min (Slika 5.4. A). Podložnost digestiji pepsinom korelira sa stepenom razvijenosti polipeptidnog lanca.

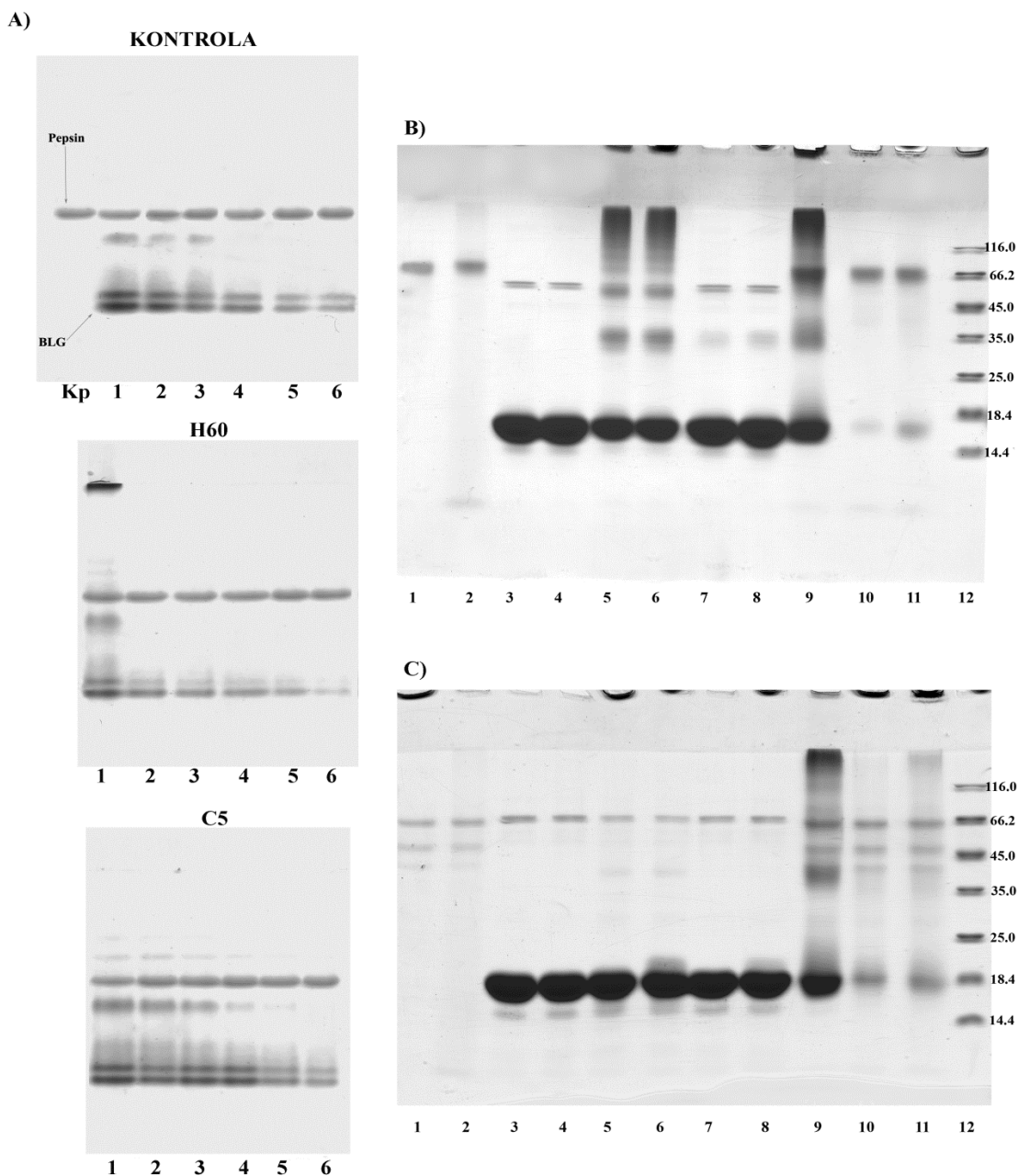


Slika 5.3. Spektrofluorimetrijska analiza izloženosti Trp (A), vezivanja ANS-a (B) i retinola (C) za nativni BLG (kont) i sonifikovane forme C5 i H60.

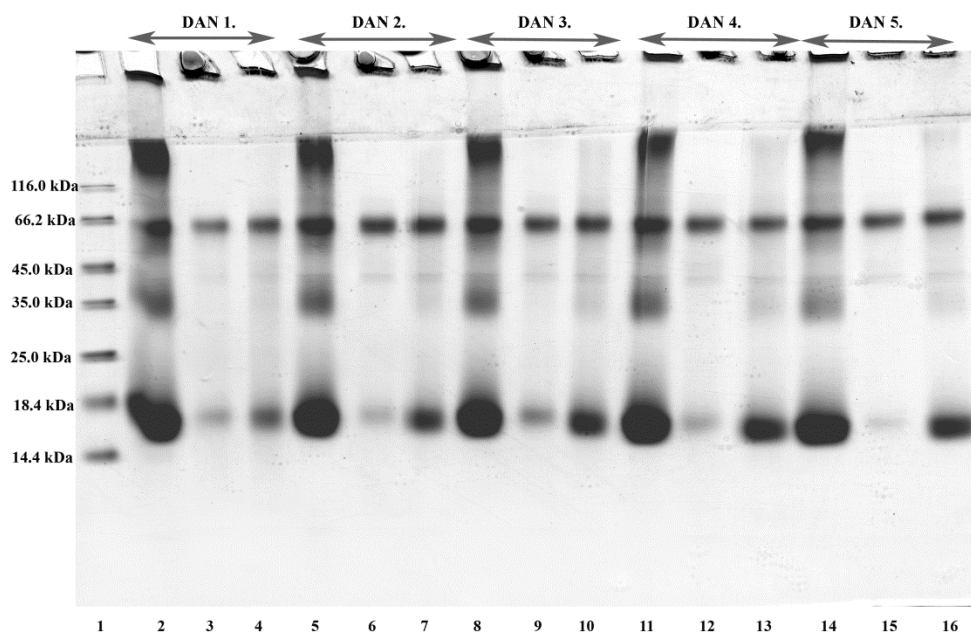
5.1.5. Procena stabilnosti promena u strukturi proteina

Fine razlike u strukturi nativnog BLG-a i sonifikovanih formi su dodatno analizirane u reakciji sa lakazom, enzimom za umrežavanje slično kao što je opisano u 3.2.2. Stepen umreženja nativnog BLG-a je bio mali, dok su obe sonifikovane forme C5 i H60 bile izuzetno podložne reakciji što je rezultovalo formiranjem polimera visokih molekularskih masa (Slika 5.4.B,C). Sonifikovani BLG poseduje veću izloženost hidrofobnih i nukleofilnih aminokiselinskih ostataka, što ga čini boljim supstratom za lakazu koja je jako osetljiva na sterne smetnje i čija aktivnost opada značajno sa povećanjem supstrata.

Strukturne promene koje su dovele do poboljšanja reakcije sa lakazom su stabilne u vremenu. Nakon 5 dana od tretmana ultrazvukom podložnost H60 reakciji umrežavanja je očuvana u velikoj meri, dok je deo sonifikovane forme C5 povratio kompaktnu strukturu (Slika 5.5).



Slika 5.4. A) Nativna PAGE uzoraka nakon pepsinske digestije, traka 1: kontrola pepsina, 1-6: alikvoti nakon 0, 15, 30, 60, 120 i 240 min digestije. SDS-PAGE u neredukujućim (B) i redukujućim (C) uslovima uzoraka nakon umrežavanja lakazom; enzim u puferu nakon 0 i 3h (traka 1,2), nativni BLG u puferu nakon 0 i 3h (traka 3,4), H60 u puferu nakon 0 i 3h (traka 5,6), C5 u puferu nakon 0 i 3h (traka 7, 8), umreženi nativni BLG (traka 9), umreženi H60 (traka 10), umreženi C5 (traka 11), molekularni markeri- Mm (traka 12).



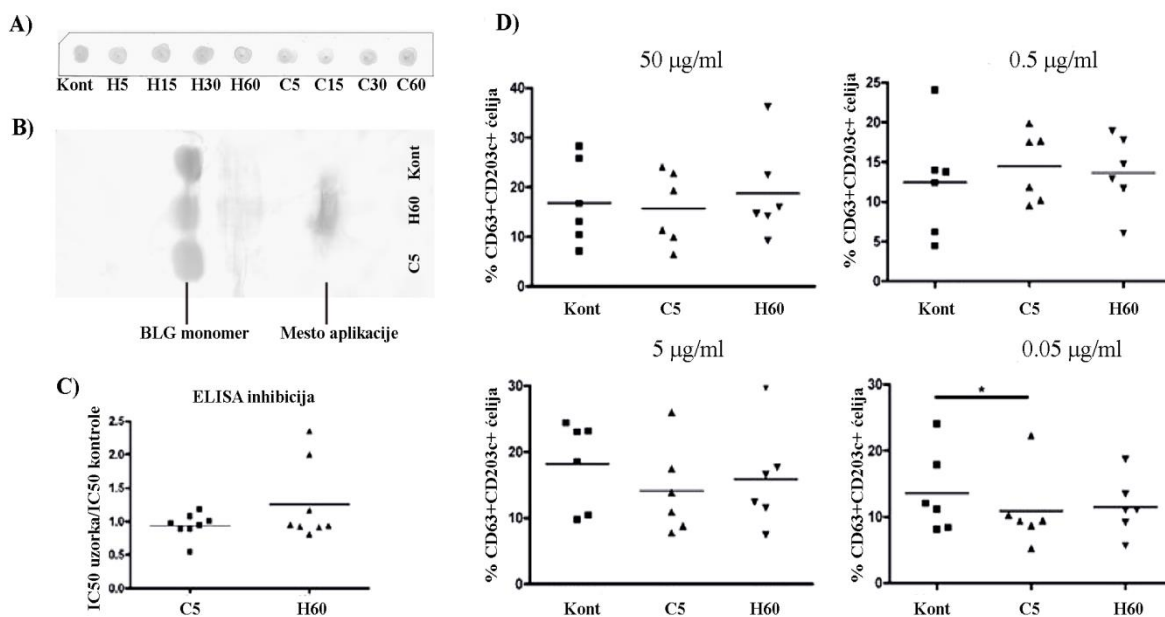
Slika 5.5. Procena stabilnosti modifikacija umrežavanjem proteina lakazom u različitim vremenskim intervalima od tretmana ultrazvukom. Trake 2, 5, 8, 11, 14- netretirani BLG; trake 3, 6, 9, 12, 15- H60; trake 4,7,10,13,16- C5. Traka 1- molekularni markeri.

5.1.6. Uticaj sonifikacije na očuvanost IgE vezujućih epitopa

Očuvanost IgE vezujućih epitopa sonifikovanih i strukturno različitih formi BLG-a, C5 i H60 smo proverili u imunoprintu i dot blotu sa združenim serumima (tzv. „pul seruma“) 8 pacijenata alergičnih na mleko koji su od 30 testiranih pacijenata odreagovali u direktnom ELISA testu na BLG, u inhibitornim ELSA testovima sa pojedinačnim serumima pacijenata, u testu *ex vivo* aktivacije bazofila izolovanih iz krvi 6 nasumično odabranih pacijenata alergičnih na mleko i *in vivo* u kožnim probama tzv. „skin prick“ testu na 41 pacijentu koji su bili pozitivni na mleko u istom testu.

U imunoprintu i dot blotu je primećeno da C5 nešto slabije vezuje IgE, ali nisu uočene promene u vezivanju IgE-a od strane H60 (Slika 5.6.A i B). Inhibicija vezivanja IgE antitela za nativni BLG, koji je kupovan za dno pločice od strane C5 i H60 je bila u rangu sa nativnim ukoliko se statistički upoređuju IC_{50} vrednosti. Međutim, u 2 od 6 pacijenata je

detektovana duplo veća IC_{50} vrednost tj. za postizanje 50% inhibicije vezivanja IgE-a za BLG potrebna je duplo veća koncentracija H60 u odnosu na nativni i C5 (Slika 5.6.C). Iako su prema gore izloženim rezultatima linerani epitopi BLG-a glavni odgovorni za produkciju IgE-a, postoje pacijenti kod kojih se generiše više antitela naspram konformacionih epitopa BLG-a.



Slika 5.6. Detekcija vezivanja IgE antitela iz „pula seruma“ za netretirani BLG, C5 i H60 u dot blotu (A) i imunoprintu (B). C) ELISA inhibicija sa pojedinačnim serumima pacijenata alergičnih na mleko. D) Bazofili pacijenata alergičnih na mleko su aktivirani sa 0.05, 0.5, 5 i 50 $\mu\text{g/ml}$ BLG-a (Kont), C5 ili H60 i određen je % $CD63^+CD203c^+$ ćelija u odnosu na pozitivnu kontrolu.

U testu aktivacije bazofila su testirani alergeni u četiri koncentracije 0.05, 0.5, 5 i 50 $\mu\text{g/ml}$. Iako H60 ne poseduje uređenu terciarnu strukturu sličnu nativnom i C5 BLG-u, to se ne odražava na njegovu reaktivnost u ovom biološkom testu, što opet ukazuje na značaj generisanja linearnih epitopa. Samo je pri najnižoj koncentraciji BLG-a primećena smanjena sposobnost C5 da aktivira bazofile (Slika 5.6.D).

U kožnim testovima je posmatrana reakcija aktivacije mastocita koja je posredovana IgE antitelima. Kožne probe su urađeni sa dve koncentracije proteina 10 µg/ml i 100 µg/ml. Pacijenti su bili uzrasta od 1-11 godina, sa srednjim nivoom IgE antitela u serumu od 11.4 kAU/l određenim u ImmunoCAP-u naspram kravljeg mleka.

Tabela 5.2. Reakcija pacijenata alergičnih na mleko na nativni i sonifikovani BLG u kožnim probama („prick“ test). Prečnik otoka i iritacije je meren i izražen u mm. Prikazani su samo rezultati pacijenta koji su u testu odreagovali pozitivno na nativni BLG.

Br.	IgE kAU/L	histamin otok x iritacija (mm)	BLG otok x iritacija (mm)	C5 otok x iritacija (mm)	H60 otok x iritacija (mm)	„prick to prick“ test na mleko otok x iritacija (mm)
Testirana koncentracije proteina: 100 µg/ml						
1	100	3 x 15	4 x 20	3 x 20	2 x 15	12 x 40
2	65.9	5 x 15	2 x 10	2 x 10	2 x 10	10 x 30
3	65	3 x 35	2 x 6	2 x 6	2 x 8	4 x 20
4	58.9	5 x 25	0	2 x 8	5 x 15	15 x 20
5	36.9	3 x 6	2 x 6	2 x 6	2 x 8	3 x 5
6	20	3 x 20	5 x 20	4 x 15	4 x 15	2 x 15
7	14.5	10 x 25	2 x 10	2 x 10	10 x 15	14 x 40
8	11.9	8 x 25	0	0	5 x 10	10 x 20
9	5.33	3 x 12	0	0	3 x 5	5 x 25
10	2.88	3 x 20	8 x 25	5 x 25	4 x 20	5 x 20
11	0,9	3 x 12	2 x 6	0	0	3 x 10
12	0,9	3 x 12	2 x 6	0	0	3 x 15
Testirana koncentracije proteina: 10 µg/ml						
10	2.88	3 x 12	2 x 15	2 x 12	2 x 10	5 x 20
6	20	3 x 20	4 x 18	0	0	2 x 15

Detaljni klinički simptomi pacijenata su priloženi na kraju rada, u poglavlju 9 (Tabela 9.5). U Tabeli 5.2. su izdvojeni podaci samo o pacijentima koji su odreagovali pozitivno na BLG. Pri većim testiranim koncentracijama, 22% pacijenata je odreagovalo na nativni BLG, 19.5% na C5, 24% na H60. Pri nižim koncentracijama alergena 4.9% je odreagovalo na BLG a 2.4% na sonifikovane forme. Ukupno je 4.8% pacijenata reagovalo samo na nativni protein, a 7% samo na H60. U „skin prick“ merilo intenziteta reakcije je

prečnik otoka i iritacije (wheel, flare) koji nastaju nakon izlaganja alergenu. Jačina reakcije je bila statistički manja ($p < 0.05$) jedino na C5 u devet pacijenata koji su pozitivno odreagovali na BLG.

5.2. Diskusija

Promenom temperature prilikom sonifikacije BLG-a zapazili smo formiranje dve strukturno različite forme proteina. Kada temperatura sistema nije bila kontrolisana došlo je do promena u tercijarnoj strukturi BLG-a koje su dovele do formiranja polimera i čak 50% polimerizacije nakon 60 min tretmana. Kada temperatura u uzorku nije prelazila 35°C došlo je do blagih promena u sekundarnoj strukturi koje su uslovile samo formiranje dimera u maloj meri. Promene do kojih dolazi tokom tretmana su posledica kombinovanog dejstava više efekata koji su obrazloženi u 2.7.1. Usled formiranja slobodnih radikala može da dođe do formiranja tiol radikala, što za posledicu može imati rearanžman dsulfida i građenje intermolekulskih disulfidnih mostova.

Kombinacija temperature i sonifikacije dovodi do narušavanja interakcija između aminokiselinskih ostataka proteina (vodonične, hidrofobne, disulfidne veze) koje održavaju sekundarnu i tercijarnu strukturu proteina. To se odražava na razvijanje polipeptidnog lanca, izlaganje hidrofobnih aminokiselinskih ostataka i tranzita iz rigidnih β -pločica u α -heliks. Chandrapala i sar. (Chandrapala, 2011) su prijavili smanjenje β -pločica i β -zavijutka od 5-9% i povećanje α -heliksa od 10% kada je koncentrat proteina surutke sonifikovan ultrazvukom 60 min pod uslovima sličnim našim. Prilikom β - α prelaza dolazi istovremeno do formiranja nenativnih disulfidnih veza i povećanja neuređenih spirala (engl, random coil) (Yang, 2001). Da se BLG uvije u nativnu 3D strukturu neophodno je tačno formiranje disulfidnih veza (Hattori, 2005). Tako je za razliku od C5, nenativno uvijena struktura H60 i ostalih termalno tretiranih uzoraka stabilizovana formiranjem novonastalih intra i inter disulfidnih veza i nije došlo do povratnog uvijanja u strukturu sličnoj nativnoj. H60 je posledično skoro pa izgubio afinitet za vezivanje retinola. Slična pojava je zapažena kod termalno tretiranog BLG-a gde je samo deo proteina koji se vratio u nativnu strukturu pokazivao moć za vezivanje retinola (Mousavi, 2008). Takođe primećeno je i da formiranje

agregata BLG-a negativno korelira sa vezivanjem retinola (Macierzanka, 2009). Povećanje fluorescencije ANS-a nakon vezivanja za C5 i H60 potvrdilo je nastanak strukturnih promena u BLG-u koje se odražavaju na njegovu površinsku hidrofobnost.

Posledice strukturnih promena se ogledaju u bržoj degradaciji pepsinom kod BLG formi sa više izloženih hidrofobnih regiona (H60) i većoj efikasnosti reakcije umrežavanja obe sonifikovane forme (C5 i H60) lakazom. Obe metode se mogu koristiti za kreiranje hipoalergenih proizvoda. Tako je pokazano da povećana digestibilnost i smanjenje transepitelijalnog transporta termalno tretiranih alergena jajeta dovode do smanjenja senzitacionog potencijala (Martos, 2011). Modifikacija β -kazeina lakazom u prisustvu kafeinske kiseline dovela je do smanjenja vezivanja IgE-a i aktivacije bazofila (Stanic, 2010).

Međutim, bilo kakve manipulacije sa strukturom proteina mogu da dovedu kako do maskiranja postojećih epitopa, tako i do kreiranja novih i otkrivanja onih duboko skrivenih u unutrašnjosti proteina. Ne zna se puno o efektima ultrazvuka na alergenost proteina. Tretman ultrazvukom 15 min na 0°C nije imao uticaja na alergenost glavnog alergena rakova Pen a 1, tek na temperaturi od 50°C je zabeležen pad u alergenom potencijalu istog proteina. Sa druge strane, u istoj studiji je zabeleženo blago povećanje alergenosti nakon tretmana od 90 min na 0°C (Zhenxing, 2006). U našim eksperimentima, detektovano je smanjenje vezivanja IgE antitela iz „pula“ seruma pacijenata od strane C5 u imunoprintu, ali to nije potvrđeno u ELSA testu sa pojednačnim serumima. Slično zapažanje je primećeno sa termalno tretiranim BLG-om u studijama Ehn i sar. i Taheri-Kafrani i sar. (Ehn, 2004; Taheri-Kafrani, 2009).

Samo je mali broj pacijenta alergičnih na mleko koji su podvrgnuti „skin prick“ testiranju odreo go vao manjim intenzitetom na sonifikovanu formu C5 u poređenju sa nativnim BLG-om. Sa druge strane 3/41 pacijenta je odreo go vao samo na H60, što ukazuje da su formirani agregati BLG-a možda odgovorni za povećanje reaktivnosti. I zaista, u jednoj studiji je pokazano da prelazni dimeri BLG-a uzrokuju veću aktivaciju bazofila alergičnih pacijenata za razliku od BLG-a koji je bio genetički izmenjen i nije mogao da formira dimere (Rouvinen, 2010). Na osnovu naših rezultata, može se zaključiti da strukture promene koje nastaju za vreme tretmana ultrazvukom ne utiču puno na alergenost

BLG-a jer su za njegovu alergnost odgovorni dominantno linearni epitopi koji se ovakvim tretmanima ne menjaju.

5.3. Materijal i metode

5.3.1. Tretman ultrazvukom

Pripremljen je rastvor BLG-a koncentracije 2 mg/ml u 10 mM Na-fosfatnom puferu pH 6.5. Za ultrazvučni tretman korišćena je sonda Branson Sonifier 150 frekvencije 20 kHz i amplitude 120 μm (Branson Ultrasonic Corp., Danburi, Konektikat, SAD). U Ependorf tubu od 1.5 ml odmeren je 1 ml rastvora proteina, vrh sonde je uronjen do dubine od 1 cm i uzorci su tretirani izlaznom snagom od 9.5 W (135 W/cm^2) 5, 15, 30 i 60 min. Ependorf tuba je bila uronjena u vodeno kupatilo. Osim vremena trajanja tretmana varirana je i temperatura. Sonifikacija je vršena uz konstantno hlađenje uzorka u ledenom vodenom kupatilu čime je održavana temperatura u uzorku 25-35°C ili bez hlađenja sistema gde je temperatura u uzorku rasla usled tretmana ultrazvukom sa 25 na 65°C. Nakon tretmana, uzorci su čuvani na -20°C. Tretman je ponovljen nekoliko puta kako bismo bili sigurni u reproduktivnost tretmana.

5.3.2. Metode za karakterizaciju strukture sonifikovanih formi BLG-a

5.3.2.1. Elektroforetska analiza

Formiranje polimera je praćeno SDS i nativnom PAG elektroforezom koje su rađene po proceduri i na sistemu opisanom u odeljku 3.4.1.4. SDS-PAG elektroforeza je rađena na 14% gelu pod redukujućim i neredukujućim uslovima, tj. sa i bez β -merkaptetoanola. Nativna PAG elektroforeza je rađena na 14% gelu uz odsustvo SDS-a i β -merkaptetoanola, kao i bez termalnog tretmana uzoraka. Nanošeno je 15 μg proteina po bunaru. Za SDS-PAGE su korišćeni proteinski molekularni markeri u opsegu 14-116 kDa (SMO431, Fermentas).

5.3.2.2. Analitička gel-filtraciona hromatografija

Stepen polimerizacije je određen gel-filtracionom hromatografijom na koloni Superdex 75 PC 3.2-30 i HPLC sistemu ÄKTA Purifier 10 (Amersham Biosciencics). Na kolonu je naneta ista količina sonifikovanih formi i nativnog BLG-a, ukupno 80 µg. Za eluciju je korišćen 50 mM Na-fosfatni pufer pH 6.5 pod protokom 0.09 ml/min. Razdvajanje formi BLG-a je praćeno na 215 nm i 280 nm. Hromatogrami su alanizirani integraljenjem površina ispod pikova proteina detektovanih na 280 nm. Za vođenje hromatografije i obradu dobijenih podataka korišćen je UNICORN 4.0 program (Amersham Biosciencics).

5.3.2.3. CD spektroskopija

Karakterizacija sekundarne i tercijarne strukture sonifikovanih formi BLG-a izvršena je snimanjem CD spektara pomoću uređaja JASCO J-710 taćno onako kako je opisano u odljuku 3.4.2.3. Spektri snimani u dalekoj UV oblasti su korišćeni za određivanje procentualnog udela motiva sekundarne strukture, a analiza je odrađena pomoću softvera CONTIN i SP29 proteinske baze koja je dostupna u CDPro softverskom paketu.

5.3.2.4. Spektrofluorimetrijska analiza

Fluorescentni spektri su snimani na spektrofotometru FluoroMax-4 (Horiba Scientific) na sobnoj temepraturi (25°C) u kvarnoj kiveti sa dužinom puta 1 cm i sa prorezom širine 5 nm.

Izloženost triptofana i tirozina. Emisioni spektri 2 µM rastvora BLG-a u 10 mM Na-fosfatnom puferu pH 7.2 su snimljeni u opsegu 290-500 nm nakon pobuđivanja na 280 nm.

Vezivanje hidrofobne probe 1-anilino-8-naftalen-sulfonata (ANS). Pre određivanja stepena vezivanja ANS-a (Sigma-Aldrich) od strane nativnog BLG-a i sonifikovanih formi,

bilo je potrebno odrediti koncentraciju ANS-a kojom se postiže zasićenje vezivnih mesta na nativnom BLG-u. Rastvor BLG-a se titruje rastućim koncentracijama ANS-a, snimaju se emisijski spektri probe, i zasićenje se postiže kada maksimum fluorescencije prestane da menja sa dodatkom probe. Finalno su svi uzorci snimljeni pod istim uslovima: 20 μM rastvor proteina sa 100 μM ANS-om u 10 mM Na-fosfatnom puferu pH 7.2, talasna dužina ekscitacije ANS-a je bila 350 nm, emisijski spektri snimani su u opsegu 420-570 nm.

Vezivanje retinola. U kivetu je pipetom odmereno 3 ml 2 μM rastvora nativnog ili sonifikovanog BLG-a u 10 mM Na-fosfatnom puferu pH 7.2 i u malim inkrementima od 2.5 μl je postepeno dodavan 4.8 mM rastvor retinola (Sigma-Aldrich) u etanolu. Rastvor retinola je pravljen neposredno pred eksperiment. Praćena je fluorescencija retinola (ekscitacija 330 nm, emisija 470 nm) koja se povećava nakon vezivanja za protein. Konstante disocijacije su izračunate po metodi Wang-a i Edelman-a (Wang J. L. i Edelman, 1971).

5.3.3. *In vitro* enzimski testovi

5.3.3.1. *In vitro* digestija pepsinom

Digestija pepsinom je rađena slično kao u odeljku 4.4.3.1. Ukratko, u ependorf tubu odmereno je 150 μl BLG-a koncentracije 2 mg/ml, 150 μl miliQ vode, 300 μl 0.2 M HCl sa 4 g/l NaCl i 3.4 g/l pepsina A (2650 U/mg, Sigma-Aldrich). Digestija se odvijala na 37°C uz konstantno mešanje. Finalni odnos jedinica enzimske aktivnosti pepsina i μg BLG-a je bio 10:1, kao što je preporučeno po US Pharmacopeia-i (Thomas, 2004) Alikvoti od 100 μl su vađeni nakon 15, 30, 60, 120 i 180 min i reakcija u njima je zaustavljena sa dodatkom 31 μl 0.3M Na_2CO_3 i zamrzavanjem na -20°C. Kontrola pepsina je spremljena na isti način kao i uzorci ali bez dodatka BLG-a. Nulto vreme digestije je pripremljeno bez dodatka pepsina. Uzorci su analizirani na 14% gelu nativnom PAG elektroforezom, aplicirano je 13 μg proteina po bunaru.

5.3.3.2. Procena stabilnosti modifikacija umrežavanjem sa lakazom

Reakciona smeša je sadržala 0.95 mg/ml BLG-a, 1mM kafeinsku kiselinu, 1 mg/ml lakaze iz *Trametes versicolor* (30.6 U/mg, Fluka, Sigma-Aldrich) u 100 mM Na-acetatnom puferu pH 4.5. Reakcija je trajala 3h na 37°C uz konstantno mešanje a stopirana je zamrzavanjem na -20°C. Svaka reakcija je urađena u duplikatu. Uzorci BLG-a su tretirani ultrazvukom, uzet je alikvot i odmah je postavljena reakcija sa lakazom. Ostatak tretiranog uzorka je odložen na +4°C. U narednih 5 dana na svaka 24h je vađen po alikvot za reakciju sa lakazom. Efikasnost reakcije je praćena SDS-PAG elektroforezom na 14% gelovima u redukujućim i neredukujućim uslovima. Uvek je aplicirana ista količina uzorka po bunaru, 17.5 µg.

5.3.4. Testovi za procenu alergenosti sonifikovanih formi BLG-a

5.3.4.1. Humani serumi

Serumi osam pacijenata sa dokumentovanom kliničkom istorijom, pozitivnom reakcijom u „prick“ testu na kravlje mleko, sa više od 10 kU/l IgE na kravlje mleko u ImmunoCap-u (šifra f2, Pharmacia Diagnostics, Upsala, Švedska) i pozitivnom reakcijom na BLG u direktnom ELISA testu su korišćeni za inihbitorni ELISA test. Kao negativna kontrola korišćen je serum pacijenata bez znakova alergije na mleko. Za testove imunoprint i dot blot, serumi su pomešani tzv. „pulovani“. U svim eksperimentima finalno razblaženje seruma je bilo 1:5.

5.3.4.2. Imunoprint i dot blot

Izoelektrično fokusiranje je rađeno kao što je opisano u odeljku 3.4.1.5. Po završetku IEF-a, proteini su transferovani na nitroceluloznu membranu (0.45µm, Millipore, USA) kapilarnim silama u toku 1h. Nakon transfera, membrana je blokirana 1h na 37°C sa 2% (w/v) rastvorom želatina (Fluka, Sigma–Aldrich) u TTBS-u (30 mM Tris sa 9 g/l NaCl

(TBS) sa 1 g/l Tween 20) a zatim inkubirana 2h sa „pulom“ seruma. IgE vezan za proteine na membrani je detektovan inkubiranjem sa kozjim anti-IgE antitelima u razblaženju 1:7 000 1h (Sigma-Aldrich) a zatim sa zečjim anti-kozji IgG antitelima obeleženim alkalnom fosfatazom u razblaženju 1:30 000 1h (Sigma-Aldrich). Između svakog inkubiranja sa antitelima postojao je korak ispiranja (3x TTBS) a sva razblaženja antitela su pravljena u 0.2% želatinu u TTBS-u. Kao precipitirajući supstrat korišćena je smeša: 1.5 mg BCIP-a (5-bromo-4-hloro- 3-indolil fosfat, Sigma–Aldrich) i 3 mg NBT-a (nitroplavo tetrazolium, Sigma–Aldrich) u 10 ml 100 mM Tris pufera pH 9.6 koji je sadržao 150 mM NaCl i 5 mM MgCl₂. Za dot blot 10 µg proteina je naneto kapilarnim silama na 6x6 mm velike kvadrate nitrocleulozne membrane. Ostali koraci su urađeni kao kod imuniprinta.

5.3.4.3. Inhibicija vezivanja IgE antitela u ELISA testu

ELISA test je urađen slično kao ELISA test u odeljku 3.4.3.2. Za bunare Maxi Sorb pločice sa 96 bunara (Nunc) kuplovan je nativni BLG preko noći u vlažnoj atmosferi na sobnoj temperaturi (100 µl po bunaru 5 µg/ml u karbonatnom puferu pH 9.6). Blokiranje je trajalo 1h sa 2% želatinom u TTBS-u. ELISA je rađena sa pojedinačnim serumima pacijenata. Serumi su inkubirani 1h sa nativnim BLG-om i sonifikovanim formama u različitim koncentracijama pre stavljanja u bunare pločice gde je inkubacija nastavljena još 2h.

Nakon ispiranja, IgE-a čije vezivanje za kupovani alergen nije inhibirano, detektovan je jednočasovnim inkubiranjima sa zečjim anti humanim IgE antitelima (razblažena 1:2000, MIAB, Upsala, Švedska) a zatim sa kozjim anti zečjim IgG antitelima kuplovanim sa alkalnom fosfatazom (razblažena 1:1000, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Vest Gruv, Pensilvanija, SAD). Za razvijanje korišćen je komercijalno dostupni solubilni supstrat za alkalnu fosfatazu (Bio-Rad Laboratories, Ričmond, Virdžinija, SAD). Procenat inhibicije je izračunat kao u odeljku 3.4.3.2.

5.3.4.4. *Ex vivo* test aktivacije bazofila

Test se zasniva na određivanju broja bazofila aktiviranih odgovarajućim alergenom od ukupne populacije bazofila. Korišćena je heparinizirana krv šest pacijenta koji su bili pozitivni na mleko u „prick“ testu. U FACS tube odmereno je po 45 μ l pune krvi i po 45 μ l RPMI 1640 ćelijskog medijuma (Sigma-Aldrich). U krv je zatim dodato po 10 μ l nativnog ili sonifikovanog BLG-a u nekoliko razblaženja (finalno 50 μ g/ml, 5 μ g/ml, 0.5 μ g/ml, 0.05 μ g/ml). Umesto alergena u pozitivne kontrole je dodato po 10 μ l monoklonskog anti-humanog IgE antitela (finalno 1 μ g/ml i 0.1 μ g/ml) a u negativne po 10 μ l PBS-a. Čelije su inkubirane sa alergenom tokom 20 min na 37°C. Nakon toga u epruvete je dodato po 5 μ l anti-CD63 antitela obeleženog FITC-om (fluoresceinizotiocijanat, fluorescira zeleno, FL1 kanal) i po 5 μ l anti-CD203c antitela PE-om (fikoeritrin, fluorescira crveno, FL2 kanal) i inkubacija je nastavljena još 30 min na 4° C u mraku. PE-konjugovano monoklonsko anti-CD203c antitelo prepoznaje CD203c, antigen eksprimiran na humanim bazofilima iz periferne krvi ali ne i na drugim ćelijama (Immunotech, Marseille, France). FITC konjugovano monoklonsko anti-CD63 antitelo vezuje se za CD63 koji se eksprimira na površini neutrofila i bazofila nakon njihove aktivacije (Immunotech, Marseille, France).

Nakon inkubiranja eritrociti su lizirani dodatkom po 1ml lizirajućeg pufera (154 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 100 μ M EDTA, pH 7,2; pripremljen istog dana) i nelizirane ćelije (među njima i bazofili) su staložene centrifugiranjem na 300 g tokom 5 min na 4°C, supernatant je odvojen a talog ćelija je ispran sa po 1 ml PBS-a. Isprane ćelije su resuspendovane u 200 μ l PBS-a i analizirane na protočnom citometru FACS Calibur (BD Biosciences, SAD). Pored pozitivne i negativne kontrole pripremljene su i ćelije koje služe za kompenzaciju tj. podešavanje parametara tako da se minimizuje preklapanje boja (nebojene ćelije, jednom pozitivne ćelije, inkubirane sa anti-CD63 ili anti-CD203c).

Prilikom akvizicije podataka skupljano je po 500 bazofila iz svake tube. Kao merilo aktivacije bazofila koristili smo broj duplo pozitivnih ćelija CD63⁺ CD203c⁺ unutar populacije od 500 bazofila. Podaci sa protočne citometrije su analizirani u Cell Quest softveru (BD Biosciences, SAD). Rezultati su prikazani kao procenat aktivacije bazofila u

uzorku sa BLG-om u odnosu na pozitivnu kontrolu i upoređeni Vilkoksonovim statističkim testom ekvivalentnih parova.

5.3.4.5. Kožne alergološke probe- „skin prick“ testovi

Ispitali smo i uporedili reaktivnost sonifikovanih formi BLG-a sa nativnim proteinom *in vivo* u „prick“ testu na pacijentima. Ovim testom se meri reakcija aktivacije mastocita posredovana specifičnim IgE-om koji je vezan na površini mastocita u koži. Eksperiment je sproveden na ukupno 41 pacijentu koji su bili uzrasta 1-11 godina (27 dečaka, 14 devojčica) i koji su prethodno odreagovali pozitivno u „prick“ testu na kravlje mleko i imali u serumu ImmunoCAP-om detektovana IgE antitela naspram kravljeg mleka iznad 0.35 kAU/l. Korišćene su dve koncentracije alergena 10 i 100 µg/ml. Kao pozitivna kontrola korišćen je histamin. U „skin prick“ testu meren je prečnik otoka i iritacije (wheel, flare) koji nastaju nakon izlaganja alergenu. Razlike u reaktivnosti su statistički obrađene pomoću Vilkoksonovog testa ekvivalentnih parova. Studija je bila odobrena od starne Etičkog komiteta Univerzitetske dečje bolnice u Tiršovoj u Beogradu. Svi pacijenti su dali pismeni pristanak.

6. ISPITIVANJE ALERGENOSTI I IMUNOGENOSTI ENZIMSKI UMREŽENOG β -LAKTOGLOBULINA

Enzimom katalizovana unakrsna povezivanja proteina su eksploatisana u prehrambenoj industriji za preradu žitarica, mleka, mesa i ribe (Buchert, 2010). Za umrežavanje proteina surutke danas se koriste enzimi transglutaminaze, fenol oksidaze (lakaze i tirozinaze) i sulfhidril oksidaze, pri čemu je transglutaminaza (EC 1.13.11.12) najviše proučeni enzim za polimerizaciju proteina mleka (Lorenzen, 2002; Nonaka, 1992). Tirozinaza i lakaza indukuju najmanje delimično umrežavanje proteina surutke (Thalmann i Lötzbeyer, 2002), ali imaju potencijal i za kreiranje funkcionalnih prehrambenih proizvoda, na primer biopolimera sa antioksidativnim osobinama (Chung, 2003).

Efekat enzima za umrežavanje na alergnost proteina hrane je ispitan u brojnim studijama. Tretman čistih proteina hrane ili proteinskih smeša transglutaminazom (brašno kikirikija, koncentrat proteina surutke, ω -5 glijadin, pšenično brašno, β -kazein), u prisustvu ili odsustvu pomoćnih jedinjenja ili tretmana, je smanjio, povećao ili nije imao uticaja na imunoreaktivnost testiranih proteina (*in vitro* testovi ELISA, imunoblot, testovi digestije) (Clare, 2006; Clare, 2008; Leszczyńska, 2006; Monogioudi, 2011; Palosuo, 2003; Wróblewska, 2009). Fenol oksidaze su se pokazale efikasnim u smanjenjenju IgE vezivanja za Pru av 1, Mal d1, Ara h 1/2, β -kazeina i BLG-a samo u prisustvu malih fenolnih medijatora koji potpomažu reakciju (Chung, 2005; Garcia-Borrego, 2007; Gruber, 2004; Tantoush, 2011).

U prethodnom poglavlju opisan je postupak po kome smo efikasno umrežili BLG lakazom iz *Trametes versicolor* u prisustvu kafeinske kiseline. Enzimskoj reakciji je prethodio korak sonifikacije BLG-a kako bi se pospešio prinos reakcije. U ovom poglavlju, koristili smo mišji model alergije na hranu, ispitali smo interakcije između T-ćelija i dendritičnih ćelija, apsorpciju proteina u GIT-u, preuzimanje i obradu alergena od strane dendritičnih ćelija kako bismo ustanovili alergnost i imunogenost umreženog BLG-a.

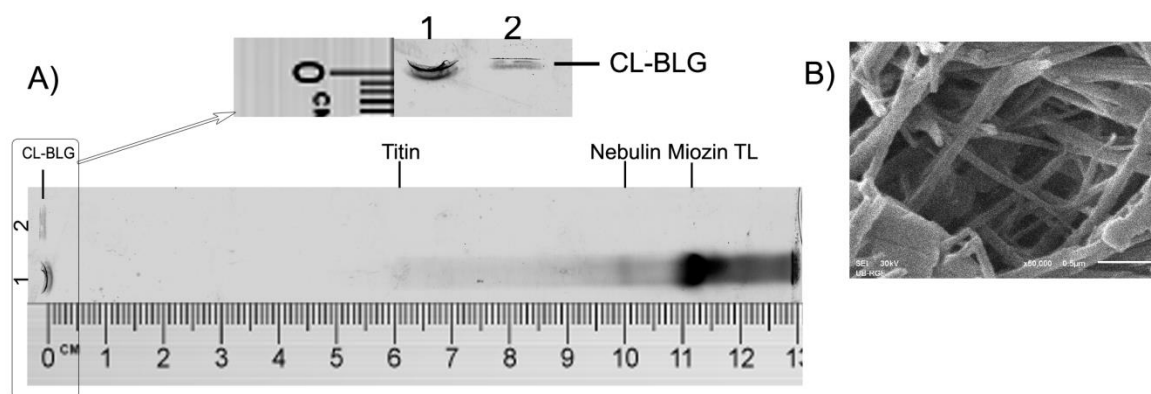
6.1. Rezultati

6.1.1. Karakterizacija umreženog β -laktoglobulina (CL-BLG)

Zbog svoje kompaktne globularne strukture BLG je loš supstrat za enzime za umrežavanje. Da bi prevazišli ovu prepreku koristili smo kafeinsku kiselinu kao pomoćno jedinjenje i tretirali smo BLG ultrazvukom visokog intenziteta pre enzimske reakcije. Tretman ultrazvučnim talasima je „otvorio“ terciarnu strukturu proteina, čime su ciljni aminokiselinski bočni ostaci postali pristupačniji lakazi iz *Trametes versicolor* (5.2.5, 5.4.1). Umreženi BLG (CL-BLG, od engl. cross-linked) je sadržao više od 90% monomernog BLG-a, sudeći po SDS-PAG elektroforezama iz odeljka 5.2.2.

Elektroforeza na agaroznom gelu se sprovodi obično za separaciju proteina visoke molekulske mase, ipak, kao što se vidi na Slici 6.1.A, CL-BLG je malo migrirao od mesta aplikacije. Kao referentni proteini korišćeni su teški lanac miozina- 220 kDa, nebulin- 800 kDa i titin- oko 3000 kDa iz ekstrakta mišića miševa. Pomoću relativne pokretljivosti (R_f) i molekulske mase referentnih proteina konstruisana je kriva zavisnosti logaritma molekulske mase od R_f vrednosti. Sa krive je ekstrapolacijom određeno da je molekulska masa CL-BLG-a ≥ 50 -60 MDa. Iako se ne može preciznije odrediti molekulska masa CL-BLG-a ovom ili nekom drugom poznatom biohemijском metodom zbog veličine i smanjene rastvorljivosti CL-BLG-a, prema našim saznanjima, to je najveći u literaturi prijavljeni enzimski umreženi protein do sada.

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) se koristi za određivanje veličine, oblika i morfologija čestica različitog porekla. SEM skenira površinu preparata pa sliku oblikuje otkrivajući elektrone koji se odbijaju od spoljnje površine preparata. Predstavlja neobičnu tehniku zbog utiska dubine koji se stiče posmatranjem prikazanih bioloških struktura. Kao što smo i očekivali, čestice CL-BLG-a nisu jednake po veličini, ali poseduju uniformnu morfologiju koja se odlikuje prisustvom vlakana širokih oko 60 nm (Slika 6.1.B). Vlakna su isprepletana i formiraju mrežu koja verovatno dodatno stabilizuje strukturu CL-BLG-a.

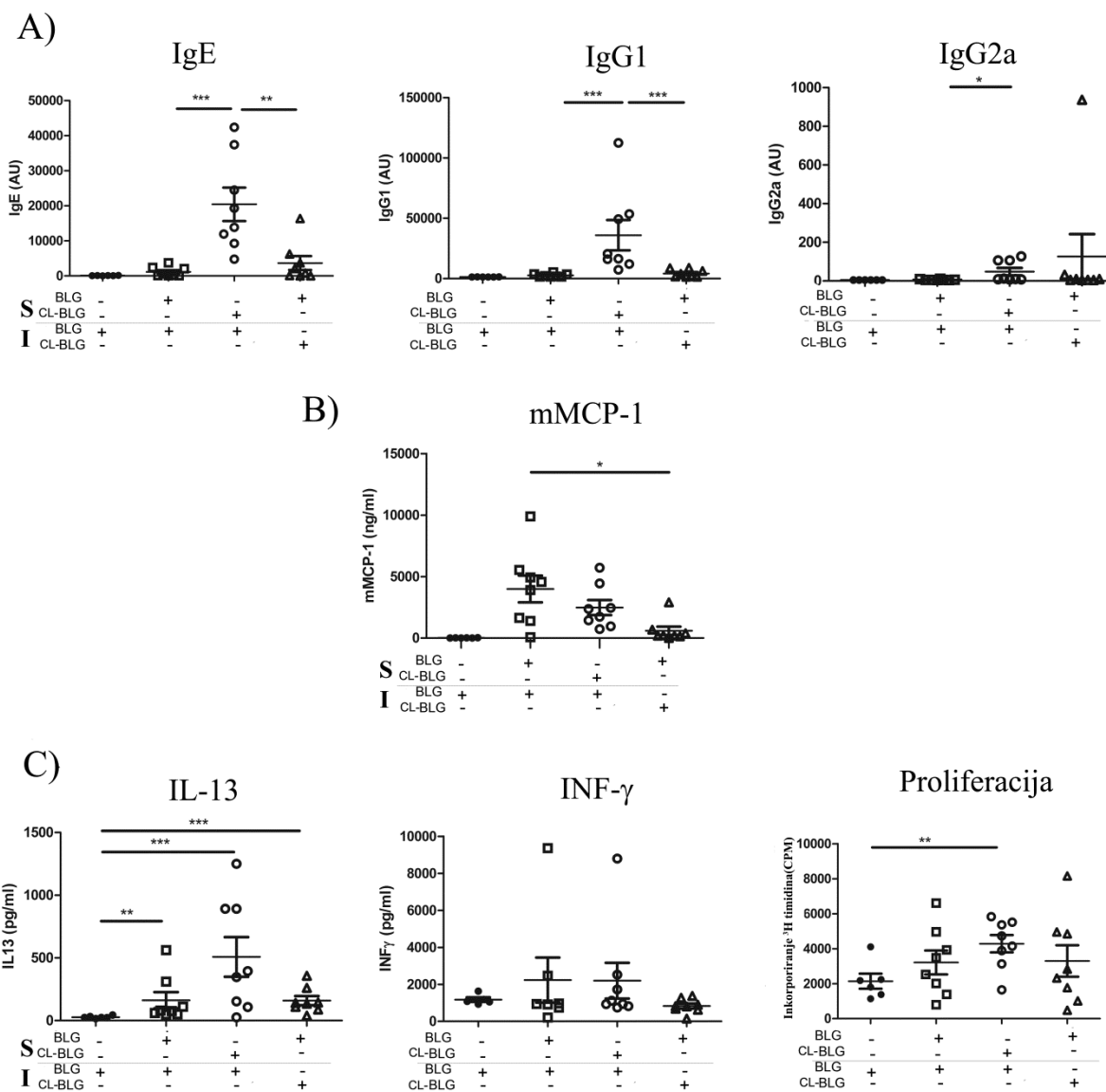


Slika 6.1. A) Elektroforeza na agaroznom gelu. Traka 1: proteini ekstrakta mišića miševa korišćeni su kao molekularni markeri: miozin TL (teški lanac)- 220 kDa, nebulin- 800 kDa, titin- oko 3000 kDa. Traka 2: 10 μg umreženog BLG-a (CL-BLG). Lenjir je priložen radi upoređivanja relativnih pokretljivosti molekularnih markera sa literaturnim podacima. B) Skenirajuća elektronska mikrografija CL-BLG-a pri uvećanju od 50.000x. Skala odgovara rastojanju od 0.5 μm.

6.1.2. Ispitivanje alergenosti BLG i CL-BLG-a u mišjem modelu alergije na hranu

Prvo smo ispitivali alergenost BLG i CL-BLG-a *in vivo*. U toku četiri nedelje BALB/c miševima smo na svakih sedam dana hranili intragastrično BLG ili CL-BLG-om u prisustvu kolera toksina kako bismo utvrdili njihov potencijal za senzitivizaciju miševa tj. razvijanje simptoma alergija. Kolera toksin je neophodni adjuvans koji se koristi za uspostavljanje životinjskih modela alergije na hranu. Smatra se da je uloga kolera toksina da poveća permeabilnost epitela GIT-a kako bi se povećao transport intaktnih proteina.

U serumima dobijenih iz krvi vađene pre izazivanja (24. dan), određena su antitela specifična na BLG. Miševi koji su senzitivisani na CL-BLG, generisali su znatno više IgE i IgG1 i IgG2a antitela u poređenju sa miševima koji su senzitivisani nativnim BLG-om (Slika 6.2.A). Povećanje IgG2a nije bilo toliko izraženo kao povećanje IgE i IgG1. Odnos IgG1/IgG2a je bio značajno veći u životinjama senzitivisanim na CL-BLG (1230.5 ± 226.1



Slika 6.2. Alergenost BLG i CL-BLG-a *in vivo*. A) Titar BLG specifičnih IgE, IgG1 i IgG2a antitela određen u serumima pre senzitivacije. B) Koncentracija mišje proteaze-1 iz mastocita (mMCP-1) određena u serumima nakon izazivanja. C) Produkcija IL-13 i INF- γ i proliferacija ćelija splazine nakon stimulacije BLG-om *ex vivo*. Razlike su statistički značajne ukoliko je $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**) ili $p \leq 0.001$ (***). S- faza senzitivacije, I- faza izazivanja.

naspram 370 ± 49.9 za BLG), dok je odnos IgE/IgG1 samo malo veći (1.0 ± 0.3 naspram 0.5 ± 0.1 za BLG). Grubo rečeno, produkcija IgE i IgG1 antitela je pod kontrolom IL-4 (Th2) a IgG2a antitela pod kontrolom INF- γ (Th1). Mišiji IgG1 je po funkciji sličan humanom IgG4 a IgG2a humanom IgG1.

Dvadeset osmog dana, miševi su intragastrično hranjeni proteinima bez prisustva kolera toksina (faza izazivanja, engl. challenge). Serumini su dobijeni iz krvi koja je vađena 60 min nakon hranjenja i u njim je detektovana koncentracija proteaze-1 koja se oslobađa iz mastocita u cirkulaciju nakon njihove IgE posredovane aktivacije alergenom (mMCP-1, od engl. **m**ouse **m**ast **c**ell **p**rotease-**1**). Nakon oralnog izazivanja BLG-om, slična koncentracija mMCP-1 je detektovana u životinjama koje su prethodno senzitivisane na BLG ili CL-BLG (Slika 6.2.B). Zanimljivo je, međutim, da je nakon izazivanja CL-BLG-om značajno manje mMCP-1 detektovano u serumima životinja koje su senzitivisane na BLG u odnosu na izazivanje BLG-om (Slika 6.2.B). Iako CL-BLG pokazuje veći potencijal za indukciju alergije na BLG kod miševa, ne dovodi do pojačanja simptoma reakcija rane preosetljivosti kod miševa prethodno senzitivisanih na BLG.

Dvadeset devetog dana životinje su žrtvovane i izvađene su slezine. Čelije slezine su inkubirane naredna 72h sa BLG-om, kako bi se specifične T-čelije ponovo aktivirale i određivanjem citokina ispratila Th polarizacija njihovog odgovora na BLG. Produkcija citokina se nije značajno razlikovala između grupa koje su senzitivisane na BLG ili CL-BLG. U svima je detektovana povećana produkcija IL-13 u odnosu na kontrolu mada je u grupi senzitivisanoj na CL-BLG primećena nešto veća produkcija, produkcija INF- γ je bila ista kao u kontroli, a IL-5 nije detektovan. Značajno veća proliferacija čelija u odnosu na kontrolu je detektovana samo u grupi koja je senzitivisana na CL-BLG (Slika 6.2.C). Povećanje titra BLG specifičnih antitela nakon senzitivizacije CL-BLG-om nije bilo ispraćeno značajno povećanim Th2 ćelijskim odgovorom nakon stimulacije čelija slezine *ex vivo*.

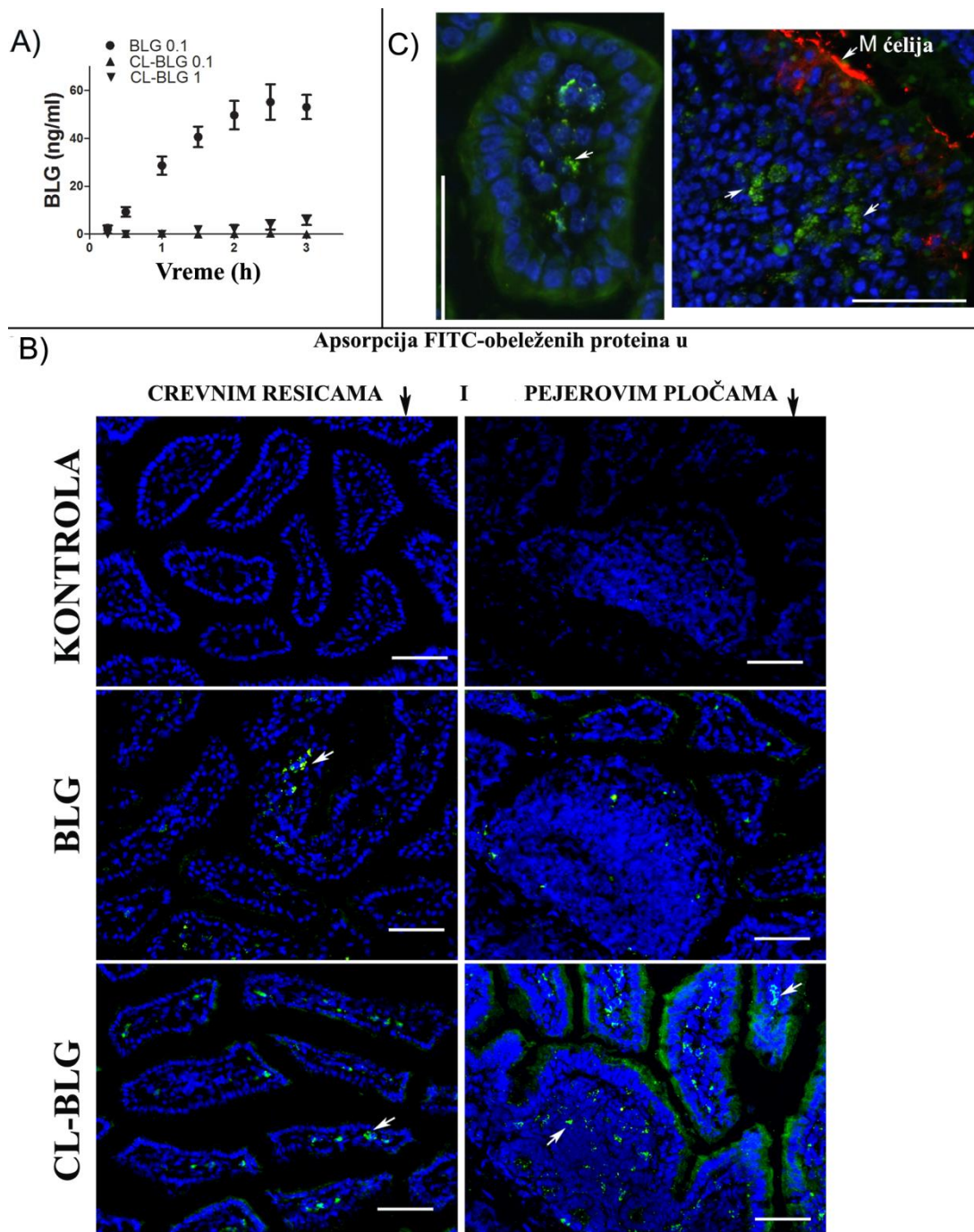
6.1.3. Transport i proteoliza BLG i CL-BLG-a u uslovima gastrointestinalnog trakta

Podložnost gastrointestinalnoj degradaciji i mesto apsorpcije proteina u crevnom traktu su važni faktori koji utiču na alergenost i imunogenost alergena hrane (odjeljak 2.4.2.1). Kako je u korišćenom mišjem modelu sensitizacija izvršena preko GIT-a, pretpostavili smo da su primećene razlike u alergenosti BLG i CL-BLG-a upravo posledica promenjene digestibilnosti i transporta u crevnom traktu.

Prvo smo ispitili transport BLG i CL-BLG-a *in vitro* kroz monosloj polarizovanih Caco-2 ćelija koji imitira sloj enterocita u crevnom traktu. Transport CL-BLG-a je bio značajno smanjen u odnosu na transport BLG-a. Čak i kada je primenjena 10x veća koncentracija CL-BLG-a (1 mg/ml) transport se samo neznatno povećao (Slika 6.3.A) S' obzirom na veličinu CL-BLG-a ovaj rezultat je i očekivan.

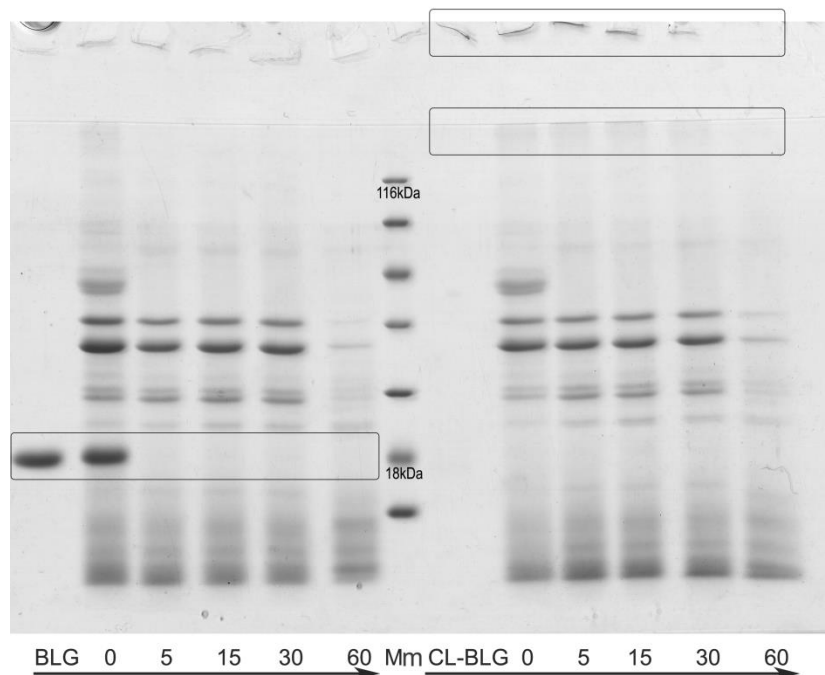
Apsorpcija fluorescein izotiocijanata (FITC) obeleženih proteina je ispitana i *in vivo*. BLG i CL-BLG su detektovani u lamina propria-i crevnih resica (vili) već nakon 15 min od hranjenja. Nakon 30 min od hranjenja, CL-BLG je detektovan i u folikularnoj i interfolikularnoj oblasti Pejerovih ploča (Slika 6.3.B). BLG nije detektovan u Pejerovim pločama, sva fluorescencija viđena u toj oblasti je povezana sa auto-florescencijom. Zanimljivo je da je posle 30 min detektovana povećana fluorescencija CL-BLG-a u resicama koje okružuju Pejerove ploče. Apsorbovani proteini su razlikovani od nespecifične fluorescencije jer su pokazivali tačkasti ili granularni izgled što se može videti na odabranim uvećanim sekcijama resica i Pejerovih ploča (Slika 6.3.C).

U *in vitro* testu dvofazne digestije u kome je simulirano varenje proteina u GIT-u, CL-BLG je bio rezistentniji na proteolizu. Digestija je rađena u dva koraka, u prvom koraku su proteini digestovani pepsinom 60 min (simulirana gastrična digestija), zatim je reakcija stopirana promenom pH na 7.2 i digestija je nastavljena sa smešom enzima pankreasa iz svinje, pankreatinom (simulirana digestija u duodenumu). U toku druge faze, alikvoti su vađeni nakon 0, 5, 15, 30 i 60 min i reakcija je u njima stopirana kuvanjem na



Slika 6.3. A) Transport BLG i CL-BLG-a kroz monosloj Caco-2 ćelija pri koncentraciji 0.1 i 1 mg/ml. B) Apsorpcija FITC-obeđenih proteina u crevnim resicama nakon 15 min i u Pejerovim pločama nakon 30 min od hranjenja miševa (n=3 po grupi). Kontrola- miševi hranjeni PBS-om. C) Uvećane odabrane sekcije crevnih resica (BLG 15 min) i Pejerovih ploča (CL-BLG 30 min). Skala odgovara rastojanju od 100 μ m.

95°C. Dok se BLG razgradio u toku 5 min, CL-BLG je u potpunosti digestovan tek posle 60 min simulirane intestinalne digestije (Slika 6.4)

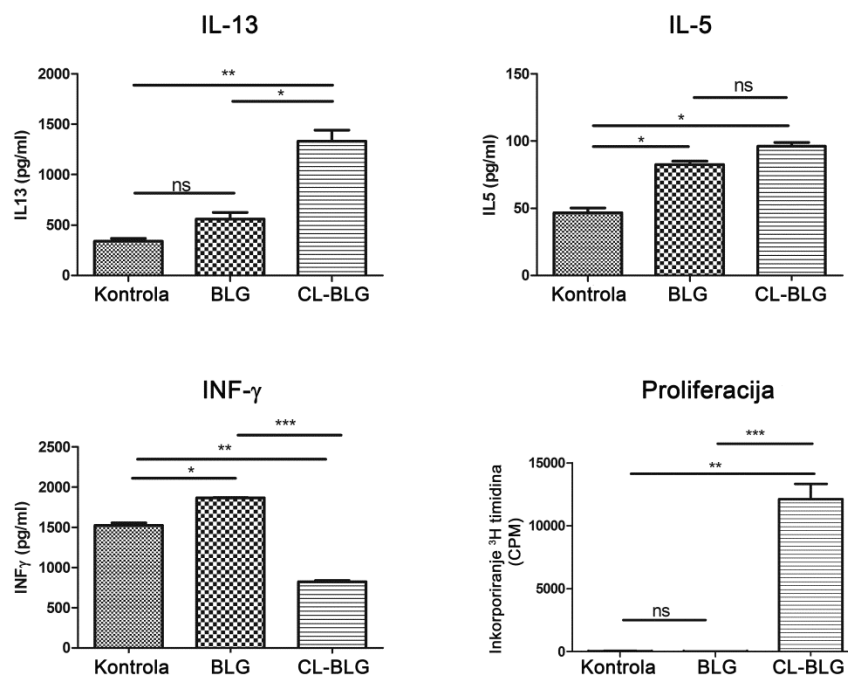


Slika 6.4. *In vitro* dvofazna digestija. Nakon 60 min pepsinske digestije, reakcija je nastavljena sa pankreatinom (smeša enzima iz pankreasa). Alikvoti su vađeni nakon 0, 5, 15, 30 i 60 min i analizirani na 14% SDS-PAGE gelu pod redukujućim uslovima. Mm-proteinski molekulski markeri. Uokvirene su proteinske trake koje odgovaraju BLG-u (18 kDa) i polimerima CL-BLG-a (polimeri na početku gela za razdvajanje i oni zaostali u bunarima).

6.1.4. Ispitivanje interakcija BLG ili CL-BLG aktiviranih dendritičnih ćelija i BLG-specifičnih T-ćelija

Pošto nismo uočili velike razlike u citokinskom odgovoru T-ćelija iz suspenzija ćelija slezine, ispitali smo da li je enzimsko umrežavanje BLG-a uticalo na DC-T-ćelijske interakcije u čistijem sistemu *in vitro*. CD4⁺ T-ćelije su izolovane iz miševa prethodno imunizovanih intraperitonealno sa BLG-om u prisustvu aluminijum hidroksida kao

adjuvansa. DĆ-e su diferencirane *in vitro* iz ćelija koštane srži naivnih miševa i stimulisane sa BLG ili CL-BLG-om. Nakon 24h, stimulisane DĆ-e su gajene zajedno sa sveže izolovanim BLG specifičnim CD4⁺ T-ćelijama 72h. CL-BLG stimulisane DĆ-e su indukovale veću produkciju IL-13 i manju sekreciju INF-γ od strane T-ćelija nego BLG stimulisane DĆ-e. Th2 zavisna aktivacija T-ćelija je bila praćena povećanom proliferacijom. DĆ-e stimulisane BLG ili CL-BLG su uslovile produkcija IL-5 ali se ona nije statistički značajno razlikovala između grupa (Slika 6.5). Kada smo uzeli u obzir rezultate iz tri nezavisna eksperimenta odnos CL-BLG i BLG produkovanih citokina je bio za IL-13 2.6±0.8, za INF-γ 0.7±0.2 i za IL-5 1.3±0.1.



Slika 6.5. Nakon 72h zajedničke kulture BLG-specifičnih CD4⁺ T-ćelija i DĆ-a stimulisanih BLG ili CL-BLG-om, u supernatantu je određen nivo produkcije IL-13, IL- 5 i INF-γ. Proiliferacija T-ćelija je merena inkorporiranjem radioaktivnog timidina. Kontrola-T-ćelije inkubirane sa naivnim DĆ-ma. Razlike su statistički značajne ukoliko je p≤0.05 (*), p≤0.01 (**) ili p≤0.001 (***). Prikazani su rezultati jednog odabranoeg od tri nezavisna eksperimenta.

6.1.5. Preuzimanje BLG i CL-BLG-a od strane dendritičnih ćelija

Da bi bolje razumeli različite T-ćelijske odgovore izazvane BLG i CL-BLG-om pratili smo preuzimanje i endocitozu proteina od strane nezrelih DĆ-a.

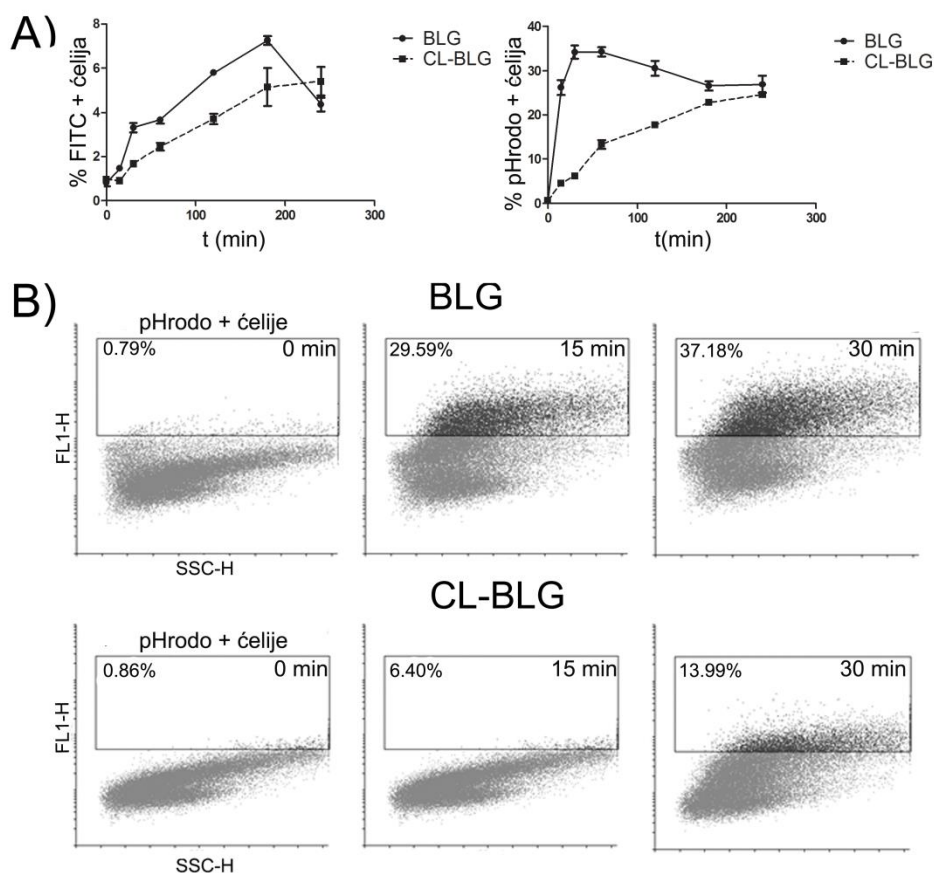
Praćenjem FITC-obebeženih proteina u vremenu dobijaju se informacije o vezivanju proteina za ćelijski membranu i preuzimanju od strane DĆ-a. FITC obebeženi CL-BLG se vezivao ali je bio preuziman značajno sporije od BLG-a do 240. min, kada su se nivoi izjednačili. pHrodo boje su osetljiviji markeri za praćenje internalizacije antigena nego FITC jer njihova fluorescencija raste samo na kiselom pH koje je prisutno u endolizozomalnim vezikulama. Endocitoza pHrodo obebeženog BLG-a je bila brza, dostigla je svoj maksimum u roku od 30-60 min, zatim se polako smanjila i dostigla zasićenje nakon 180 min. U skladu sa prethodnim rezultatima, pHrodo obebežen CL-BLG je internalizovan sporije ali je endocitoza dostigla zasićenje između 180-240 min slično kao kod BLG-a (Slika 6.6.A) Najveća razlika u internalizaciji proteina je primećena u prvih 30 minuta, gde se procenat pHrodo pozitivnih ćelija povećao od 0.79 do 29.59 i 37.18% za BLG i od 0.86 do 6.4 i 13.99% za CL-BLG nakon 15 i 30 minuta (Slika 6.6.B).

6.1.6. *In vitro* endolizozomalna degradacija BLG i CL-BLG-a

Pošto je efikasna obrada antigena od presudnog značaja za njegovu imunogenost, izolovali smo iz DĆ-a endolizozomalni sadržaj koji je bogat endo- i egzoproteazama koje efikasno degraduju proteinske antigene do peptida i aminokiselina. BLG i CL-BLG su digestovani endolizozomalnim proteazama 0-48h. Digestovani uzorci su analizirani SDS-PAG elektroforezom i tačno masenom spektrometrijom.

Na osnovu SDS-PAG elektroforeze digestovanih uzoraka zapazili smo da se BLG degraduje sporo, ali i da je došlo do degradacije CL-BLG-a. Proteinska traka na 18 kDa koja odgovara monomernom BLG-u je bila intenzivna i nakon 48h. Digestija CL-BLG-a je išla preko intermedijera koji su primećeni na interfazi koncentrujućeg i razdvajajućeg gela. Posle 24h agregati CL-BLG-a na interfazi i u bunarima nisu bili vidljivi (Slika 6.7). Zaista,

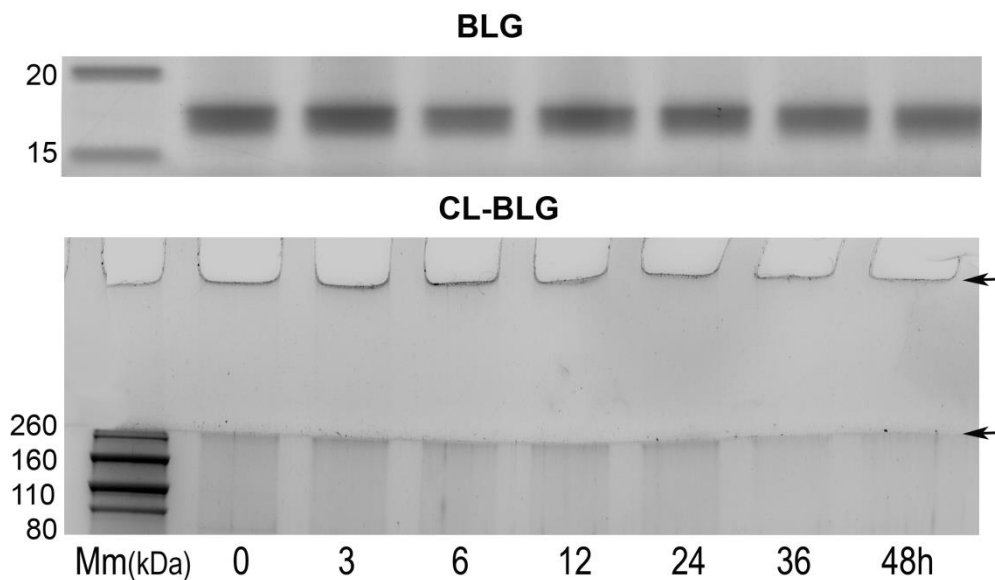
broj oslobođenih peptida koji je detektovan tandem masenom spektrometrijom se povećavao u vremenu u uzorcima BLG-a, dok je u CL-BLG uzorcima dostigao svoju maksimalnu vrednost posle 24h, a zatim se postepeno smanjivao.



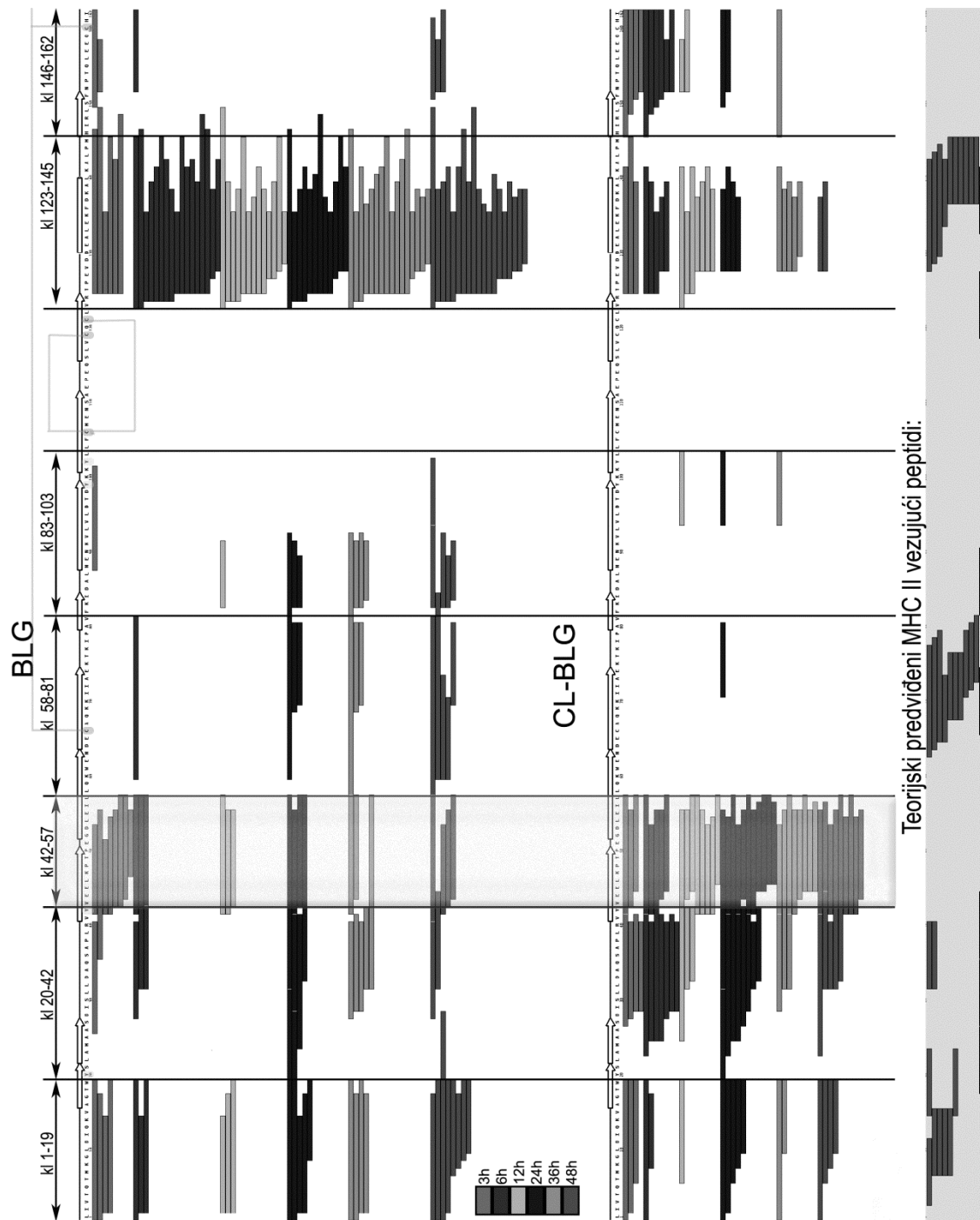
Slika 6.6. Preuzimanje FITC ili pHrodo obeleženih BLG i CL-BLG-a od strane dendritičnih ćelija. A) Praćenje preuzimanja obeleženih proteina u vremenu. B) Najveća razlika je primećena u prvih 30 min internalizacije pHrodo obeleženih proteina. Reprerzentativni ćelijski profili od tri eksperimenta.

Peptidi koji potiču od β -laktoglobulina i koji su identifikovani u uzorcima su korišćeni za generisanje mapa koje pružaju uvid u profil oslobođenih peptida i identifikaciju T-ćelijskih epitopa (Slika 6.8). Peptidi iz BLG i CL-BLG-a grupisani su u sedam klastera (početna-krajnja pozicija aminokiselina u proteinu): 1-19, 20-42, 42-57, 58-

81, 83-103, 123-145 i 146-162. Peptidi iz jednog klastera dele zajedničko jezgro i imaju promenljive bočne regione. Dva dodatna manja klastera su primećena kod BLG-a: 1-31 i 32-57. Klaster sa najviše detektovanih peptida za BLG je 123-145, dok su peptidi sa C-terminusa (146-162) najmanje prisutni. Peptidi iz centralnog regiona BLG-a (58-81, 83-103) pojavljivali su se uglavnom kasnije, posle 24h. Iako CL-BLG oslobađajući peptidi dele zajedničke klasterne sa BLG-om, njihova raspodela je drugačija. U odnosu na BLG, CL-BLG je degradacijom dao veći broj peptida u N i C terminalnim klasterima: 42-57 (dominantan), 20-42, 146-162 i manji broja peptida u klasterima 1-19, 123-145. Međutim, peptidi iz centralnog regiona 58-123 su bili slabo zastupljeni u CL-BLG digestima verovatno zbog otežane proteolize unutrašnjosti proteina koja je dodatno preko Y i C aminokiselinskih ostataka umrežena (u regionu 58-123 su prisutna 4 C i 2 Y, Slika 6.8).



Slika 6.7. BLG i CL-BLG su digestovani endolizozomalnim proteazama *in vitro*. Nakon 0, 3, 6, 12, 24, 36 i 48h reakcija je stopirana i uzorci su analizirani na 10% Tris-Tricinskom SDS-PAGE gelu.



Slika 6.8. Mapa peptida oslobođenih za vreme 3-48h endolizozomalne digestije BLG i CL-BLG-a. Teorijски predviđeni BLG peptidi koji se vezuju za MHC II su poravnati sa sekvencom desno. Peptidi iz klastera 42-57 (kl_{x-x}) su se pokazali imunogenim u ranije publikovanim eksperimentima. Na sekvenci su označeni disulfidni mostovi.

Nedostatak peptida u regionu od 104-122 koji je primećen u oba slučaja je verovatno posledica otežane proteolize usled čvrstog držanja disulfidne veze 106-119 ili alternativne 106-121. Ove S-S veze se u eksperimentalnim uslovima sa 2 mM ditioteritolom verovatno nisu raskinule, za razliku od S-S veze 66-160 (Slika 6.8).

Predikcije MHC II vezujućih peptida β -laktoglobulina su napravljene 6/19/2013. pomoću IEDB dostupnog programa za predikciju SMM-align (verzija 1.1) i programa RANKPEP (Nielsen, 2007; Reche i Reinherz, 2007). Iz SMM-Align analize samo su peptidi sa IC_{50} ispod 5000 nM smatrani za potencijalno vezujuće peptide jer je to gornja granica za sve poznate T-ćelijske epitope. Peptidi iz klastera 1-19, 20-42, 58-81 i 123-145 su navedeni kao potencijalni kandidati (Slika 6.8).

6.2. Diskusija

U ovom radu smo pokazali po prvi put da visoko polimerizovani lakazom umreženi BLG izaziva alergijsku senzitivizaciju kod miševa na efikasniji način od nativnog BLG-a. Intragastrična senzitivizacija sa CL-BLG-om je rezultovala većom produkcijom BLG-specifičnih IgG1 i IgE antitela koja nije ispraćena sa istim povećanjem IgG2a. Nasuprot tome, CL-BLG je slabije aktivirao mastocite u mukozi životinja senzitivisanih na BLG, slično pasterizovanom BLG-u za koji je pokazano da poseduje manji anafilaktički potencijal (Roth-Walter, 2008). Iako CL-BLG senzibilisani miševi poseduju veći titar BLG specifičnih IgE antitela, oslobađanje mMCP-1 se ne povećava nakon izazivanja BLG-om. Moguće je da se BLG i CL-BLG kompleksi sa IgG-om formiraju pre dostizanja do IgE-a na površini mastocita. Ovi kompleksi mogu unakrsno da povežu visoko afinitetni IgE receptor $Fc\epsilon RI$ sa nisko afinitetnim IgG $Fc\epsilon RII$ receptorom, čime se inhibira IgE indukovana degranulacija mastocita (Daëron, 1995; Kepley, 2004).

Pošto je do senzitivizacije miševa došlo preko GIT-a, pretpostavili smo da osnovni mehanizam pojačane imunogenosti CL-BLG-a leži u izmenjenoj digestibilnosti i mestu apsorpcije u GIT-u. Zato smo ispitivali BLG i CL-BLG transport *in vitro* i *in vivo* i uradili digestiju u simuliranim uslovima GIT-a. Mali i rastvorljiv BLG je transportovan kroz

monosloj Caco-2 ćelija i apsorbovan je od strane enterocita u GIT-u dok je CL-BLG apsorbovan na dva načina. Manji deo CL-BLG-a je apsorbovan preko enterocita ali je veći deo transportovan preko M-ćelija koje oblažu Pejerove ploče. Veća otpornost CL-BLG-a na proteolizu omogućila mu je duži polu-život u GIT-u, pa se može se naći i u crevnim resicama i u Pejerovim pločama nakon 30 minuta, dok je BLG mahom detektovan nakon 15 min.

U skladu sa našim rezultatima, Roth-Walter i sar. su pokazali da pasterizacijom formirani agregati proteina surutke poseduju veći potencijal za indukciju alergijske senzitivacije i manji potencijal za indukciju anafilaktičkog šoka kod miševa. Smatraju da je to posledica apsorpcije agreriranih proteina od strane ćelija Pejerovih ploča za razliku od izvornih proteina koji su transportovani kroz enterocite (Roth-Walter, 2008). Međutim, senzitivacija sa transglutaminazom umreženim kazeinom nije povećavala nivo IgE-a (van Esch, 2013). Prema tome, pretpostavljamo da će imunski odgovor biti povišen samo na stabilne agregate ili polimere onih alergena koji se obično transportuju kroz enterocite zbog translokacije u Pejerove ploče. Za proteine poput kazeina i alergena kikirikija koji se izvorno preuzimaju kroz Pejerove ploče (Chambers, 2004; Roth-Walter, 2008) neće doći do povećanja imunogenosti posle polimerizacije. Takođe, zbog smanjenog transporta kroz epitel, polimerizovani proteini verovatno zaobilaze lamina propria-ju što ograničava njihov kontakt sa mastocitima.

CL-BLG poseduje veliki potencijal za indukciju proizvodnje antitela, što može biti posledica bilo T-ćelijski nezavisnog ili T-ćelijski zavisnog odgovora. Dintzis i sar. su otkrili da su polimeri molekulske mase iznad 100 kDa i valence koja prelazi 10 efikasni u umrežavanju B-ćelijskog receptora i da na taj način aktiviraju T-ćelijski nezavisnu proliferaciju B-ćelija i proizvodnju antitela (Dintzis, 1989). Pošto se tokom proteolize u simuliranim uslovima GIT-a, CL-BLG degraduje kroz niz intermedijera koji sadrže 10 i više monomera, nije isključena T-ćelijski nezavisna aktivacija B-ćelija.

Kako bi dodatno objasnili povećanu alergenost CL-BLG-a *in vivo*, ispitali smo njegove interakcije sa mišjim dendritičnim i T-ćelijama *in vitro*. Umrežavanje BLG-a lakazom je usporilo endocitozu proteina, ali je obrada CL-BLG-a bila efikasna, što je dovelo do jakog Th2 polarizovanog odgovora i povećane ekspanizije BLG-specifičnih

CD4⁺ T-ćelijskih klonova. Izgleda da polako i ravnomerno dostavljanje CL-BLG-a mikrozomalnim enzimima obezbeđuje ravnomernu proteolizu i oslobađanje MHC II vezujućih peptida.

U toku obrade CL-BLG-a endolizozomalnim enzimima iz dendritičnih ćelija miševa došlo je do slabijeg oslobađanja peptida iz centralnog regiona i povećanog oslobađanja peptida sa N i C-terminusa. Kako su Matthias i sar. pokazali da su proteolitički sastav, aktivnost i specifičnost endolizozomalnih sadržaja iz humanih i mišjih dendritičnih ćelija slični, proteoliza BLG i CL-BLG-a će se odvijati sličnom kinetikom i u humanim ćelijama (Matthias, 2011). Među peptidima koji su detektovani u uzorcima nakon endolizozomalne degradacije identifikovali smo glavne T-ćelijske epitope BLG-a poređenjem sa prethodno publikovanim rezultatima. Totsuka i sar. (Totsuka, 1997) navode da su glavni BLG T-ćelijski epitopi 67-75, 71-79, 80-88 (58-81 klaster), dok Tsuji i sar. (Tsuji, 1993) izdvajaju jedan peptid 42-56 (42-57 klaster) kao dominantni T-ćelijski epitop u BALB/c miševima. Dva od četiri BLG-specifična T-ćelijska klona dobijenih iz alergičnih pacijenata su prepoznavala peptide 1-21, 47-67, 97-117 bez obzira na HLA fenotipa (Inoue, 2001). U drugoj studiji četiri od šest BLG-specifičnih T-ćelijskih klonova je reagovalo na peptid 97-117 (Kondo, 2008). U trećoj studiji, glavni linearni epitopi BLG-a sposobni za vezivanje IgE-a su bili fragmenti 41-60, 102-124 i 149-162 koji su bili prepoznati od strane 92, 97 i 89% pacijenata od ukupno njih 46 (Sélo, 1999). U skladu sa prethodnim rezultatima iz mišjih i humanih studija, pretpostavljamo da su peptidi iz klastera 42-57, gde CL-BLG daje konstantno veći broj peptida, imunodominatni T-ćelijski epitopi. Takođe, smatramo da su i peptidi iz klastera 146-162 i 123-145 verovatno imunogeni. Enzimsko umrežavanje BLG-a je uslovalo promene u kinetici endolizozomalne digestije što je rezultovalo generisanjem peptida sa jačim T-ćelijski-aktivacionim potencijalom (peptidi sa N terminusa).

6.3. Materijal i metode

6.3.1. Priprema i karakterizacija proteinskih uzoraka

BLG je rastvoren u 100 mM Na-acetatnom puferu pH 4.5 i tretiran ultrazvukom 60 min bez hlađenja sistema (temperatura u uzorku raste usled izlaganja ultrazvuku), kao što je opisano u odeljku 5.4.1. samo na većoj skali. Parametri poput vremena izlaganja, temperature i izlazne snage su bili isti. Efikasnost tretmana je procenjena elektroforetski poređenjem sa uzorcima koji su ranije tretirani i čija je struktura detaljno okarakterisana u 5. poglavlju. Nakon tretmana, sonifikovani BLG je umrežen u reakciji sa lakazom iz *Trametes versicolor* i kafeinskom kiselinom kao što je opisano u odeljku 5.4.3.2. Umreženi CL-BLG i nativni BLG su intenzivno dijalizovani naspram PBS-a. Koncentracija proteina je određena u uzorcima korišćenjem BCA testa po uputstvima proizvođača za rad u mikrotitar pločici (Pierce, Amsterdam, Holandija). Proteini su konjugovani sa fluorescentnim bojama FITC-sukcinimidnim estrom (Sigma-Aldrich) i pHrodo Green-sukcinimidnim estrom (Invitrogen, Life Technologies, Breda, Holandija) prateći uputstva proizvođača. Za eksperimente sa ćelijskim kulturama, BLG i CL-BLG su dodatno prečišćeni od endotoksina afinitetnom hromatografijom u „baču“ na matriksu Polymyxin B-agarozu po uputstvu proizvođača (Sigma-Aldrich).

6.3.1.1. Vertikalna elektroforeza na agaroznom gelu

Elektroforeza na agaroznom gelu je urađena radi određivanja približne molekulske mase CL-BLG-a, kao što je urađeno ranije za razdvajanje proteina mišića (Warren, 2003). Ukratko, korišćeni su: Hoeffer SCI aparatura, staklene ploče za pripremu velikih gelova 16x18cm (najbolja rezolucija je na velikim gelovima), spejseri širine 1.5 cm, češljevi sa širokim zupcima, agarozu niske elektroendoosmoze sa niskom temperaturom geliranja (Fermentas). Nakon sklapanja „sendviča“, na dno je sipan do visine od 1 cm 14 % poliakrilamidni rastvor spremljen kao za SDS-PAGE i nadslojen n-butanolom. Nakon polimerizacije, poliakrilamidno postolje je isprano vodom i ploče su stavljene da se

temperiraju 30 min na 65°C. Za to vreme agroza je rastopljena u puferu za gel finalnog sastava: 1% agaroz, 30% v/v glicerol, 50 mM Tris, 0.384 M glicin i 0.1% w/v SDS pH 8.5 i ostavljena je da se temperira 5-10 min na 65°C. Zatim je agarozni rastvor naliven između ploča skoro do vrha i stavljen je češalj do dubine od 1cm od vrha ploča. Gel polimerizuje nakon 30 min na sobnoj temperaturi i 30 min na +4°C. Gornji i donji sistem pufera za elektroforezu je bio isti kao kod Laemmli-jeve procedure, (Laemmli, 1970), sa razlikom da je u gornji pufer dodat β -merkaptetanol do finalne koncentracije 10 mM. Uzorci su nanošeni kroz gornji pufer mikrošpicem da ne bi došlo do razlivanja. Elektroforeza je trajala od 4-5 h pri konstantnoj struji od 15 mA i uz neprestano hlađenje sistema.

Pošto ne postoje komercijalno dostupni proteinski markeri velikih molekularnih masa (>500 kDa), koristili smo ekstrakt mišjih mišića koji su spremljeni slično kao što je ranije opisano (Warren, 2003). Iz miševa soja BALB/c izolovani su *soleus* i *glutes* mišići koji su odmah zamrznuti potapanjem u tečni azot. Zamrznuto tkivo je homogenizovano u avanu sa tučkom uz dodatak pufera za ekstrakciju koji je sadržao 8 M ureu, 2 M thioureu, 3% SDS w/v, 75 mM DTT, 0.03% bromfenol plavo i 0.05 M Tris pH 6.8. Ekstrakt je prebačen u tubu, promešan vorteksiranjem i odmah skuvan 10 min na 95°C. Nakon centrifugiranja supernatant je izdvojen i odmah zaleđen na -80°C. Pre nanošenja na gel markeri su razblaženi 10x sa redukujućim puferom za SDS-PAGE (3.4.1.4) kako bi se ekstrakt razblažio i smanjila njegova viskoznost koja je velika usled prisustva uree i thiouree. Na gel je naneto 15 μ l razblaženih markera i 5-40 μ l CL-BLG-a (1 mg/ml u redukujućem puferu za uzorke). Proteinske trake su vizualizovane CBB-om.

6.3.1.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

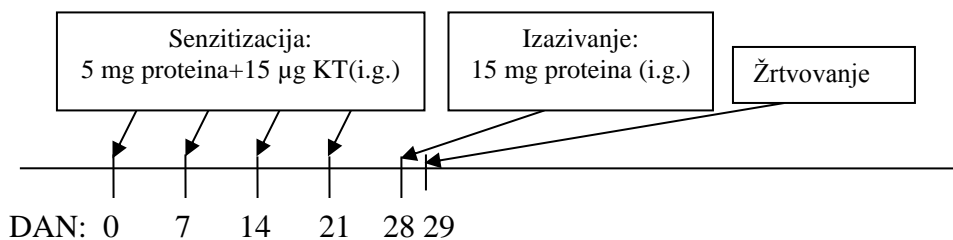
Za proučavanje površinske morfologije čestica CL-BLG-a korišćen je SEM. Snimanja su vršena na skenirajućem elektronskom mikroskopu JEOL JSM-6610LV sa W filamentnim pištoljem (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). Suspenzija CL-BLG-a je naneta na ugljeničnu samolepljivu traku koja je postavljena na aluminijski držač. Uzorci su osušeni do suva u eksikatoru i prekriveni legurom zlata i paladijuma ($d=15$ nm, $\rho=19.2$ g/cm³) pomoću Leica EM SCD005 sputter coater-a (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar,

Germany). Sekundarne elektronske slike su dobijene pri ubrzanju od 30 kV pod vakumom (15-30 μ Pa pritisak u komori).

6.3.2. Eksperiment senzitivacije miševa

Pet nedelja stare ženke soja BALB/c koje su odrasle u uslovima bez prisustva patogena su kupljene od kompanije Charles River (Nemačka). Svi miševi su uzgajani u vivarijumu Univerziteta u Utrehtu, Holandija, pod specifičnim uslovima bez prisustva patogena. Za eksperimente je dobijena dozvola od strane Komiteta za eksperimente nad životinjama Univerziteta u Utrehtu. BALB/c miševi su pogodni za uspostavljanje model sistema alergija jer podložni Th2 imunskom odgovoru.

Protokol za senzitivaciju miševa je sličan ranije opisanom (Kanjarawi, 2011). BALB/c miševi su hranjeni putem oralne gavaže (intragastrično i.g.) sa po 5 mg proteina + 15 μ g kolera toksina (KT, List Biological Laboratories, Inc., CA, USA) na dan 0, 7, 14 i 21. Dana 28. svi miševi su izazvani sa po 15 mg proteina intragastrično. Narednog dana miševi su žrtvovani cervikalnom dislokacijom, krvareni su iz obraza i delovi slezine su uzeti za restimulaciju ćelija (Šema 6.1). Miševi su takođe krvareni dana 24 i 28 posle izazivanja alergenom. Eksperimentalne grupe su prikazane u Tabeli 6.1.



Šema 6.1. Šema plana senzitivacije miševa

Tabela 6.1. Eksperimentalne grupe

	Senzitizacija	Izazivanje
1. Odsustvo senzitivacije/ Kontrola (n=6)	KT + PBS	PBS
2. BLG senzitivacija/ BLG izazivanje (n=8)	KT + BLG	BLG
3. BLG senzitivacija/ CL-BLG izazivanje (n=8)	KT + BLG	CL-BLG
4. CL-BLG senzitivacija/BLG izazivanje (n=8)	KT + CL-BLG	BLG

6.3.2.1. Određivanje antitela i markera aktivacije mastocita u serumu

U serumu miševa koji je dobijen 24. dana pre izazivanja, određen je nivo IgE, IgG1 i IgG2a antitela specifičnih na BLG u ELISA testu.

Za detekciju IgG1 i IgG2a antitela u bunare mikrotitar pločica (Highbond 3590; Costar, Kembridž, Masačusets, SAD) odmereno je po 100 μ l rastvora BLG-a koncentracije 10 μ g/mL u PBS-u, kuplovanje antigena za pločicu je trajalo preko noć na +4°C. Sutradan, nakon ispiranja TPBS-om (PBS sa 0.1% (w/v) Tween 20), neokupirana mesta su blokirana 1h na sobnoj temperaturi sa rastvorom PBS-Tween sa 0.5% BSA. Zatim su dodati uzorci seruma u nekoliko razblaženja i inkubiranje je nastavljeno 2h na sobnoj temperaturi. Za detekciju su korišćena sekundarna antitela konjugovana sa alkalnom fosfatazom (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, SAD) koja su inkubirana 1h u pločicama i supstrat *p*-nitrofenilfosfat u koncentraciji 1 mg/ml u 10 mM dietanolaminskom puferu pH 9.5. Apsorbanca je merena nakon razvijanja boje na 405 nm.

Za detekciju IgE antitela 100 μ l rastvora prečišćenog anti-mišjeg IgE antitela (izvor: pacov, klon R35-72, BD Pharmingen, San Dijego, Kalifornija, SAD) koncentracije 1.0 μ g/ml u PBS-u kuplovano je preko noći na +4°C. Koraci ispiranja, blokiranja i inkubiranja sa serumom su isti kao kod IgG antitela. Nakon inkubiranja seruma, u bunare je dodat rastvor BLG-a koji je konjugovan sa digoksininom, inkubiranje je trajalo 1h. Konjugovanje digoksinina je urađeno po uputstvu proizvođača (Roche, Mahnejm, Nemačka). Detekcija je izvršena jednočasovnim inkubiranjem sa anti-digoksinin antitelima koja su konjugovana sa peroksidazom iz rena (Roche) i komercijalno dostupnim

rastvorom tetrametilbenzidina kao supstratom (Sigma-Aldrich). Nakon razvijanja boje reakcija je stopirana sa 2 M H₂SO₄ i apsorbancija je merena na 450 nm.

Nivo antitela u serumu je izražen relativno u odnosu na referentni „pul“seruma koji je napravljen mešanjem seruma koji su u preliminarnim ELISA testovima bili pozitivni na BLG. Standardna prva je napravljena korišćenjem serijskih razblaženja „pula“, polazno razblaženje je označeno kao 1000 arbitrarnih jedinica (AU), a svako sledeće je umanjivano za faktor razblaženja. Za crtanje standardnih kriva korišćena je sigmoidna funkcija koja uzima u obzir četiri parametra ili „dose-response curve“.

Koncentracija mišje proteaze 1 koju luče mastociti nakon aktivacije alergenom (mMCP-1, od engl. **m**ouse **m**ast **c**ell **p**rotease-**1**) je određena u serumima koji su dobijeni iz krvi koja je izvađena iz svih životinja 28. dana 60±10 min nakon izazivanja alergenom. Za detekciju mMCP-1 korišćen je komercijalno dostupni ELISA test (Moredun scientific Ltd, Midlotijan, Škotska).

Rezultati su logaritmovani radi dobijanja normalne distribucije, a zatim i statistički upoređeni studentskim t testom.

6.3.2.2. Ex vivo restimulacija ćelija slezine

Delovi slezina su izolovani iz miševa 29. dana od početka senzitivizacije sekcijom. Korak homogenizacije nije rađen u sterilnoj zoni ali je korišćena čista i prethodno sterilisana plastika. Tkivo je homogenizovano u RPMI1640 glutamax ćelijskom medijumu (Gibco) pritiskanjem pomoću klipa plastičnog šprica o dno Petri šolje. Homogenizat je filtriran kroz ćelijsko sito pora veličine 70 µm, ćelijska suspenzija je centrifugirana, isprana medijumom i ćelije su prebrojane pomoću automatskog brojača ćelija Coulter Counter (Coulter Electronics, Luton, UK).

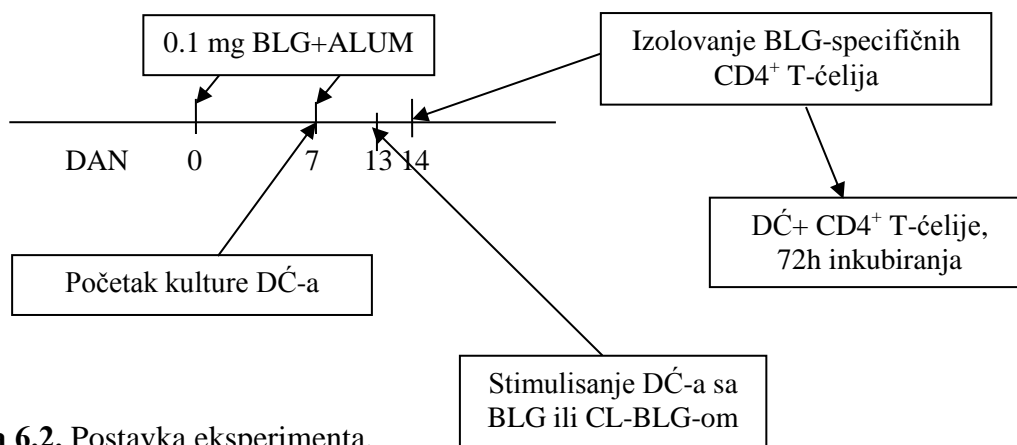
Svaki sledeći korak je rađen u sterilnoj zoni u laminaru. U mikrotitar pločicama sa 96 bunara ćelije su inkubirane (3.75×10^5 /bunaru) sa 50 µg/ml BLG-a (ili bez u kontrolama) u 200 µl kompletnog medijuma 72h na 37°C u atmosferi sa 5% CO₂ (u inkubatoru za ćelije). Svaka inkubacija je rađena u duplikatu. Kompletni medijum se sastojao iz RPMI1640 glutamax medijuma, 10% fetalnog seruma teleta (FCS; Multicell, Wisent Inc.,

Kvebek, Kanada) i 1% rastvora penicilina i streptomicina (100x rastvor, Gibco). Nakon inkubiranja, 50 μ l ćelijskog supernatanta je polako uzeto sa vrha bunara i zamrznuto na -20°C do upotrebe. U supernatantima su detektovni i kvantifikovani citokini IFN- γ , IL-5 i IL-13 pomoću komercijalno dostupnih ELISA testova (e-Bioscience, Austrija).

Ćelijama koje su zaostale u bunarima dodato je ukupno po 0.5 μ Ci radioaktivnog 3H-timidina (Amersham, GE Healthcare, specifična aktivnost: 40-60 Ci/mmol) za određivanje ćelijske proliferacije. Nakon 6h inkubacije, ćelije su transferovane na filterpapir (unifilter GF/C) pomoću uređaja Packard filtermate harvester (Perkin-Elmer, Boston, Masačusets, SAD). Filter papir je osušen, prebačen u kesu sa scintilacionom tečnošću i količina inkorporiranog 3H-timidina je izmerena pomoću scintilacionog brojača Packard Topcount NXT (Perkin-Elmer). Količina inkorporiranog 3H-timidina je izražena u cpm (od engl, counts per minute). Uzorci su statistički upoređeni Man Vitni U testom.

6.3.3. Mešana kultura dendritičnih ćelija i T-ćelija

Za ove eksperimente su korišćene ženke C3H/HeOuJ u kojima je ranije uspostavljen sistem (Pochard, 2010). Za razliku od BALB/c miševa, C3H/HeOuJ poseduju veću otpornost na endotoksin usled mutacije u TLR-4 receptoru, pa su bolji izbor za eksperimente gde se ćelije direktno izlažu antigenu i meri citokinski odgovor. Miševi su gajeni pod istim uslovima i sa istim dozvolama kao i BALB/c.



Šema 6.2. Postavka eksperimenta.

6.3.3.1. Priprema BLG-specifičnih CD4⁺ T-ćelija

BLG-specifične CD4⁺ T-ćelije su izolovane iz slezina miševa koji su prethodno imunizovani sa BLG-om. Miševi su intraperitonealno (i.p.) imunizovani 0. i 7. dana sa po 100 µg BLG-a i 1 mg aluminijum hidroksida (alum, Sigma-Aldrich). Četrnaestog dana slezine su izolovane i homogenizovane po postupku iz 6.4.2.2. Iz suspenzije ćelija slezine izolovanje su CD4⁺ T-ćelije pomoću seta Dynal Mouse CD4 Negative isolation kit (Invitrogen, Life Technologies) po uputstvima proizvođača. U ovom setu se nalaze magnetne kuglice koje su obložene antitelima naspram drugih ćelija u slezini, tako da CD4⁺ T-ćelije zaostaju nevezane.

6.3.3.2. Priprema dendritičnih ćelija

Dendritične ćelije su dobijene iz ćelija koštane srži. Nultog dana miševi su žrtvovani cervikalnom dislokacijom, sterilisani 70% etanolom a zatim su izolovane kosti zadnjih nogu (femuri i tibije) sa malo mišićnog tkiva koje je zaostalo. Kostu su stavljene u tubu sa hladnim PBS-om i transportovane u sterilnu zonu ćelijskog laminara. Po unosu materijala u laminar, kosti su sterilisane kratkim uranjanjem u 70% etanol, a potom stavljene u Petri šolju sa PBS-om. Pomoću makazica i pinceta femuri su razdvojeni od tibija i sklonjeno je skoro svo mišićno tkivo sa kostiju. Zatim je makazama odsečen vrh kosti sa obe strane, tako da se oslobodi centralni kanal koji sadrži koštanu srž a da se izgubi što manje koštane srži. U centralni kanal je stavljena igla (25G) i koštana srž je istisnuta ispiranjem sa RPMI medijumom u čistu Petri šolju. Jako je bitno izvući što više koštane srži, ispirati dok kost ne ostane bela. Koštana srž je resuspendovana u Petri šolji nasumičnim povlačenjem i ispuštanjem suspenzije iz šprica, a zatim i prosejana preko sita za ćelije (40 ili 70 µm) u plastičnu tubu. Nakon centrifugiranja, lizirani su eritrociti (sastav pufera za liziranje u 5.4.4.4) i suspenzija je opet centrifugirana. Talog ćelija je resuspendovan u kompletnom medijumu za DĆ-je (RPMI1640 glutamax, 10% FCS, 1% Pen/Strep, 1% Na-piruvat (100x rastvor, Gibco), 1% neesencijalne amino kiseline (100x rastvor, Gibco), 50 µM 2-merkaptetanol (Gibco)) sa dodatkom 10 ng/ml citokina za

stimulaciju diferencijacije- GM-CSF (od engl, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; R&D, Okson, UK). Čelijska suspenzija koncentracije $2-5 \times 10^5$ ćelija/ml je razlivena u Petri šolje, po 10 ml za Petri šolje 90x15 mm.

Trećeg dana osvežen je medijum dodavanjem u svaku Petri šolju po 10 ml kompletnog medijuma sa 20 ng/ml GM-CSF. Šestog dana ćelije su spremene. Pokupljene su ćelije u suspenziji i slabo adherentne (lupanjem o Petri šolje o dlan šake se odvajaju od podloge), ćelije koje jako adheriraju nisu potrebne.

6.3.3.3. Kultura dendritičnih i T-ćelija

Trinaestog dana od početka eksperimenta, šest dana stare DC-e su sakupljene, izbrojane i postavljene da se inkubiraju 24h sa 50 µg/ml BLG ili CL-BLG (ili bez proteina u kontroli) u malim Petri šoljama pri koncentraciji 1×10^6 ćelija/ml. Četrnaestog dana, DC-e, koje su sada adhezivne su „sastrugane“ sa dna Petri šolja, isprane, izbrojane i transferovane u pločicu sa 96 bunara gde su gajene sa sveže izolovanim CD4⁺ T-ćelijama u odnosu 1:10 (1×10^5 : 1×10^6), u ukupnoj zapremini od 200 µl narednih 72h (Šema 6.2). Korišćen je medijum za T-ćelije koji se sastojao iz RPMI1640 glutamax medijuma, 10% FCS i 1% rastvora penicilina i streptomocina. Nakon inkubiranja, IFN-γ, IL-5, IL-13 i ćelijska proliferacija su izmereni isto kao u odeljku 6.4.2.2. Eksperiment je urađen tri puta, svaki put u duplikatu. Uzorci su statistički upoređeni studentskim t-testom.

6.3.4. Praćenje transporta proteina u uslovima GIT-u

6.3.4.1. Transport proteina kroz monosloj Caco-2 ćelija

Caco-2 ćelije (American Type Culture Collection No. HTB-37), između 59 i 68 pasaža, su gajene u T-75 flaksovima u kompletnom medijumu koji se sastojao od: DMEM medijuma sa 4.5 g/l glukoze (Gibco), 10% FCS, 1% neesencijalnih amino kiselina, 2 mM L-glutamin (Gibco), 1% rastvor penicilina i streptomocina. Za praćenje transporta proteina,

ćelije su sejane na filtere od polikarbonata, sa porama prečnika 0.4 μm , u pločicama sa 12 bunara (Transwell, Corning Costar, Kembridž, Masačusets, SAD), 3×10^5 ćelija u 0.5 ml je sejano po insertu. Tri puta nedeljno je menjan medijum u pločicama sa insertima. Nakon tri nedelje (21 dan) ćelije su korišćene za eksperimente. Pre eksperimenta i po završetku trans-epitelijalni električni otpor (TEEO) je meren pomoću Millicell-ERS Volt-Omometra (Millipore). Samo ćelijski monoslojevi koji su pre početka ekperimenta imali TEEO veći od 500Ω su korišćeni. Po završetku eksperimenta TEEO se meri radi utvrđivanja stanja ćelija nakon tretmana, ukoliko otpor drastično opadne, testirana supstanca je toksična po ćelije. Pri merenju otpor svakog monosloja je umanjen za vrednost koju pokazuje insert bez ćelija.

Transport BLG i CL-BLG-a je urađen sa 50 i 500 μg proteina u 500 μl kompletnog DMEM medijuma koji su dodati sa apikalne strane polarizovanih ćelija. U okolnom bazolateralnom delu bilo je 1.5 ml medijuma. Nakon određenih vremenskih intervala, 0-3h, alikvoti od 750 μl su uzimani i skaldišteni. Svaki put kad je uzet alikvot dodat je svež medijum. U alikvotima je kasnije određena koncentracija transportovanih proteina pomoću komercijalno dostupnog ELISA seta za detekciju BLG-a (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomeri, SAD). Eksperimenti su ponovljeni četiri puta sa ćelijama iz dva različita pasaža. Pri računanju ukupne koncentracije BLG-a i peptida BLG-a u bazolateralnom delu rađena je korekcija:

$$[C_n] = [C_n]_{izmerena} - 0.5x[C_n - 1],$$

gde je C_n koncentracija u alikvotu n , a C_{n-1} koncentracija u alikvotu pre njega $n-1$.

6.3.4.2. Apsorpcija proteina *in vivo*

BALB/c miševi ($n=3$ /grupi) su hranjeni oralnom gavažom (i.g.) sa po 4 mg FITC obeleženog BLG ili CL-BLG-a. Kontrolna grupa je hranjena PBS-om. Nakon 15 i 30 min životinje su žrtvovane i celi crevni trakt je izvučen, ispran detaljno sa dosta PBS-a (crevo se navuče na iglu sa kugličastim vrhom i ispira iznutra sa po 10-20 ml PBS-a). Višak PBS-a je pažljivo sklonjen bez oštećenja crevnog zida jer veći kristali soli mogu da oštete tkivo nakon zamrzavanja. Crevo je spakovano u rolnicu namotavaljem oko drvenog štapića i

odmah zaleđeno u parama tečnog azota. Sedam μm široki preseki tkiva su rezani pomoću Leica CM3050/CM3000 kriostata i transferovani na polilizinska predmetna mikroskopska stakla. Nukleus je bojen sa 4',6-diamidino-2-fenilindol dilactatom (DAPI, Sigma-Aldrich) a M-ćelije sa specifičnim antitelom naspram glikoproteina-2 koga one ekspimiraju (MBL International, Voburn, Masačusets, SAD). Fluorescentne mikroskopije su napravljene na mikroskopu Olympus BX60 koji je opremljen sa Color CCD kamerom Leica DFC425C i analizirane LEICA-LAS AF softverom (Leica Microsystems GmbH, Nemačka).

6.3.5. *In vitro* test dvofazne digestije

Simulirana gastrična i intestinalna digestija su urađene sa propisima US Pharmacopoeia-je. Simulirana gastrična digestija je urađena slično kao ranije (Thomas, 2004). Ukratko, u ependorf tubu od 1.5 ml je odmereno 0.76 ml prethodno zadrejanog na 37°C simuliranog gastričnog fluida (0.084 M HCl, 35 mM NaCl, pH 1.2, sa 4000 U pepsin A (2540 U/mg, Sigma-Aldrich)) i 40 μl of 5 mg/ml BLG ili CL-BLG-a. Digestija je trajala 60 min na 37°C uz stalno mešanje. Reakcija je stopirana dodavanjem 0.24 ml 0.3 M Na_2CO_3 . Pankreatin iz pankreasa svinje (Sigma-Aldrich) je rastvoren u PBS-u. U 0.84 ml smeše nakon pepsinske digestije dodato je 0.21 ml rastvora pankreatina tako da je finalna koncentracija bila 1% (w/v). Digestija je nastavljena na 37°C uz konstantno mešanje. Maseni odnos pankreatina i proteina je bio 13:1 kao što je ranije opisano (Stanic, 2010). Alikvoti od 0.25 ml su vađeni 5, 15, 30 i 60 min intestinalne digestije i reakcija je u njima stopirana kuvanjem 5 min na 95°C. U preostalih 0.2 ml smeše nakon pepsinske digestije dodato je 0.05 ml temperaturno inaktiviranog pankreatina, ovo je bilo vreme 0 za intestinalnu digestiju. Svi digesti su analizirani na 14% SDS-PAGE gelu pod redukujućim uslovima (3.4.1.4).

6.3.6. Preuzimanje i obrada proteina od strane dendritičnih ćelija

6.3.6.1. Preuzimanje antigena

DĆ-je su izolovane i diferencirane iz ćelija koštane srži miševa kao što je opisano u 6.4.3.2. Korišćene su samo DĆ-e stare šest dana. DĆ-e u koncentraciji 1×10^6 su inkubirane sa 10 μg FITC ili pHrodo Green-obeđenih proteina u 1 ml kompletnog medijuma 0, 15, 30, 60, 120, 180 i 240 min na 37°C u atmosferi 5% CO_2 . Nakon inkubiranja, ćelije su „sastrugane“ sa dna Petri šolja, centrifugirane, isprane 2x PBS-om i resuspendovane u ratvoru za fiksiranje PBS/4% formaldehid. Procenat FITC ili pHrodo Green-pozitivnih ćelija je određen nakon snimanja na FACS Calibur-u (BD Biosciences, USA). Svaki eksperiment je rađen u triplikatu.

6.3.6.2. *In vitro* endolizozomalna degradacija

Eksperiment je urađen po proceduri koja je publikovana ranije (Matthias, 2011). Endozomi i lizozomi su izolovani iz mišjih DĆ-a diferencijalnim centrifugiranjem. Ćelije su homogenizovane u Potterovom homogenizatoru u 10 mmol Tris-acetatnom puferu pH 7.0 koji je sadržao 250 mM saharozu (1×10^8 ćelija u 1 ili 2 ml pufera). Efikasnost homogenizacije je praćena bojenjem sa Trypan blue bojom. Krupniji ostaci ćelija su odvojeni centrifugiranjem 10 min na 6 000 g. Supernatant je transferovan u kivetu za ultracentrifugu gde je centrifugiran 60 min na 100 000 g na 4°C . Endolizozomalna frakcija se nalazi u peletu. Supernatant je prosut, pelet je pažljivo ispran i resuspendovan u minimalnoj zapremini 10 mM Tris-acetatnog pufera pH 7.0 (iz 1×10^8 100-200 μl). Sadržaj endolizozomalnih vezikula je oslobođen u toku 5 ciklusa zamrzavanja u tečnom azotu i odmrzavanju na sobnoj temperaturi, a zatim je zamrznut na -20°C .

Aktivnost preparata je upoređena sa ranije publikovanim za peroksidazu iz rena (Sigma-Aldrich) koja ima kratak poluživot u ovim uslovima digestije. Efikasnost degradacije je procenjena na osnovu brzine razlaganja proteina i analize na gelu za SDS-PAG elektroforezu. Aktivnost preparata je bila slična. Reakcione smeše su sadržale 0.25

mg/ml BLG ili CL-BLG i 0.4 mg/ml ukupnih proteina endolizozoma u 20 μ l 100 mM citratnog pufera pH 4.8 sa 2 mM ditiotreitolum. Degradacija se odvijala na 37°C uz konstantno mešanje, posle 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48 h reakcije su zaustavljene kuvanjem 5 min na 95°C. Digesti su analizirani Tris-Tricinskom elektroforezom na 10% poliakrilamidnom gelu kao što je opisano ranije (Schagger i von Jagow, 1987).

6.3.6.2.1 *LC-ESI MS/MS analiza BLG peptida koji nastaju nakon endolizozomalne degradacije*

Kvalitativna analiza digestovanih uzoraka je urađena tečno-masenom spektrometrijom. Peptidi su analizirani na EASY nLC II sistemu koji je povezan sa LTQ Orbitrap XL (Thermo scientific Inc.). Ukupno je 240 ng proteina injektovano na EASY-Spray PepMap C18 kolonu (150x0.075 mm, 3 μ m prečnik čestica matriksa). Kao eluent A korišćen je vodeni ratvor 0.1% mravlje kiseline, a kao eluent B 0.1% mravlja kisleina u acetonitrilu. Uzorci su eluirani sa gradijentom eluenta B 5-70% u toku 50 min pri protoku od 300 nl/min. Vrednost za CID normalizovanu kolizionu energiju je bila 35%. Vrednosti parametara Nano electroSpray jonizacije (NSI) su bili: voltaža spreja +3.91kV, kapilarna voltaža 6.00 V, kapilarna temperatura 275.00°C, cev sočiva 100V. Spektri su snimljeni u pozitivnom modulu u opsegu m/z 500-2000. Pet najintenzivnijih monoizotopskih pikova u spektru je fragmentisano pomoću CID-a i mereno u linearnoj jonskoj zamci. Analiza podataka je urađena pomoću SEQUEST pretraživača i Proteome Discoverer 1.3.0339 softvera (Thermo Scientific) po sledećim uslovima: FASTA databaza, Bos Taurus validovane sekvence sa Uniprot-a; enzim, nespecifična digestija; broj promašenih mesta za proteolizu, 2; tolerancija greške za peptide, ± 10 ppm; MS/MS tolerancija, ± 0.5 Da; dinamičke modifikacije, oksidacija metionina.

7. ZAKLJUČCI

U skladu sa ciljevima iznetim u odeljku 1.1, izvode se sledeći zaključci:

- 1) β -laktoglobulin (BLG) je izolovan i prečišćen iz sirovog mleka na jednostavan i efikasan način korišćenjem samo jedne metode- jonoizmenjivačke hromatografije. Metoda nije skupa za izvođenje, reproduktivna je i moguće je izolovati u laboratorijskim uslovima gramske količine BLG-a. Prinos BLG-a je bio 80% a čistoća 97-99%. Takođe, razdvojene su i izoforme A i B u pristojnoj količini čistoće 99 i 91%. Izolovani BLG je u nativnoj sekundarnoj i tercijarnoj strukturi, pa je pogodan za studije koje se bave izučavanjem strukturnih i funkcionalnih osobina proteina.
- 2) Stern-Volmer-ovom analizom ispitane su interakcije između polifenola i BLG-a. Na fiziološkim pH vrednostima gastrointestinalnog trakta (pH 1.2, 2.5 i 7.2) formirale su se nekovalentne interakcije. Uticaj pH na jačinu interakcija nije bio dramatičan i varirao je u zavisnosti od sastava polifenolnih ekstrakata. Polifenoli vezani za BLG štite protein od digestije pepsinom, što se jasno uočava stabilizacijom sekundarne strukture kada je to potrebno na pH 1.2, a direktna posledica toga je duži poluzivot BLG-a u želucu, što pozitivno korelira sa povećanjem alergenosti. Formiranje nekovalentnih interakcija utiče na smanjenje antioksidativnog kapaciteta protein-polifenol kompleksa. Jačina nekovalentnih interakcija između polifenola i BLG-a rukovodi intenzitetom uočenih bioloških efekata smanjenja digestibilnosti proteina i ukupnog antioksidativnog kapaciteta.
- 3) Variranjem temperature prilikom sonifikacije BLG-a zapazili smo formiranje dve strukturno različite forme proteina. Kada temperatura sistema nije bila kontrolisana došlo je do grejanja uzorka do 65°C i izrazitih promena u tercijarnoj strukturi BLG-

a koje su dovele do formiranja polimera, gubitka afiniteta za vezivanje retinola i brže degradacije pepsinom. Kada je sistem hlađen, temperatura u uzorku nije prelazila 35°C, došlo je do promena u sekundarnoj strukturi koje su uslovile samo formiranje dimera bez promena u digestibilnosti i vezivanju retinola. Posledice strukturnih promena se ogledaju i u većoj efikasnosti reakcije umrežavanja lakazom. Afinitet sonifikovanih formi za vezivanje IgE antitela i indukciju IgE posredovane aktivacije bazofila i mastocita nije bio narušen. Za alergenost BLG-a većinski su odgovorni sekvencijalni epitopi koji se ovakvim tretmanima ne menjaju.

- 4) BLG je tretiran ultrazvukom 60 min bez hlađenja sistema a potom efikasno umrežen lakazom iz *Trametes versicolor* u prisustvu kafeinske kiseline. Umreženi BLG je bio molekulske mase $\geq 50-60$ MDa i fibrilarne strukture. Enzimsko umrežavanje BLG-a u multivalentne čestice izazvalo je jak alergijski imunski odgovor *in vivo* u mišjem modelu alergije na hranu i *in vitro* u mešanoj kulturi specifičnih CD4⁺ T-ćelija i dendritičnih ćelija. Usled povećanja veličine, otpornosti na proteolizu i smanjenja rastvorljivosti BLG-a nakon umrežavanja dolazi do translokacije mesta apsorcije proteina u gastrointestinalnom traktu. Preuzimanje proteina preko Pejerovih ploča crevnog trakta promoviše jak ćelijski Th2 odgovor. Polako i ravnomerno preuzimanje umreženog BLG-a od strane dendritičnih ćelija obezbeđuje ravnomernu proteolizu, oslobađanje MHC II vezujućih peptida u endolizozomalnim vezikulama i posledičnu aktivaciju T-ćelija.

Rezultati ove teze imaju direktnu primenu u industriji hrane i medicini. β -laktoglobulin bi mogao da se koristi kao nosač biološki aktivnih polifenolnih jedinjenja jer štiti njihove hidroksilne grupe bitne za antioksidativnu aktivnost. Sonifikacija može biti bezbedan postupak za preradu mleka, jer održava hranljivu vrednost i ne povećava alergeni potencijal β -laktoglobulina. Iako efekti promena u digestibilnosti, koje su zapažene usled interakcija sa polifenolnim jedinjenjima i nakon tretmana ultrazvukom, nisu ispitani *in vivo*, mogu imati uticaj na alergenost BLG-a. Sa druge strane, korišćenje postupaka za obradu hrane koji promovišu agregaciju solubilnih proteina poput enzimskog umrežavanja BLG-a,

će se verovatno povećati učestalost alergija na hranu. Zbog toga bi proizvođači hrane i terapijskih proteina trebalo da obrate posebnu pažnju na stepen agregacije proteina prilikom pripreme.

8. LITERATURA

Abbas AK, Lichtman AH. 2008. Osnovna imunologija. Beograd: Data-Status.

Alfven T, Braun-Fahrlander C, Brunekreef B, von Mutius E, Riedler J, Scheynius A et al. 2006. Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthropogenic lifestyle-the PARSIFAL study. *Allergy* 61: 414-421.

Alomirah HF, Alli I. 2004. Separation and characterization of beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin from whey and whey protein preparations. *International Dairy Journal* 14: 411-419.

Arts MJTJ, Haenen GRMM, Wilms LC, Beetstra SAJN, Heijnen CGM, Voss H-P et al. 2002. Interactions between Flavonoids and Proteins: Effect on the Total Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1184-1187.

Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK et al. 2006. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet* 368: 733-743.

Astwood JD, Leach JN, Fuchs RL. 1996. Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature Biotechnology* 14: 1269-1273.

Baldrian P. 2006. Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 215-242.

Banchereau J, Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252.

Baral VR, O'B Hourihane J. 2005. Food allergy in children. *Postgraduate Medical Journal* 81: 693-701.

Barnes KC, Grant AV, Hansel NN, Gao P, Dunston GM. 2007. African Americans with asthma: genetic insights. *Proceedings of the American Thoracic Society* 4: 58-68.

Barnett S. 1998. Free radical production: its biological consequences. *Ultrasound Medical Biology* 1: 529-534.

Barteri M, Gaudio MC, Rotella S, Benagiano G, Pala A. 2000. Effect of pH on the structure and aggregation of human glycodelin A. A comparison with beta-lactoglobulin A. *Biochimica Biophysica Acta* 1479: 255-264.

Bashir ME, Louie S, Shi HN, Nagler-Anderson C. 2004. Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. *Journal of Immunology* 172: 6978-6987.

Basto C, Tzanov T, Cavaco-Paulo A. 2007. Combined ultrasound-laccase assisted bleaching of cotton. *Ultrasonics Sonochemistry* 14: 350-354.

Bateman A, et al. 2004. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* 32: D138-D141.

Bernasconi E, Fritsche R, Corthesy B. 2006. Specific effects of denaturation, hydrolysis and exposure to *Lactococcus lactis* on bovine beta-lactoglobulin transepithelial transport, antigenicity and allergenicity. *Clinical and Experimental Allergy* 36: 803-814.

Bird PI, Trapani JA, Villadangos JA. 2009. Endolysosomal proteases and their inhibitors in immunity. *Nature Reviews Immunology* 9: 871-882.

Blanc F, Bernard H, Alessandri S, Bublin M, Paty E, Leung SA et al. 2008. Update on optimized purification and characterization of natural milk allergens. *Molecular Nutrition and Food Research* 52 Supplement 2: S166-175.

Bolobova AV, Askadskii AA, Kondrashchenko VI, Rabinovich ML. 2002. *Teoreticheskie osnovy biotekhnologii drevesnykh kompozitov: Fermenty, modeli, protsessy* (Theoretical Bases of Biotechnology of Wood Composites: Enzymes, Models, and Processes). Moscow: Nauka.

Bonomi F, Fiocchi A, Frokiaer H, Gaiaschi A, Iametti S, Poiesi C et al. 2003. Reduction of immunoreactivity of bovine beta-lactoglobulin upon combined physical and proteolytic treatment. *Journal of Dairy Research* 70: 51-59.

Bousquet J, Anto J, Auffray C, Akdis M, Cambon-Thomsen A, Keil, T. et al. 2011. MeDALL (Mechanisms of the Development of ALLergy): an integrated approach from phenotypes to systems medicine. *Allergy* 66: 596-604.

Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA et al. 2010. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 126: 007.

Brás NrF, Gonçalves R, Mateus N, Fernandes PA, Ramos MJo, de Freitas V. 2010. Inhibition of Pancreatic Elastase by Polyphenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 10668-10676.

Brautnizer G, Chen R, Schrank B, Stangl A. 1973. Die Sequenzanalyse des b-Lactoglobulins. *Hoppe Seyler's Z Physiol Chem* 354: 867–878.

Breiteneder H, Radauer C. 2004. A classification of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113: 821-830.

Breiteneder H, Mills EN. 2005. Molecular properties of food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115: 14-23; quiz 24.

Brown JH, Kim K-H, Jun G, Greenfield NJ, Dominguez R, Volkmann N et al. 2001. Deciphering the design of the tropomyosin molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 8496-8501.

Buchert J, Ercili CD, Ma H, Gasparetti C, Monogioudi E, Faccio G et al. 2010. Crosslinking Food Proteins for Improved Functionality. *Annual Review of Food Science and Technology* 1: 113-138.

Cabrera C, Artacho R, Giménez R. 2006. Beneficial Effects of Green Tea—A Review. *Journal of the American College of Nutrition* 25: 79-99.

Caessens PWJR, Visser S, Gruppen H. 1997. Method for the isolation of bovine [beta]-lactoglobulin from a cheese whey protein fraction and physicochemical characterization of the purified product. *International Dairy Journal* 7: 229-235.

Canfora L, Iamarino G, Rao MA, Gianfreda L. 2008. Oxidative transformation of natural and synthetic phenolic mixtures by *Trametes versicolor* laccase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 1398-1407.

Caruana M, Hogen T, Levin J, Hillmer A, Giese A, Vassallo N. 2011. Inhibition and disaggregation of alpha-synuclein oligomers by natural polyphenolic compounds. *Febs Letters* 585: 1113-1120.

Carvalho EM, Bastos LS, Araujo MI. 2006. Worms and allergy. *Parasite Immunology* 28: 525-534.

Chambers SJ, Wickham MSJ, Regoli M, Bertelli E, Gunning PA, Nicoletti C. 2004. Rapid in vivo transport of proteins from digested allergen across pre-sensitized gut. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325: 1258-1263.

Chandrapala J, Zisu B, Palmer M, Kentish S, Ashokkumar M. 2011. Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate. *Ultrasonics Sonochemistry* 18: 951-957.

Chang HC, Sehra S, Goswami R, Yao W, Yu Q, Stritesky GL et al. 2010. The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nature Immunology* 11: 527-534.

Chaplin DD. 2010. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125: S3-S23.

Chaudhuri S, Chakraborty S, Sengupta PK. 2011. Probing the interactions of hemoglobin with antioxidant flavonoids via fluorescence spectroscopy and molecular modeling studies. *Biophysical Chemistry* 154: 26-34.

Cehade M, Mayer L. 2005. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115: 3-12; quiz 13.

Cheynier V. 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81: 223S-229S.

Chun OK, Kim D-O, Lee CY. 2003. Superoxide Radical Scavenging Activity of the Major Polyphenols in Fresh Plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 8067-8072.

Chung JE, Kurisawa M, Uyama H, Kobayashi S. 2003. Enzymatic synthesis and antioxidant property of gelatin-catechin conjugates. *Biotechnology Letters* 25: 1993-1997.

Chung S-Y, Champagne ET. 2009. Reducing the allergenic capacity of peanut extracts and liquid peanut butter by phenolic compounds. *Food Chemistry* 115: 1345-1349.

Chung S-Y, Reed S. 2012. Removing peanut allergens by tannic acid. *Food Chemistry* 134: 1468-1473.

Chung S-Y, Kato Y, Champagne ET. 2005. Polyphenol oxidase/caffeic acid may reduce the allergenic properties of peanut allergens. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 2631-2637.

Clare DA, Gharst G, Sanders TH. 2006. Transglutaminase Polymerization of Peanut Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 432-438.

Clare DA, Gharst G, Maleki SJ, Sanders TH. 2008. Effects of Transglutaminase Catalysis on the Functional and Immunoglobulin Binding Properties of Peanut Flour

Dispersions Containing Casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 10913-10921.

Clement G, Boquet D, Frobert Y, Bernard H, Negroni L, Chatel JM et al. 2002. Epitopic characterization of native bovine beta-lactoglobulin. *Journal of Immunology Methods* 266: 67-78.

Clifford MN. 1999. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 362-372.

Commins SP, Satinover SM, Hosen J, Mozena J, Borish L, Lewis BD et al. 2009. Delayed anaphylaxis, angioedema, or urticaria after consumption of red meat in patients with IgE antibodies specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123: 426-433.

Conner SD, Schmid SL. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422: 37-44.

Considine T, Singh H, Patel HA, Creamer LK. 2005. Influence of binding of sodium dodecyl sulfate, all-trans-retinol, and 8-anilino-1-naphthalenesulfonate on the high-pressure-induced unfolding and aggregation of beta-lactoglobulin B. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 8010-8018.

Cooper PJ. 2004. Intestinal worms and human allergy. *Parasite Immunology* 26: 455-467.

Creamer LK. 1995. Effect of Sodium Dodecyl Sulfate and Palmitic Acid on the Equilibrium Unfolding of Bovine .beta.-Lactoglobulin. *Biochemistry* 34: 7170-7176.

Daëron M, Malbec O, Latour S, Arock M, Fridman WH. 1995. Regulation of high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation by murine low-affinity IgG receptors. *The Journal of Clinical Investigation* 95: 577-585.

Davis PJ, Williams SC. 1998. Protein modification by thermal processing. *Allergy* 53: 102-105.

de Jongh HHJ, Gröneveld T, de Groot J. 2001. Mild Isolation Procedure Discloses New Protein Structural Properties of [beta]-Lactoglobulin. *Journal of Dairy Science* 84: 562-571.

De Swert LF. 1999. Risk factors for allergy. *European Journal of Pediatrics* 158: 89-94.

de Wit JN. 1998. Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. *Journal of Dairy Science* 81: 597-608.

Dintzis RZ, Okajima M, Middleton MH, Greene G, Dintzis HM. 1989. The immunogenicity of soluble haptened polymers is determined by molecular mass and hapten valence. *Journal of Immunology* 143: 1239-1244.

Docena GH, Fernandez R, Chirido FG, Fossati CA. 1996. Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy* 51: 412-416.

Domínguez J, Cuevas M, Ureña V, Muñoz T, Moneo I. 1990. Purification and characterization of an allergen of mustard seed. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 64: 352-357.

Dorđević J. 1987. *Mleko*. Beograd: Naučna knjiga.

Douliet J-P, Jégou S, Pato C, Mollé D, Tran V, Marion D. 2001. Binding of two mono-acylated lipid monomers by the barley lipid transfer protein, LTP1, as viewed by fluorescence, isothermal titration calorimetry and molecular modelling. *European Journal of Biochemistry* 268: 384-388.

Dreborg S, Foucard T. 1983. Allergy to apple, carrot and potato in children with birch pollen allergy. *Allergy* 38: 167-172.

Ehn BM, Ekstrand B, Bengtsson U, Ahlstedt S. 2004. Modification of IgE binding during heat processing of the cow's milk allergen beta-lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1398-1403.

Eigel WN, Butler JE, Ernstrom CA, Farrell HM, Harwalkar VR, Jenness R et al. 1984. Nomenclature of Proteins of Cow's Milk: Fifth Revision¹. *Journal of Dairy Science* 67: 1599-1631.

Fagnani R, Hagan MS, Bartholomew R. 1990. Reduction of immunogenicity by covalent modification of murine and rabbit immunoglobulins with oxidized dextrans of low molecular weight. *Cancer Research* 50: 3638-3645.

FAO/WHO. 2001. Evaluation of allergenicity of genetically modified food; Report of a joint FAO/WHO expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology; Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome, Italy.

Farah A, de Paulis T, Trugo LC, Martin PR. 2005. Effect of Roasting on the Formation of Chlorogenic Acid Lactones in Coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1505-1513.

Faridbod F, Ganjali MR, Larijani B, Riahi S, Saboury AA, Hosseini M, Norouzi P et al. 2011. Interaction study of pioglitazone with albumin by fluorescence spectroscopy and molecular docking. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 78: 96-101.

Feeney RE, Whitaker JR. 1988. Importance of cross-linking reactions in proteins. *Advances in Cereal Science and Technology* 9: 21-43.

Figuerola-Espinoza MC, Rouau X. 1999. Effect of cysteinyl caffeic acid, caffeic acid, and L-dopa on the oxidative cross-linking of feruloylated arabinoxylans by a fungal laccase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 497-503.

Frazier RA, Deaville ER, Green RJ, Stringano E, Willoughby I, Plant J et al. 2010. Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51: 490-495.

Friedman M. 1999a. Chemistry, biochemistry, nutrition, and microbiology of lysinoalanine, lanthionine, and histidinoalanine in food and other proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 1295-1319.

Friedman M. 1999b. Lysinoalanine in food and in antimicrobial proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 459: 145-159.

Fritsche R. 2003. Animal models in food allergy: assessment of allergenicity and preventive activity of infant formulas. *Toxicology Letters* 140-141: 303-309.

Fu T, Abbott U, Hatzos C. 2002. Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid-a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7154 - 7160.

Galli SJ. 2000. Allergy. *Current Biology* 10: R93-95.

Garcia-Ara MC, Boyano-Martinez MT, Diaz-Pena JM, Martin-Munoz MF, Martin-Esteban M. 2004. Cow's milk-specific immunoglobulin E levels as predictors of clinical reactivity in the follow-up of the cow's milk allergy infants. *Clinical and Experimental Allergy* 34: 866-870.

Garcia-Borrego A, Wichers JH, Wichers HJ. 2007. Decrease of the IgE-binding by Mal d 1, the major apple allergen, by means of polyphenol oxidase and peroxidase treatments. *Food Chemistry* 103: 94-100.

Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327: 656-661.

Gerrard JA. 2002. Protein-protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. *Trends in Food Science & Technology* 13: 391-399.

Gjesing B, Osterballe O, Schwartz B WU, H L. 1986. Allergen-specific IgE antibodies against antigenic components in cow milk and milk substitutes. *Allergy* 41: 51-56.

Gordon WG, Kalan EB. 1974. Proteins of milk in *Fundamentals of dairy chemistry*.

Gruber P, Vieths S, Wangorsch A, Nerkamp J, Hofmann T. 2004. Maillard Reaction and Enzymatic Browning Affect the Allergenicity of Pru av 1, the Major Allergen from Cherry (*Prunus avium*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4002-4007.

Gudgin E, Lopez-Delgado R, Ware WR. 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: 1037-1044.

Hambling SG, McAlpine AS, Sawyer. L. 1992. *Advanced Dairy Chemistry: 1. Proteins*, Elsevier Applied Science: 141-190.

Hanhineva K, Torronen R, Bondia-Pons I, Pekkinen J, Kolehmainen M, Mykkanen H et al 2010. Impact of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences* 11: 1365-1402.

Harboe N, Ingild A. 1973. Immunization, Isolation of Immunoglobulins, Estimation of Antibody Titer. *Scandinavian Journal of Immunology* 2: 161-164.

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM et al. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology* 6: 1123-1132.

Hattori M, Okada Y, Takahashi K. 2000a. Functional changes in beta-lactoglobulin upon conjugation with carboxymethyl cyclodextrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3789-3794.

Hattori M, Nagasawa K, Ohgata K, Sone N, Fukuda A, Matsuda H et al. 2000b. Reduced immunogenicity of beta-lactoglobulin by conjugation with carboxymethyl dextran. *Bioconjugate Chemistry* 11: 84-93.

Hattori M, Hiramatsu K, Kurata T, Nishiura M, Takahashi K, Ametani A et al. 2005. Complete refolding of bovine beta-lactoglobulin requires disulfide bond formation under strict conditions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1752: 154-165.

Hawkins CL, Davies MJ. 2001. Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1054: 196-219.

Heinzmann A, Blattmann S, Spuergin P, Forster J, Deichmann KA. 1999. The recognition pattern of sequential B cell epitopes of beta-lactoglobulin does not vary with the clinical manifestations of cow's milk allergy. *International Archives of Allergy and Immunology* 120: 280-286.

Hernell O, Lönnerdal B. 2003. Nutritional evaluation of protein hydrolysate formulas in healthy term infants: plasma amino acids, hematology, and trace elements. *The American Journal of Clinical Nutrition* 78: 296-301.

Herskovits TT, Sorensen M. 1968. Studies of the location of tyrosyl and tryptophyl residues in protein. II. Applications of model data to solvent perturbation studies of proteins rich in both tyrosine and tryptophan. *Biochemistry* 7: 2533-2542.

Holt C, Sawyer L. 1993. Caseins as rheomorphic proteins: interpretation of the primary and secondary structures of alpha S1-beta- and kappa- caseins. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* 89: 2683-2692.

Hurley WL, Rejman JJ. 1986. beta-Lactoglobulin and alpha-lactalbumin in mammary secretions during the dry period: parallelism of concentration changes. *Journal of Dairy Science* 69: 1642-1647.

Husband FA, Aldick T, Van der Plancken I, Grauwet T, Hendrickx M, Skypala et al. 2011. High-pressure treatment reduces the immunoreactivity of the major allergens in apple and celeriac. *Molecular Nutrition and Food Research* 55: 1087-1095.

Husby S, Jensenius JC, Svehag SE. 1985. Passage of undegraded dietary antigen into the blood of healthy adults. Quantification, estimation of size distribution, and relation of uptake to levels of specific antibodies. *Scandinavian Journal of Immunology* 22: 83-92.

Ince NH, Tezcanli G, Belen RK, Apikyan İG. 2001. Ultrasound as a catalyzer of aqueous reaction systems: the state of the art and environmental applications. *Applied Catalysis B: Environmental* 29: 167-176.

Inoue R, Matsushita S, Kaneko H, Shinoda S, Sakaguchi H, Nishimura Y et al. 2001. Identification of beta-lactoglobulin-derived peptides and class II HLA molecules recognized by T cells from patients with milk allergy. *Clinical and Experimental Allergy* 31: 1126-1134.

Jenkins JA, Breiteneder H, Mills EN. 2007. Evolutionary distance from human homologs reflects allergenicity of animal food proteins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120: 1399-1405.

Jiang B, Qu H, Hu Y, Ni T, Lin Z. 2007. Computational analysis of the relationship between allergenicity and digestibility of allergenic proteins in simulated gastric fluid. *BMC Bioinformatics* 8: 375.

Johansson SG, et al. 2004. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113: 832-836.

Kanakis CD, Hasni I, Bourassa P, Tarantilis PA, Polissiou MG, Tajmir-Riahi HA. 2011. Milk beta-lactoglobulin complexes with tea polyphenols. *Food Chemistry* 127: 1046-1055.

Kanjarawi R, Dercamp C, Etchart N, Adel-Patient K, Nicolas JF, Dubois B et al. Regulatory T cells control type I food allergy to Beta-lactoglobulin in mice. *International Archives of Allergy and Immunology* 156: 387-396.

Kepley CL, Taghavi S, Mackay G, Zhu D, Morel PA, Zhang K et al. 2004. Co-aggregation of FcγRII with FcεRI on Human Mast Cells Inhibits Antigen-induced Secretion and Involves SHIP-Grb2-Dok Complexes. *Journal of Biological Chemistry* 279: 35139-35149.

Khan MK, Rakotomanomana N, Dufour C, Dangles O. 2011. Binding of citrus flavanones and their glucuronides and chalcones to human serum albumin. *Food & Function* 2: 617-626.

Kleber N, Krause I, Illgner S, Hinrichs J. 2004. The antigenic response of β -lg is modulated by thermally induced aggregation. *European Food Research and Technology* 219: 105-110.

Kobayashi S, Watanabe J, Fukushi E, Kawabata J, Nakajima M, Watanabe M. 2003. Polyphenols from some foodstuffs as inhibitors of ovalbumin permeation through caco-2 cell monolayers. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 67: 1250-1257.

Kondo M, Kaneko H, Fukao T, Suzuki K, Sakaguchi H et al. 2008. The response of bovine beta-lactoglobulin-specific T-cell clones to single amino acid substitution of T-cell core epitope. *Pediatric Allergy and Immunology* 19: 592-598.

Konrad G, Lieske B, Faber W. 2000. A large-scale isolation of native beta-lactoglobulin: characterization of physicochemical properties and comparison with other methods. *International Dairy Journal* 10: 713-721.

Kourilsky P, Truffa-Bachi P. 2001. Cytokine fields and the polarization of the immune response. *Trends in Immunology* 22: 502-509.

Kraus TA, Toy L, Chan L, Childs J, Mayer L. 2004a. Failure to induce oral tolerance to a soluble protein in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 126: 1771-1778.

Kraus TA, Toy L, Chan L, Childs J, Cheifetz A, Mayer L. 2004b. Failure to induce oral tolerance in Crohn's and ulcerative colitis patients: possible genetic risk. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1029: 225-238.

Kreis M, Forde BG, Rahman S, Mifflin BJ, Shewry PR. 1985. Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. *Journal of Molecular Biology* 183: 499-502.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lakowicz JR. 1999. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Kluwer/Plenum.

Lambert JD, Elias RJ. 2010. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 501: 65-72.

Lantto R, Puolanne E, Kalkkinen N, Buchert J, Autio K. 2005. Enzyme-Aided Modification of Chicken-Breast Myofibril Proteins: Effect of Laccase and Transglutaminase on Gelation and Thermal Stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 9231-9237.

Larche M, Akdis CA, Valenta R. 2006. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 6: 761-771.

Lehrer SB, Ayuso R, Reese G. 2002. Current understanding of food allergens. *Annals of the New York Academy of Sciences* 964: 69-85.

Leighton TG. 2007. What is ultrasound? *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 93: 3-83.

Leszczyńska J, Łącka A, Bryszewska M. 2006. The use of transglutaminase in the reduction of immunoreactivity of wheat flour. *Food and Agricultural Immunology* 17: 105-113.

Li SA, Huang KL, Zhong M, Guo J, Wang WZ, Zhu RH. 2010. Comparative studies on the interaction of caffeic acid, chlorogenic acid and ferulic acid with bovine serum albumin. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 77: 680-686.

Liang L, Subirade M. 2012. Study of the acid and thermal stability of β -lactoglobulin–ligand complexes using fluorescence quenching. *Food Chemistry* 132: 2023-2029.

Liang L, Tajmir-Riahi HA, Subirade M. 2007. Interaction of β -Lactoglobulin with Resveratrol and its Biological Implications. *Biomacromolecules* 9: 50-56.

Lonjou C, et al. 2000. A first trial of retrospective collaboration for positional cloning in complex inheritance: assay of the cytokine region on chromosome 5 by the consortium on asthma genetics (COAG). *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 97: 10942-10947.

Lorenzen PC, Neve H, Mautner A, Schlimme E. 2002. Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set.style yogurt. *International Dairy Technology* 55.

Lozano JM, Giraldo GI, Romero CM. 2008. An improved method for isolation of beta-lactoglobulin. *International Dairy Journal* 18: 55-63.

Ma J, Yin YM, Liu HL, Xie MX. 2011. Interactions of Flavonoids with Biomacromolecules. *Current Organic Chemistry* 15: 2627-2640.

Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H, Williams IR, Mahajan A. 2013. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunology* 6: 666-677.

Macierzanka A, Sancho AI, Mills ENC, Rigby NM, Mackie AR. 2009. Emulsification alters simulated gastrointestinal proteolysis of small beta-casein and small beta-lactoglobulin. *Soft Matter* 5: 538-550.

Maier I, Okun VM, Pittner F, Lindner W. 2006. Changes in peptic digestibility of bovine beta-lactoglobulin as a result of food processing studied by capillary electrophoresis and immunochemical methods. *Journal of Chromatography B* 841: 160-167.

Maleki SJ, Kopper RA, Shin DS, Park CW, Compadre CM, Sampson H et al. 2000. Structure of the major peanut allergen Ara h 1 may protect IgE-binding epitopes from degradation. *Journal of Immunology* 164: 5844-5849.

Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 81: 230S-242S.

Marchioni C, Riccardi E, Spinelli S, Dell'Unto F, Grimaldi P, Bedini A et al. 2009. Structural changes induced in proteins by therapeutic ultrasounds. *Ultrasonics* 49: 569-576.

Martínez TF, Moyano FJ. 2003. Effect of tannic acid on in vitro enzymatic hydrolysis of some protein sources. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83: 456-464.

Martos G, Lopez-Exposito I, Bencharitiwong R, Berin MC, Nowak-Wegrzyn A. 2011. Mechanisms underlying differential food allergy response to heated egg. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127: 990-997 e991-992.

Matte JI, and J. M. Krochta. 1994. β -Lactoglobulin separation from whey protein isolate on a large scale. *Journal of Food Science* 59: 1111-1114.

Matthias E, Jürets A, Wallner M, Briza P, Ruzek S et al. 2011. Assessing Protein Immunogenicity with a Dendritic Cell Line-Derived Endolysosomal Degradome. *PLoS ONE* 6.

Mattinen ML, Kruus K, Buchert J, Nielsen JH, Andersen HJ, Steffensen CL. 2005. Laccase-catalyzed polymerization of tyrosine-containing peptides. *FEBS Journal* 272: 3640-3650.

McDougall GJ, Kulkarni NN, Stewart D. 2008. Current developments on the inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *Biofactors* 34: 73-80.

Metcalf DD, Astwood JD, Townsend R, Sampson HA, Taylor SL, Fuchs RL. 1996. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Critical Review in Food Science and Nutrition Supplement* 36: S165-186.

Mills EN, Jenkins J, Marigheto N, Belton PS, Gunning AP, Morris VJ. 2002. Allergens of the cupin superfamily. *Biochemical Society Transactions* 30: 925-929.

Mine Y, Zhang JW. 2003. Surfactants enhance the tight-junction permeability of food allergens in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *International Archives of Allergy and Immunology* 130: 135-142.

Monogioudi E, Faccio G, Lille M, Poutanen K, Buchert J, Mattinen M-L. 2011. Effect of enzymatic cross-linking of β -casein on proteolysis by pepsin. *Food Hydrocolloids* 25: 71-81.

Moreno FJ. 2007. Gastrointestinal digestion of food allergens: Effect on their allergenicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 61: 50-60.

Morr CV. 1985. Functionality of Heated Milk Proteins in Dairy and Related Foods. *Journal of Dairy Science* 68: 2773-2781.

Mosmann TR, Coffman RL. 1989. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Advances in Immunology* 46: 111-147.

Mousavi SH, Bordbar AK, Haertle T. 2008. Changes in structure and in interactions of heat-treated bovine beta-lactoglobulin. *Protein and Peptide Letters* 15: 818-825.

Mullally MM, Meisel H, FitzGerald RJ. 1997. Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine beta-lactoglobulin. *FEBS Letters* 402: 99-101.

Muresan S, van der Bent A, de Wolf FA. 2001. Interaction of beta-lactoglobulin with small hydrophobic ligands as monitored by fluorometry and equilibrium dialysis: nonlinear quenching effects related to protein-protein association. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2609-2618.

Murphy K, Travers P, Walport M. 2012. *Janeway's immunobiology*. New York: Garland Science.

Nakano T, Shimojo N, Morita Y, Arima T, Tomiita M, Kohno Y. 2010. Sensitization to casein and beta-lactoglobulin (BLG) in children with cow's milk allergy (CMA). *Arerugi* 59: 117-122.

Natale M, Bisson C, Monti G, Peltran A, Garoffo LP, Valentini S et al. 2004. Cow's milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry. *Molecular Nutrition and Food Research* 48: 363-369.

Neyestani TR, Djalali M, Pezeshki M. 2003. Isolation of alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin, and bovine serum albumin from cow's milk using gel filtration and anion-exchange chromatography including evaluation of their antigenicity. *Protein Expression and Purification* 29: 202-208.

Nielsen M, Lundegaard C, Lund O. 2007. Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. *BMC Bioinformatics* 8: 238.

Niseteo T, Komes D, Belščak-Cvitanović A, Horžić D, Budeč M. 2012. Bioactive composition and antioxidant potential of different commonly consumed coffee brews affected by their preparation technique and milk addition. *Food Chemistry* 134: 1870-1877.

Nonaka M, Sakamoto H, Toiguchi S, Kawajiri H, Soeda T, Motoki M. 1992. Sodium caseinate and skim milk gels formed by incubation with microbial transglutaminase. *Journal of Food Science* 57.

O'Garra A, Murphy K. 1994. Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. *Current Opinions in Immunology* 6: 458-466.

Obanda M, Owuor PO, Taylor, SJ. 1996. Chemical composition of some Kenyan black teas and their probable benefits to human health. *Tea* 17: 20-26.

Ofori-Anti AO, Ariyaratna H, Chen L, Lee HL, Pramod SN, Goodman RE. 2008. Establishing objective detection limits for the pepsin digestion assay used in the assessment of genetically modified foods. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 52: 94-103.

Ostdal H, Andersen HJ, Davies MJ. 1999. Formation of long-lived radicals on proteins by radical transfer from heme enzymes-a common process? *Archives of Biochemistry and Biophysics* 362: 105-112.

Ostdal H, Bjerrum MJ, Pedersen JA, Andersen HJ. 2000. Lactoperoxidase-induced protein oxidation in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3939-3944.

Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T. 1995. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science* 4: 2411-2423.

Palosuo K, Varjonen E, Nurkkala J, Kalkkinen N, Harvima R, Reunala T et al. 2003. Transglutaminase-mediated cross-linking of a peptic fraction of omega-5 gliadin enhances IgE reactivity in wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111: 1386-1392.

Papadopoulou A, Frazier RA. 2004. Characterization of protein-polyphenol interactions. *Trends in Food Science and Technology* 15: 186-190.

Papiz MZ, Sawyer L, Eliopoulos EE, North AC, Findlay JB, Sivaprasadarao R, Jones TA, Newcomer ME, Kraulis PJ. 1986. The structure of beta-lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature* 324: 383-385.

Parronchi P, Macchia D, Piccinni MP, Biswas P, Simonelli C, Maggi E et al. 1991. Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 4538-4542.

Pellegrini A, Dettling C, Thomas U, Hunziker P. 2001. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine beta-lactoglobulin. *Biochim Biophys Acta* 1526: 131-140.

Peyron S, Mouecoucou J, Fremont S, Sanchez C, Gontard N. 2006. Effects of heat treatment and pectin addition on beta-lactoglobulin allergenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 5643-5650.

Pochard P, Vickery B, Berin MC, Grishin A, Sampson HA, Caplan M et al. 2010. Targeting Toll-like receptors on dendritic cells modifies the T(H)2 response to peanut allergens in vitro. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 126: 92-97 e95.

Porter LJ, Ma, Z., Chan, B. G. 1991. Cacao procyanidins: major flavanoids and identification of some minor metabolites. *Phytochemistry* 30: 1657-1663.

Price GJ. 2003. Recent developments in sonochemical polymerisation. *Ultrasonics Sonochemistry* 10: 277-283.

Prioult G, Fliss I, Pecquet S. 2003. Effect of probiotic bacteria on induction and maintenance of oral tolerance to beta-lactoglobulin in gnotobiotic mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10: 787-792.

Ragona L, Confalonieri L, Zetta L, De Kruif KG, Mammi S, Peggion E et al. 1999. Equilibrium unfolding CD studies of bovine β -lactoglobulin and its 14–52 fragment at acidic pH. *Biopolymers* 49: 441-450.

Rahimi Yazdi S, Corredig M. 2012. Heating of milk alters the binding of curcumin to casein micelles. A fluorescence spectroscopy study. *Food Chemistry* 132: 1143-1149.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26: 1231-1237.

Reche PA, Reinherz EL. 2007. Prediction of peptide-MHC binding using profiles. *Methods in Molecular Biology* 409: 185-200.

Rehorek A, Tauber M, Gubitza G. 2004. Application of power ultrasound for azo dye degradation. *Ultrasonics Sonochemistry* 11: 177-182.

Renard D, Lefebvre, J., Griffin, M. C. A., Griffin, W. G. 1998. Effects of pH and salt environment on the association of beta-lactoglobulin revealed by intrinsic fluorescence studies. *International Journal of Biological Macromolecules* 22: 41-49.

Retief FP, Cilliers L. 1998. The epidemic of Athens, 430-426 BC. *South Africa Medical Journal* 88: 50-53.

Rittstieg K, Suurnakki A, Suortti T, Kruus K, Guebitz G, Buchert J. 2002. Investigations on the laccase-catalyzed polymerization of lignin model compounds using size-exclusion HPLC. *Enzyme and Microbial Technology* 31: 403-410.

Riva S. 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology* 24: 219-226.

Roberts WK, Selitrennikoff CP. 1990. Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *Journal of General Microbiology* 136: 1771-1778.

Robichaux D. 1997. Consensual union and nuptiality in rural Tlaxcala and Mexico: an essay of cultural interpretation. *Espiral* 4: 101-141.

Romagnani S. 2000. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 85: 9-18; quiz 18, 21.

Rona RJ, et al. 2007. The prevalence of food allergy: A meta-analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120: 638-646.

Rosconi F, Fraguas LF, Martínez-Drets G, Castro-Sowinski S. 2005. Purification and characterization of a periplasmic laccase produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Enzyme and Microbial Technology* 36: 800-807.

Ross AI, Griffiths MW, Mittal GS, Deeth HC. 2003. Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* 89: 125-138.

Roth-Walter F, Berin MC, Arnaboldi P, Escalante CR, Dahan S, Rauch J et al. 2008. Pasteurization of milk proteins promotes allergic sensitization by enhancing uptake through Peyer's patches. *Allergy* 63: 882-890.

Rouvinen J, Rautiainen J, Virtanen T, Zeiler T, Kauppinen J, Taivainen A et al. 1999. Probing the molecular basis of allergy. three-dimensional structure of the bovine lipocalin allergen Bos d 2. *Journal of Biological Chemistry* 274: 2337-2343.

Rouvinen J, Jänis J, Laukkanen M-L, Jylhä S, Niemi M, Päivinen T, Mäkinen-Kiljunen S, Haahtela T, Söderlund H, Takkinen K. 2010. Transient Dimers of Allergens. *PLoS ONE* 5: e9037.

Rytönen J, Karttunen TJ, Karttunen R, Valkonen KH, Jenmalm MC, Alatossava T et al. 2002. Effect of heat denaturation on beta-lactoglobulin-induced gastrointestinal sensitization in rats: denatured betaLG induces a more intensive local immunologic response than native betaLG. *Pediatric Allergy and Immunology* 13: 269-277.

Schagger H, von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166: 368-379.

Schocker F, Luttkopf D, Muller U, Thomas P, Vieths S, Becker WM. 2000. IgE binding to unique hazelnut allergens: identification of non pollen-related and heat-stable hazelnut allergens eliciting severe allergic reactions. *European Journal of Nutrition* 39: 172-180.

Seki N, Miyazaki M, Suzuki W, Hayashi K, Arima K, Myburgh E et al. 2004. IL-4-induced GATA-3 expression is a time-restricted instruction switch for Th2 cell differentiation. *Journal of Immunology* 172: 6158-6166.

Selinheimo E, Lampila P., Mattinen ML, Buchert J. 2008. Formation of Protein-Oligosaccharide Conjugates by Laccase and Tyrosinase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Selinheimo ESM, Ahola E, Westerholm-Parvinen A, Kalkkinen N, Buchert J, Kruus K. 2006. Production and characterization of a secreted, C-terminally processed tyrosinase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *FEBS Journal* 273: 4322-4335.

Sélo, Clément, Bernard, Chatel, Créminon, Peltre, Wal. 1999. Allergy to bovine β -lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides. *Clinical and Experimental Allergy* 29: 1055-1063.

Shek LP, Bardina L, Castro R, Sampson HA, Beyer K. 2005. Humoral and cellular responses to cow milk proteins in patients with milk-induced IgE-mediated and non-IgE-mediated disorders. *Allergy* 60: 912-919.

Shpigelman A, Israeli G, Livney YD. 2010. Thermally-induced protein-polyphenol co-assemblies: beta lactoglobulin-based nanocomplexes as protective nanovehicles for EGCG. *Food Hydrocolloids* 24: 735-743.

Shreffler WG, Castro RR, Kucuk ZY, Charlop-Powers Z, Grishina G, Yoo S et al. 2006. The major glycoprotein allergen from *Arachis hypogaea*, Ara h 1, is a ligand of dendritic cell-specific ICAM-grabbing nonintegrin and acts as a Th2 adjuvant in vitro. *Journal of Immunology* 177: 3677-3685.

Si JQ. 1994. Use of laccase in baking industry. International Patent Application PCT/DK94/00232.312. .

Sicherer SH, Sampson HA. 2010. Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125: S116-S125.

Siebert KJ, Troukhanova NV, Lynn PY. 1996. Nature of polyphenol-protein interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 80-85.

Singh H. 1991. Modification of food proteins by covalent crosslinking. *Trends in Food Science and Technology* 2: 196-200.

Smits HH, van Rietschoten JG, Hilkens CM, Sayilir R, Stiekema F, Kapsenberg ML et al. 2001. IL-12-induced reversal of human Th2 cells is accompanied by full restoration of IL-12 responsiveness and loss of GATA-3 expression. *European Journal of Immunology* 31: 1055-1065.

Soares S, Mateus N, de Freitas V. 2007. Interaction of Different Polyphenols with Bovine Serum Albumin (BSA) and Human Salivary α -Amylase (HSA) by Fluorescence Quenching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 6726-6735.

Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE. 1996. Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chemical Reviews* 96: 2563-2606.

Stadtman ER. 1990. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Biology and Medicine* 9: 315-325.

Stanic D, Radosavljevic J, Polovic N, Jadranin M, Popovic M, Vuckovic O et al. 2009. Removal of N-terminal peptides from β -lactoglobulin by proteolytic contaminants in a commercial phenol oxidase preparation. *International Dairy Journal* 19: 746-752.

Stanic D, Monogioudi E, Dilek E, Radosavljevic J, Atanaskovic-Markovic M, Vuckovic O, Raija L, Mattinen M, Buchert J, Cirkovic Velickovic T. 2010. Digestibility and allergenicity assessment of enzymatically crosslinked beta-casein. *Molecular Nutrition and Food Research* 54: 1273-1284.

Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. 2010. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125: S73-S80.

Suslick KS. 1989. The Chemical Effects of Ultrasound. *Scientific American* 260: 80-86.

Swaigood HE. 1986. Chemistry of milk protein. Pages 1-60 in Fox PF, ed. *Developments in Dairy Chemistry*. London and New York: Elsevier Applied Science Publishers Ltd.

Tachibana H. 2009. Molecular basis for cancer chemoprevention by green tea polyphenol EGCG. *Forum Nutrition* 61: 156-169.

Taheri-Kafrani A, Gaudin JC, Rabesona H, Nioi C, Agarwal D, Drouet M et al. 2009. Effects of heating and glycation of beta-lactoglobulin on its recognition by IgE of sera from cow milk allergy patients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 4974-4982.

Tanford C, Bunville LG, Nozaki Y. 1959. The reversible transformation of β -lactoglobulin at pH 7.5. *Journal of American Chemical Society* 81: 4032-4036.

Taniuchi S, Hattori K, Yamamoto A, Sasai M, Hatano Y, Kojima Tet al. 2005. Administration of Bifidobacterium to Infants with Atopic Dermatitis: Changes in Fecal Microflora and Clinical Symptoms. *The Journal of Applied Research* 5: 387-396.

Tantoush Z, Stanic D, Stojadinovic M, Ognjenovic J, Mihajlovic L, Atanaskovic-Markovic M et al. 2011. Digestibility and allergenicity of β -lactoglobulin following laccase-mediated cross-linking in the presence of sour cherry phenolics. *Food Chemistry* 125: 84-91.

Taulier N, Chalikian TV. 2001. Characterization of pH-induced transitions of β -lactoglobulin: ultrasonic, densimetric, and spectroscopic studies. *Journal of Molecular Biology* 314: 873-889.

Thalman CR, Lötzbeyer T. 2002. Enzymatic cross-linking of proteins with tyrosinase. *European Food Research and Technology* 214: 276-281.

Thomas K, et al. 2004. A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 39: 87-98.

Tilley KA, Benjamin RE, Bagorogoza KE, Okot-Kotber BM, Prakash O, Kwen H. 2001. Tyrosine cross-links: molecular basis of gluten structure and function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2627-2632.

Totsuka M, Furukawa S, Sato E, Ametani A, Kaminogawa S. 1997. Antigen-specific inhibition of CD4⁺ T-cell responses to β -lactoglobulin by its single amino acid-substituted mutant form through T-cell receptor antagonism. *Cytotechnology* 25: 115-126.

Tsuji NM, Kurisaki J-i, Mizumachi K. 1993. Establishment of CD4⁺ T Cell Clones Specific to Bovine beta-Lactoglobulin and Analysis of Their Specificity. *The Journal of Biochemistry* 113: 545-548.

Ulleberg E, Comi I, Holm H, Herud E, Jacobsen M, Vegarud G. 2011. Human Gastrointestinal Juices Intended for Use in In Vitro Digestion Models. *Food Digestion* 2: 52-61.

van Beresteijn EC, Meijer RJ, Schmidt DG. 1995. Residual antigenicity of hypoallergenic infant formulas and the occurrence of milk-specific IgE antibodies in patients with clinical allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 96: 365-374.

van Esch BC, Gros-van Hest M, Westerbeek H, Garssen J. 2013. Sensitizing capacity and allergenicity of enzymatically cross-linked sodium caseinate in comparison to sodium caseinate in a mouse model for cow's milk allergy. *Toxicology Letters* 218: 50-55.

Venter C, Pereira B, Voigt K, Grundy J, Clayton CB, Higgins B et al. 2008. Prevalence and cumulative incidence of food hypersensitivity in the first 3 years of life. *Allergy* 63: 354-359.

Villamiel M, de Jong P. 2000. Influence of High-Intensity Ultrasound and Heat Treatment in Continuous Flow on Fat, Proteins, and Native Enzymes of Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3068-3068.

Vyas HK, Izco JM, Jiménez-Flores R. 2002. Scale-Up of Native [beta]-Lactoglobulin Affinity Separation Process. *Journal of Dairy Science* 85: 1639-1645.

Wal JM. 2001. Structure and function of milk allergens. *Allergy* 56: 35-38.

Wal JM. 2002. Cow's milk proteins/allergens. *Annals of Allergy Asthma and Immunology* 89: 3-10.

Wang GK, Wang LX, Tang W, Hao XX, Wang YL, Lu Y. 2011. Binding of Quercetin to Lysozyme as Probed by Spectroscopic Analysis and Molecular Simulation. *Journal of Fluorescence* 21: 1879-1886.

Wang JL, Edelman GM. 1971. Fluorescent probes for conformational states of proteins. IV. The pepsinogen-pepsin conversion. *Journal of Biological Chemistry* 246: 1185-1191.

Warburg O, Christian W. 1941. *Biochemistry*. Z 310: 384-421.

Warren CM, Krzesinski PR, Greaser ML. 2003. Vertical agarose gel electrophoresis and electroblotting of high-molecular-weight proteins. *Electrophoresis* 24: 1695-1702.

Wood RA, Sicherer SH, Vickery BP, Jones SM, Liu AH, Fleischer DM. et al. 2013. The natural history of milk allergy in an observational cohort. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131: 805-812.

Woods RK, Thien F, Raven J, Walters EH, Abramson M. 2002. Prevalence of food allergies in young adults and their relationship to asthma, nasal allergies, and eczema. *Annals of Allergy Asthma and Immunology* 88: 183-189.

Wróblewska B, Kołakowski P, Pawlikowska K, Troszyńska A, Kaliszewska A. 2009. Influence of the addition of transglutaminase on the immunoreactivity of milk proteins and sensory quality of kefir. *Food Hydrocolloids* 23: 2434-2445.

Wu D, Guo Z, Ren Z, Guo W, Meydani SN. 2009. Green tea EGCG suppresses T cell proliferation through impairment of IL-2/IL-2 receptor signaling. *Free Radical Biology and Medicine* 47: 636-643.

Xavier Felipe, Law AJR. 1997. Preparative-scale fractionation of bovine, caprine and ovine whey proteins by gel permeation chromatography. *Journal of Dairy Research* 64: 459-464.

Xiao JB, Kai GY, Yang F, Liu CX, Xu XC, Yamamoto K. 2011. Molecular structure-affinity relationship of natural polyphenols for bovine gamma-globulin. *Molecular Nutrition and Food Research* 55: S86-S92.

Xu F. 1997. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *Journal of Biological Chemistry* 272: 924-928.

Yagami T, Haishima Y, Nakamura A, Osuna H, Ikezawa Z. 2000. Digestibility of allergens extracted from natural rubber latex and vegetable foods. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 106: 752-762.

Yagi M, Sakurai K, Kalidas C, Batt CA, Goto Y. 2003. Reversible unfolding of bovine beta-lactoglobulin mutants without a free thiol group. *Journal of Biological Chemistry* 278: 47009-47015.

Yahya H. 2003. Čudo imunog sistema. Beograd: Centar za prirodnjačke studije

Yang CS, Wang X, Lu G, Picinich SC. 2009. Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nature Reviews Cancer* 9: 429-439.

Yang J, Dunker AK, Powers JR, Clark S, Swanson BG. 2001. Beta-lactoglobulin molten globule induced by high pressure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 3236-3243.

Yang PC, Berin MC, Yu LC, Conrad DH, Perdue MH. 2000. Enhanced intestinal transepithelial antigen transport in allergic rats is mediated by IgE and CD23 (FcεR2). *Journal of Clinical Investigation* 106: 879-886.

Yaropolov A, Kharybin A, Emmeus J, Marko-Varga G, Gorton L. 1995. Flow-injection analysis of phenols at a graphite electrode modified with coimmobilised laccase and tyrosinase. *Analytica Chimica Acta* 308: 137-144.

Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. 2002. Allergy, Parasites, and the Hygiene Hypothesis. *Science* 296: 490-494.

Ye X, Yoshida S, Ng TB. 2000. Isolation of lactoperoxidase, lactoferrin, alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin B and beta-lactoglobulin A from bovine rennet whey using ion exchange chromatography. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 32: 1143-1150.

Yuksel Z, Avci E, Erdem YK. 2010. Characterization of binding interactions between green tea flavanoids and milk proteins. *Food Chemistry* 121: 450-456.

Zhao J, Kwan HS. 1999. Characterization, molecular cloning, and differential expression analysis of laccase genes from the edible mushroom *Lentinula edodes*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4908-4913.

Zhenxing L, Caolimin L, Jamil K. 2006. Reduction of allergenic properties of shrimp (*Penaeus Vannamei*) allergens by high intensity ultrasound. *European Food Research and Technology* 223: 639-644.

Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle G, Strobel M, Schraut W, Stelter F, Schutt C, Passlick B, Pforte A. 1993. The novel subset of CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *European Journal of Immunology* 23: 2053-2058.

Zorilla R, Liang L, Remondetto G, Subirade M. 2011. Interaction of epigallocatechin-3-gallate with beta-lactoglobulin: molecular characterization and biological implication. *Dairy Science & Technology* 91: 629-644.

9. PRILOZI

PRILOG 1.

Tabele sa sastavom polifenolnih ekstrakata korišćenih u eksperimentima opisanim u poglavlju 4.

Tabela 9.1. Sastav polifenolnog ekstrakta crnog čaja koji je određen pomoću LC-MS metode. RT- retenciono vreme, m/z- odnos masa/naelektrisanje.

Ime jedinjenja	m/z	RT (min)	Sadržaj (%)
5-galoil-kvinična kiselina	343.067	0.57	5.18
Galna kiselina	169.014	0.6	13.10
(-)-galokatehin	305.067	1.34	2.62
3-kafeoil-kvinična kiselina	353.087	1.63	5.41
Kvercetin-3-galaktozid	463.182	1.72	0.40
(-)-epigalokatehin-3-galat	457.077	1.79	5.86
5-O-p-kumaroil-kvinična kiselina	337.093	1.84	17.92
Teaflavin	563.14	1.9	3.58
Kvercetin-ramnozil-heksozil-ramnoza	755.204	2.04	1.60
Kvercetin-ramnozil-galaktozid Kvercetin-3-rutinozid	609.146	2.06	12.29
Kamferol-ramnozil-heksozil-ramnoza	739.209	2.1	0.82
(-)-epikatehin-3-galat	441.083	2.11	6.68
Kamferol-3-rutinozid	593.151	2.19	10.67
(+)-katehin/(-)-epikatehin	289.072	2.21	2.18
Kamferol-galaktozid Kamferol-3-glukozid	447.093	2.28	11.00
Kvercetin-3-glukozid	463.255	2.52	0.14
5-kafeoil-kvinična kiselina	353.200	4.75	0.55

Tabela 9.2. Sastav polifenolnog ekstrakta zelenog čaja koji je određen pomoću LC-MS metode. RT- retenciono vreme, m/z- odnos masa/naelektrisanje, i.g.d.- ispod granice detekcije.

Ime jedinjenja	m/z	RT (min)	Sadržaj (%)
Galna kiselina	169.014	0.56	2.13
5-galoil-kvinična kiselina	343.067	0.57	1.99
5-O-p-kumaroil-kinična kiselina	337.093	1.6	5.301
3-kafeoil-kvinična kiselina	353.087	1.69	3.75
Kvercetin-3-galaktozid	463.182	1.76	1.00
(+)-katehin/(-)-epikatehin	289.072	1.79	3.47
(-)-epigalokatehin-3-galat	457.077	1.8	20.77
Teaflavin	563.14	1.92	8.21
Kvercetin-ramnozil-galaktozid	609.146	2.01	i.g.d.
Kvercetin-3-rutinozid	609.146	2.01	i.g.d.
Kvercetin- ramnozil-heksozil-ramnoza	755.204	2.06	6.31
Kvercetin-ramnozil-galaktozid	609.146	2.07	8.38
Kvercetin-3-rutinozid	609.146	2.07	n/a
(-)-epikatehin-3-galat	441.083	2.12	18.12
Kamferol-ramnozil-heksozil-ramnoza	739.209	2.16	5.60
Kamferol-3-rutinozid	593.151	2.19	8.30
Kamferol-galactozid	447.093	2.26	4.90
Kamferol-3-glukozid	447.093	2.26	4.90
Kvercetin-3-glukozid	463.255	2.65	0.82
5-kafeoil-kvinična kiselina	353.2	4.76	0.95

Tabela 9.3. Sastav polifenolinog ekstrakta kafe koji je određen LC-MS metodom.

RT- retenciono vreme, m/z- odnos masa/naelektrisanje.

Ime jedinjenja	m/z	RT (min)	Sadržaj (%)
3-O- kafeoil-kvinična kiselina	353.087	1.63	33.09
4-O- kafeoil-kvinična kiselina			
5-O-p-kumaroil-kvinična kiselina	337.092	1.84	5.86
3-O-feroil-kvinična kiselina	367.103	1.94	28.89
4-O- feroil-kvinična kiselina			
5-O- feroil-kvinična kiselina			
Pretpostavljeni 3-O- kafeoil-kvinični lakton	335.077	2.01	12.34
Pretpostavljeni di-kafeoil-kvinični lakton	497.334	2.18	2.26
3,4-O- di-kafeoil-kvinična kiselina	515.119	2.23	13.19
3,5-O- di-kafeoil-kvinična kiselina			
4,5-O- di-kafeoil-kvinična kiselina			
3-O-feruoil-4-O- kafeoil-kvinična kiselina	529.135	2.46	4.43
4-O-kafeoil-5-O- feroil-kvinična kiselina			

Tabela 9.4. Sastav polifenolnog ekstrakta kakaoa koji je određen LC-MS metodom.

RT- retenciono vreme, m/z- odnos masa/naelektrisanje.

Ime jedinjenja	m/z	RT (min)	Sadržaj (%)
Luteolin-8-C-glukozid (orientin)	487.167	0.78	4.81
Apigenin-8-C-glukozid (viteksin)	431.133	0.89	6.57
Procijanidin dimeri	577.134	1.68	18.11
Katehin	289.072	1.78	19.77
Epikatehin	289.072	1.78	19.77
Procijanidin trimeri	865.199	1.83	8.47
Kvercetin-3-O-galaktozid (hiperozid)	463.088	2.12	4.72
Kvercetin-3-O-glukozid (izokvercitrin)			
Luteolin-7-O-glukozid	447.093	2.12	3.87
Luteolin-6-C-glukozid (izo-orientin)	487.305	2.17	4.69
Kvercetin-3-O-arabinozid	433.078	2.22	4.51

PRILOG 2.

Klinički simptomi pacijenata testiranih u kožnim probama, dodatak poglavlju 5

Tabela 9.5. Reakcije pacijenata alergičnih na mleko na nativni BLG i sonifikovane forme BLG-a (C5, H60) u kožnim probama („prick“ test). Prečnik otoka i iritacije je izmeren i izražen u mm.

Br.	Pol	God.	Simptomi	IgE kAU/L	“prick to prick” test otok x iritacija (mm)	Histamin otok x iritacija (mm)	Pozitivan na BLG/H60/C5
1	Ž	2	Urtikarija	5.33	5 x 25	3 x 12	H60
2	M	3	Urtikarija	14.5	14 x 40	10 x 25	BLG, C5, H60
3	M	1	Urtikarija	11.5	20 x 30	10 x 15	ne
4	Ž	1	Urtikarija	11.2	13 x 20	5 x 15	ne
5	Ž	0.5	Urtikarija	0.53	3 x 20	6 x 25	ne
6	M	2	Urtikarija	0.75	5 x 20	5 x 20	ne
7	Ž	0.5	Urtikarija	58.9	15 x 20	5 x 25	C5, H60
8	M	0.5	Urtikarija	1.41	5 x 25	4 x 15	ne
9	M	2	Urtikarija	0.65	4 x 10	4 x 10	ne
10	M	3	Urtikarija	0.90	3 x 10	3 x 12	BLG
11	M	9	Angioedem	0.37	3 x 10	3 x 10	ne
12	Ž	1	Urtikarija	2.82	10 x 25	5 x 15	ne
13	M	3	Urtikarija	1.02	15 x 30	6 x 25	ne
14	Ž	2	Urtikarija	0.60	10 x 25	3 x 20	ne
15	Ž	0.5	Urtikarija	36.9	3 x 5	3 x 6	BLG, C5, H60
16	M	3	Urtikarija	3.69	3 x 5	3 x 5	ne
17	M	4	Urtikarija	0.00	10 x 20	5 x 10	ne
18	Ž	4	Urtikarija	0.00	5 x 15	5 x 10	ne
19	M	12	Angioedem + kijanje	65.0	4 x 20	3 x 35	BLG, C5, H60
20	M	2	Urtikarija	11.6	5 x 15	3 x 15	ne
21	M	7	Urticarija+ kijanje	0.60	5 x 10	5 x 10	ne
22	M	7	Urtikarija	0.71	5 x 10	4 x 7	ne
23	Ž	2	Urtikarija	11.9	10 x 20	8 x 25	H60
24	M	2	Urtikarija	65.9	10 x 30	5 x 15	BLG, C5, H60
25	M	0.5	Urtikarija	2.70	8 x 20	6 x 20	ne
26	M	2	Urtikarija	0.00	8 x 10	7 x 12	ne
27	Ž	1	Urtikarija	1.68	5 x 8	6 x 7	ne

Br.	Pol	God.	Simptomi	IgE kAU/L	“prick to prick” test na mleko otok x iritacija (mm)	Histamin otok x iritacija (mm)	Pozitivan na BLG/H60/C5
28	Ž	2	Ekcem	1.50	5 x 10	5 x 8	ne
29	M	3	Urtikarija	13.9	10 x 10	5 x 15	ne
30	M	2	Ekcem	11.9	6 x 25	3 x 10	ne
31	M	1	Ekcem	0.65	4 x 4	3 x 4	ne
32	Ž	1	Ekcem	0.40	3 x 7	3 x 7	ne
33	M	1	Ekcem	0.50	3 x 8	3 x 10	ne
34	Ž	1	Ekcem	0.37	6 x 10	7 x 8	ne
35	M	1	Urtikarija	0.97	10 x 25	4 x 20	ne
36	M	1	Urtikarija	3.55	4 x 20	3 x 15	ne
37	M	3	Ekcem	0.90	3 x 15	3 x 12	BLG
38	M	3	Ekcem	2.92	4 x 18	4x 20	ne
39	Ž	2	Urtikarija	2.88	5 x 20	3 x 20	BLG, C5, H60
40	M	1	Anafilaktički šok	>100	12 x 40	3 x 15	BLG, C5, H60
41	M	0.5	Urticarija + angioedem	20.0	2 x 15	3 x 20	BLG, C5, H60

BIOGRAFIJA AUTORA

Marija Stojadinović je rođena u Čačku 14. 11. 1986. godine od majke Vere i oca Milovana. Osnovnu školu i gimnaziju je završila u Pirotu sa prosekom 5,00 kao nosilac Vukove diplome i priznanja iz oblasti prirodnih i društvenih nauka. Biohemiju na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je 2005. godine, a diplomirala je 2009. sa prosekom 9.79 po programu ubrzanih studija. Diplomski rad je odbranila 11. septembra 2009. godine sa ocenom 10. Diplomirala je kao student generacije Hemijskog fakulteta, nosilac diplome „Đorđe Stefanović“ i dobitnik Godišnje nagrade Srpskog hemijskog društva za izuzetan uspeh u toku studija. Marija Stojadinović je 2009. god. upisala doktorske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu po programu Doktor biohemijskih nauka. Od januara 2010. godine zaposlena je na Inovacionom centru Hemijskog fakulteta (ICHF) na mestu istraživača pripravnika do septembra 2010. godine kada prelazi na Hemijski fakultet na mesto istraživača saradnika. Od marta 2013. godine zaposlena je na Hemijskom fakultetu na mestu asistenta za užu naučnu oblast Biohemija.

U toku doktorskih studija Marija Stojadinović je bila na naučno istraživačkom boravaku na „Institute for Risk Assessment Sciences“, Univerzitet u Utrehtu, Holandija (3 meseca) i na „Karolinska Institutet“, Stokholm, Švedska (3 meseca).

Marija Stojadinović je autor pet naučnih radova (četiri su štampana u vrhunskim međunarodnim časopisima, jedan u međunarodnom časopisu), jednog poglavlja u istaknutoj monografiji međunarodnog značaja, i 19 saopštenja na skupovima internacionalnog i nacionalnog značaja. Član je Srpskog hemijskog društva, Srpskog biohemijskog društva, Svetske Alergološke Organizacije i Evropske Akademije za alergologiju i kliničku imunologiju.

Потписане изјаве:

I

Изјава о ауторству

Потписана Марија Стојадиновић

број уписа ДБ 5/2009

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај обраде хране и интеракција компоненти матрикса хране на структуру и функцију алергена хране

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

Потпис докторанта

У Београду, 11.10.2013.



II

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марија Стојадиновић

Број уписа ДБ 5/2009

Студијски програм доктор биохемијских наука

Наслов рада Утицај обраде хране и интеракција компоненти матрикса хране на структуру и функцију алергена хране

Ментор проф. др Тања Ђирковић Величковић

Потписани Марија Стојадиновић

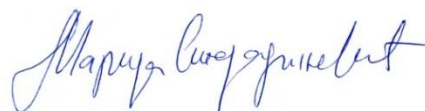
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанта

У Београду, 11.10.2013.



III

Изјава о коришћењу

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

Утицај обраде хране и интеракција компоненти матрикса хране на структуру и функцију алергена хране

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанта

У Београду, 11.10.2013.



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

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

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

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

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

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