

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET

Jasna M. Nikolić

**Unapređenje dijagnostičkih reagenasa
za alergiju na bananu**

Doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY

Jasna M. Nikolić

**Improvement of diagnostic reagents
for banana fruit allergy**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

KOMISIJA

Mentor:

dr Marija Gavrović-Jankulović, redovni profesor Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

dr Zoran Vujčić, redovni profesor Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

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

dr Lidija Burazer, viši naučni saradnik Instituta za virusologiju, vakcine i serume "Torlak"

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Zahvaljujem se svom mentoru, dr Mariji Gavrović-Jankulović, na pruženoj pomoći i usmeravanju tokom realizacije ove disertacije, kao i na svemu što sam od nje naučila.

Zahvljujem se dr Zoranu Vujčiću, dr Tanji Ćirković Veličković i dr Lidiji Burazer na veoma korisnim sugestijama i savetima koje sam od njih dobila tokom izrade disertacije.

Zahvaljujem se na saradnji i pomoći svojim kolegama iz laboratorije 429, bivšim i sadašnjim, kao i kolegama iz Istraživačkog centra u Borstelu sa kojima sam sarađivala tokom izrade ove disertacije.

Takođe se zahvaljujem svojoj porodici, Simou i prijateljima na njihovoj podršci, strpljenju i razumevanju.

Naslov doktorske disertacije: Unapređenje dijagnostičkih reagenasa za alergiju na bananu

IZVOD

Banana je voće koje se veoma često koristi u ishrani širom sveta. Predstavlja jednu od prvih čvrstih namirnica koje se uvode u ishranu kod novorođenčadi, kao i jednu od uobičajnih namirnica u ishrani hospitalizovanih pacijenata. Prijatnog je ukusa i lake svarljivosti, i bogata je nutrijentima. Ipak, pored svih dobrih strana korišćenja banane u ishrani, ona može biti uzročnik netolerancije i alergijske reakcije.

Alergijska reakcija na bananu je u većini slučajeva praćena pojavom blagih lokalnih simptoma, međutim u retkim slučajevima dolazi i do anafilaktičke reakcije.

Dijagnostički reagensi koji se rutinski primenjuju u kliničkoj dijagnostici za alergiju na bananu su se u praksi pokazali kao nepouzdana. Kao pokazatelj važnosti upotrebe pouzdanih dijagnostičkih reagenasa opisani su slučajevi anafilaktičke reakcije nakon konzumiranja banane, gde je pokazano da komercijalno dostupni reagensi nisu dovoljno osetljivi da ukažu na prisustvo specifičnih IgE antitela, odnosno da postoji razvijena alergija na bananu. U cilju unapređenja dijagnostičkih reagenasa za alergiju na bananu u ovom radu je optimizovan postupak za prečišćavanje tri važna alergena iz banana, označena kao Mus a 2, Mus a 4 i Mus a 5. Dobijeni pojedinačni dijagnostički reagensi za alergiju na bananu su omogućili detekciju specifičnog IgE-a kod alergičnih osoba i pokazali su se pouzdanijim u odnosu na komercijalni alergenski ekstrakt.

U literaturi, kao i u rezultatima naših istraživanja, je pokazano da osim do sada registrovanih alergena iz banane (WHO/IUIS baza podataka) postoji još IgE reaktivnih proteina banane koji bi mogli da se koriste radi unapređenja dijagnostifikovanja alergije na ovaj alergen izvor. Upotrebom kombinatornih biblioteka peptidnih liganada (CPLL) razvijen je 2D imunoblot proteina iz ekstrakta banane. Detektovani su IgE reaktivni proteini banane, među kojima su i neki koji do sada nisu registrovani kao alergeni. Identifikacija proteina sa 2D mape je urađena tehnikom određivanja "proteinskog otiska prsta" (PMF). Među IgE reaktivnim proteinima banane identifikovana je i katalaza, koja je proizvedena rekombinantnom DNK tehnologijom i okarakterisana kao novi alergen banane. IgE reaktivnost katalaze iz banane je potvrđena u imunoblotu gde je 8 od 13

pacijenata alergičnih na bananu pokazalo IgE reaktivnost. Na taj način je pripremljen panel od četiri alergena za upotrebu u kliničkoj dijagnostici alergije na bananu baziran na pojedinačnim komponentama.

Ključne reči: Alergija na hranu, banana, alergeni

Naučna oblast: Prirodno-matematičke nauke

Uža naučna oblast: Biohemija

UDK broj: 577.112

Title of Doctoral Dissertation: Improvement of diagnostic reagent for banana fruit allergy

ABSTRACT

Banana fruit is popular around the world. It is one of the first solid foods introduced in the newborns diet, and it is common food for hospitalized patients. It has a pleasant taste; it is rich with nutrients and easy to digest. Beside all the benefits of usage of banana in diet, there is still a problem of intolerance to banana and banana allergy.

Banana allergy has usually been associated with mild, local symptoms, but in some cases banana allergy can lead even to the severe anaphylactic reactions.

Available diagnostic reagents for banana allergy have been shown as not reliable enough. In order to illustrate the severity of banana allergy and the significance of the usage of adequate diagnostic reagents, we described cases of anaphylactic reaction after banana ingestion, and showed that commercially available reagents were not sensitive enough to detect the presence of banana specific IgE in this patient sera, e.g. the presence of developed banana allergy. In order to improve diagnostic reagents for banana allergy we purified three important banana fruit allergens denoted as Mus a 2, Mus a 4, and Mus a 5. Prepared single diagnostic reagents for banana allergy enabled detection of the specific IgE of allergic persons and were shown to be reliable diagnostic reagents compared to commercially available allergen extract.

According to the literature and to our results it is shown that beside registered banana allergens (WHO/IUIS database) there are more non registered banana IgE reactive proteins which might improve diagnostic of allergy to this allergen source. By using combinatorial peptide-ligand libraries (CPLL) we developed 2D immunoblot of banana protein extract. Among detected IgE reactive proteins, there were proteins which are not registered as allergens. Proteins from 2D protein map were identified using protein mass fingerprint (PMF). Among identified banana IgE reactive proteins there was banana catalase, which we produced by using the recombinant DNA technology and characterized as a novel allergen. IgE reactivity of produced banana catalase was confirmed in immunoblot where 8 of 13 sera of banana-allergic patients showed IgE reactivity toward to this banana protein. By this we managed to prepare a panel of four

pure banana fruit allergens to be used for component resolved diagnostics of banana allergy.

Key words: Food allergy, banana, allergens

Scientific field: Life sciences

Scientific subfield: Biochemistry

UDK number: 577.112

SPISAK SKRAĆENICA

1D – jednodimenzionalno

2D – dvodimenzionalno

ACN – acetonitril

APS – amonijum-persulfat

BCIP - 5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat

BFP - bromfenol plavo

BSA - goveđi serum albumin (eng. *bovine serum albumin*)

CBB – eng. *coomassie brilliant blue*

CPLL – kombinatorne biblioteke peptidnih liganada (eng. *combinatorial peptide ligand libraries*)

CRD – dijagnostika sa razdvojenim komponentama (eng. *component resolved diagnostics*)

Da – Dalton

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

EDTA - etilendiamin tetrasirćetna kiselina

IgE - imunoglobulin E

ELISA – enzim-vezani imunosorbentni test (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

ESI – elektrosprej jonizacija

FcεR – receptor za imunoglobulin E visokog afiniteta

GIT – gastrointestinalni trakt

IEF – izoelektrično fokusiranje

ImmunoCap – eng. *Immuno Solid-phase Allergy Chip*

IFN - interferon

IL – interleukin

MALDI – eng. *matrix-assisted laser desorption/ionization*

MM – molekularski markeri

MS – masena spektrometrija

Mus a 1 –profilin iz banane

Mus a 2 –hitinaza klase I iz banane

Mus a 3 –protein za prenos lipida iz banane

Mus a 4 –protein sličan taumatinu iz banane

Mus a 5 – β -1,3-glukanaza iz banane

Mus a 6 - askorbat peroksidaza iz banane

NBT - 4-nitroblue tetrazolium

NC – nitroceluloza

nsLTP – nespecifični protein za prenos lipida (eng. *non-specific lipid transfer protein*)

OAS – oralni alergijski sindrom

PAGE – poliakrilamidna gel elektroforeza (eng. *polyacrilamide gel electrophoresis*)

pI – izoelektrična tačka

PMF – maseni otisak prsta proteina (eng. *peptid mass fingerprinting*)

PVDF - poliviniliden difluorid

PR – povezano sa patogenošću (eng. *pathogen related*)

SDS-PAGE - natrijum dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (eng. *sodium dodecylsulphate-polyacrilamide gel electrophoresis*)

RAST – radioalergosorbentni test

RPC – reverzno-fazna hromatografija (eng. *reversed-phase chromatography*)

SP – sulfopropil

SPT – kožne probe (eng. *skin prick test*)

ST – sobna temperatura

TBS – TRIS-om puferisan fiziološki rastvor (eng. *TRIS buffer saline*)

TCA – trihlorsirćetna kiselina

TEMED - N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin

TFA – trifluorsirćetna kiselina

TLP – protein sličan taumatinu (eng. *thaumatin like protein*)

TOF – vreme “letenja” (eng. *time of flight*)

QAE – kvaternarni aminoetil

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

SADRŽAJ

1 UVOD	1
2 OPŠTI DEO	2
2.1 Alergija	2
2.1.1 IgE molekul i mehanizam IgE-posredovane alergijske reakcije	3
2.1.2 Alergeni	8
2.1.3 Pojam anafilaktičkog šoka	10
2.1.4 Alergije na hranu	10
2.1.5 Nastanak IgE-posredovane alergije na hranu	13
2.1.6 Alergeni hrane	15
2.2 Banana (<i>Musa acuminata</i>)	19
2.2.1 Alergija na bananu i alergeni banane	20
2.2.1.1 Profilin iz banane	22
2.2.1.2 Hitinaza klase I iz banane	24
2.2.1.3 Ne-specifični protein za prenos lipida iz banane	26
2.2.1.4 Protein sličan taumatinu iz banane	27
2.2.1.5 β -1,3-glukanaza iz banane	30
2.2.1.6 Askorbat peroksidaza iz banane	33
2.2.1.7 Katalaza iz banane	34
2.3 Dijagnostika alergije na hranu i značaj unapređenja dijagnostičkih reagenasa za alergije	35
2.4 Identifikacija proteina masenom spektrometrijom	38
2.4.1 Upotreba biblioteka kombitornih peptidnih liganada	41
3 CILJ	43
4 NAŠI RADOVI	44
4.1 Priprema proteinskog ekstrakta banane	44
4.2 Razvijanje alergograma na proteine ekstrakta banane.....	45
4.3 Dobijanje 2D mape proteina banane.....	46

4.4 Dobijanje 2D mape IgE reaktivnih proteina banane.....	47
4.5 Identifikacija IgE reaktivnih proteina banane	49
4.6 Prečišćavanje glavnih alergena banane: Mus a 2, Mus a 4 i Mus a 5	56
4.6.1 Biohemijska karakterizacija prečišćenih Mus a 2, Mus a 4 i Mus a 5	58
4.6.2 Ispitivanje antigenosti prečišćenih Mus a 2, Mus a 4 i Mus a 5	60
4.6.3 Rezultati korišćenja prečišćenih Mus a 2, Mus a 4 i Mus a 5 u kliničkoj dijagnostici	62
4.7 Proizvodnja i prečišćavanje katalaze iz banane	65
4.7.1 Ispitivanje IgE reaktivnosti katalaze iz banane	68
5 DISKUSIJA	71
6 ZAKLJUČAK	73
7 EKSPERIMENTALNI DEO	74
7.1 Priprema ekstrakta banane	74
7.2 Koncentrovanje proteina	75
7.2.1 Koncentrovanje proteina ultrafiltracijom	75
7.2.2 Koncentrovanje proteina liofilizacijom	75
7.2.3 Koncentrovanje proteina precipitacijom amonijum-sulfatom	75
7.2.4 Koncentrovanje proteina precipitacijom sa acetonom-TCA	76
7.3 Određivanje koncentracije proteina	76
7.3.1 Određivanje koncentracije proteina <i>Bradford</i> -ovim reagensom	77
7.3.2 Određivanje koncentracije proteina spektrofotometrijski	78
7.4 Elektroforeze (1D i 2D PAGE)	79
7.4.1 Jednodimenzionalna elektroforeza	79
7.4.2 Dvodimenzionalne elektroforeze	82
7.4.2.1 Izoelektrofokusingiranje u nativnim uslovima i 2D elektroforeza	82
7.4.2.2 Izoelektrofokusingiranje na imobilizovanom pH gradijentu i 2D elektroforeza ...	85
7.4.2.3 Primena biblioteka kombinatorinih peptidnih liganada	87
7.5 Tripsinska digestija proteina u gelu posle SDS PAGE i MALDI TOF analiza	87

7.6 Elektrotransfer proteina sa gela na membranu	88
7.7 N-terminalno sekvenciranje proteina	89
7.8 Prečišćavanje Mus a 2, Mus a 4 i Mus a 5	90
7.8.1 Jonoizmenjivačka hromatografija na QAE <i>Sephadex</i> A 50 matriksu	91
7.8.2 Jonoizmenjivačka hromatografija na <i>Hi Trap</i> SP FF koloni	91
7.8.3 Reverzno fazna hromatografija na <i>Supelco</i> C5 koloni	92
7.9 Proizvodnja i prečišćavanje katalaze iz banane	93
7.9.1 Priprema čvrstih i tečnih podloga	93
7.9.2 Kloniranje gena za katalazu u pET23b vektor	94
7.9.3 Ekspresija katalaze	95
7.9.4 Prečišćavanje katalaze	95
7.10 Zimogramaska detekcija katalaze u gelu	97
7.11 Elektroelucija proteina iz gela	98
7.12 <i>Western blot</i>	98
7.13 Kožne probe	102
8 LITERATURA	103
9 PRILOG	116
9.1 Biografski podaci kandidata	116
9.2 Etička dozvola	116
9.3 Publikacije koje čine deo disertacije	119

1 UVOD

Alergije na hranu predstavljaju neprimeren odgovor imunološkog sistema osobe na proteine hrane, a njihova sve veća učestalost predstavlja ozbiljan zdravstveni problem širom sveta. Ozbiljnost kliničkih simptoma ovog poremećaja varira, i to počevši od lokalnih koji su ograničeni na oralnu mukozu, pa do jakih anafilaktičkih reakcija koje su životno ugrožavajuće. Iz tog razloga je precizna dijagnostika alergije na određenu namirnicu od velike važnosti u kliničkoj praksi i zdravstvenoj zaštiti alergičnih osoba [1-3]. Jedna od težnji molekularne alergologije je unapređenje dijagnostičkih reagenasa za alergije na hranu, pre svega zamenom ekstrakata alergena hrane panelom IgE reaktivnih molekula (*eng. component-resolved diagnosis, CRD*). Danas dostupni reagensi koji se rutinski koriste u dijagnostici alergije na voće neretko daju lažno negativnu sliku na razvijeno stanje preosetljivosti. Suština ovog problema je u tome što ekstrakti hrane biljnog porekla koji se koriste u dijagnostičke svrhe predstavljaju mešavine alergena i nealergenih biomolekula, tako da alergene komponente nekada nisu u dovoljnoj koncentraciji zastupljene u dijagnostičkom reagensu, što dovodi do pogrešne dijagnostike [4-6].

Banana (*Musa acuminata*) je poslednjih godina prepoznata kao važan izvor alergena. Kliničke manifestacije alergije na bananu su najčešće blagi lokalni simptomi, premda su u pojedinim slučajevima registrovane i anafilaktičke reakcije što ukazuje na ozbiljnost ove alergije [7-11]. Alergija na bananu je do sada dovedena u vezu sa šest alergena koji su registrovani u okviru WHO/IUIS liste [12], premda je pokazano da banana sadrži još IgE reaktivnih proteina koje je potrebno izolovati, okarakterisati i odrediti njihov klinički značaj. Probleme u standardizaciji ekstrakata alergena banane predstavljaju varijacije u nivou ekspresije proteina tokom zrenja, kao i različiti uslovi prilikom skladištenja i transporta. Do sada registrovani alergeni iz ovog izvora se u proteinskom ekstraktu nalaze kao najzastupljeniji proteini, što je bila značajna olakšica u njihovom izolovanju i karakterizaciji. Problem identifikacije ostalih alergena banane leži u složenost matriksa u kojem se nalaze brojni pigmenti i polisaharidi (skrob, pektin, i dr.) [13], kao i niskom sadržaju proteina, tako da njihovo izolovanje i strukturalna i imunološka karakterizacija predstavljaju izazov u molekularnoj alergologiji.

2 OPŠTI DEO

2.1 Alergija

Alergijska oboljenja danas predstavljaju jedan od najučestalijih zdravstvenih problema u svetu, premda sve do početka 20. veka imunološki koncept alergije nije bio definisan. Iako su alergijske reakcije opisane u mnogim drevnim medicinskim spisima koji potiču iz Egipta, Kine, Grčke i Rima, ključni korak u razvoju i prihvatanju ideje bilo je otkriće mastocita, bazofila i eozinofila od strane Pola Erliha (*Paul Erlich*) tokom sedamdesetih godina 19. veka. Ovo, kao i druga otkrića u 19. veku su bili ključni pokretači razumevanja ovog fenomena [14].

Reč alergija se po prvi put koristi 24. jula 1906. godine u publikaciji Klemensa fon Pirkea (*Clemens fon Pirquet*) u nemačkom časopisu "*Münchener Medizinische Wochenschrift*". Ova reč je skovana od reči grčkog porekla "allos" (drugo) i "ergos" (aktivnost). Pirke, inače pedijatar, primetio je da ponovljeni kontakt obolele dece i određenog materijala koji je nazvao "alergenom", dovodi do alergijske reakcije. Ideja da antitela mogu imati štetnu, a ne samo zaštitnu ulogu nije bila potpuno razvijena do dvadesetih godina 20. veka. Danas je alergija definisana od strane svetske alergološke organizacije (*World Allergy Organization, WAO*) kao imunološki posredovana specifična preosetljivost [15].

Iako smo zapravo svi neprestano izloženi bezopasnim antigenima, pojedinci ipak ispoljavaju neprimerenu imunološku reakciju pri kontaktu sa ovim antigenima. Uobičajni imunološki odgovor na pomenute antigene (alergene) je indukovanje tolerancije, a njeno narušavanje i neuspeh razvoja tolerancije dovodi do alergijskih reakcija [16].

Sudeći po sve brojnijim navodima u literaturi, neosporno je da alergijska obojenja bivaju sve učestalija, pre svega u industrijalizovanim područjima. Postoje različite hipoteze koje pokušavaju da objasne ovaj fenomen i njegovu sve veću učestalost. Jedna od njih je "higijenska hipoteza" koja sugerše da su pojačane higijenske mere, kao i upotreba vakcina i antibiotika zapravo smanjili učestalost infekcija koje normalno stimulišu imunološki sistem. Smatra se da su upravo te

izbegnute infekcije ono što bi trebalo da navede imunološki sistem da dodatno ojača i da ne razvije alergijski odgovor na bezopasne antigene iz spoljašnje sredine [17, 18]. Pored genetske predispozicije, odnosno atopije, novine na tržištu hrane i prehrambene navike (dostupnost egzotičnog voća, industrijska prerada i smanjeno konzumiranje fermentisanih prehrambenih proizvoda), razlike u životnim uslovima između industrijalizovanih zemalja i zemalja u razvoju, kontakt sa kućnim ljubimcima i domaćim životinjama, kao i učestala upotreba antibiotika takođe mogu uticati na imunološki sistem i razvoj alergija [19].

Alergijska oboljenja uključuju oralni alergijski sindrom (OAS), alergijsku kijavicu, atopijski dermatitis, alergijsku astmu i anafilaksija. Terapija uključuje upotrebu antihistaminika, adrenalina, bronhodilatatora, kortikosteroida, smanjeno izlaganje alergenu i imunoterapiju specifičnim alergenom [20, 21].

Reč atopija potiče od grčke reči “*atopy*” što znači neuobičajno, čudno ili nepravilno. Pod terminom atopija se smatra tendencija za proizvodnju imunoglobulina E (IgE) i pokazano je da postoji genetska predispozicija za proizvodnju ove klase imunoglobulina kod atopičnih osoba, kao odgovor na ponovljeno izlaganje malim dozama alergena [22]. Kao posledica atopije se javljaju preosetljivosti kože i mukoznih površina na supstancije iz okolne sredine, i u vezi su sa povećanom proizvodnjom specifičnih IgE molekula koji prepoznaju supstancije prisutne u okolnoj sredini i dovode do pomenutih kliničkih simptoma [22, 23].

Od otkrića IgE molekula 1967. godine [24] njegova funkcija u organizmu nije do tančina razjašnjena. Zna se da je mehanizam trenutne preosetljivosti podudaran sa mehanizmom čiji je biološki smisao kontrola infekcije helmintima, i da u njemu učestvuju efektorske Th2 ćelije, bazofili, mastociti, eozinofili i IgE antitela [23, 25, 26].

2.1.1 IgE imunoglobulin i mehanizam IgE-posredovane alergijske reakcije

IgE je imunoglobulin molekulske mase oko 190 kDa sa ugljenohidratnim sadržajem od 11%, i sastoji se od četiri polipeptidna lanca. Od toga su dva ε teška lanca što je karakteristika ove klase imunoglobulina [27]. IgE deli opšte karakteristike sa

ostalim imunoglobulinima, uz jedinstvenu sposobnost da pokreće imunološki odgovor na izuzetno niske količine specifičnih antigena. Nekada je potrebno samo 1 μ g specifičnog antigena da bi došlo do pokretanja alergijske reakcije [28]. Takođe važno svojstvo IgE molekula je njegova zastupljenost u jako niskim koncentracijama u krvnom serumu (0-0,0001 g/L, odnosno oko 0,004% ukupnih antitela u serumu) [29, 30], što i predstavlja jedno od objašnjenja zbog čega je ovaj molekul otkriven mnogo kasnije u odnosu na otkrića ostalih klasa antitela [25].

Kada govorimo o mehanizmu alergijske reakcije, treba posebno pomenuti mastocite, bazofile i eozinofile usled njihovog značaja u patogenezi alergijskih oboljenja. Ove ćelije učestvuju u alergijskim oboljenjima usled prisustva receptora za IgE molekule na njihovoj površini, kao i usled posedovanja imunološki aktivnih medijatora koje otpuštaju nakon što bivaju aktivirane. Treba naglasiti da bazofili i mastociti iskazuju daleko više receptora na površini ćelije za koje se vezivanje IgE u odnosu na eozinofile kod kojih je sinteza ovih receptora minimalna [25]. Kod zdravih osoba se zreli mastociti nalaze u vaskularizovanim tkivima u telu, pre svega u onim delovima koji se češće susreću sa antigenima iz okolne sredine. Eozinofili čine oko 5% ukupnih leukocita krvi, a nalaze se i u hematopojetičkim i limfnim organima kao što su kostna srž, slezina, limfni čvorovi i timus. Bazofili se pre svega nalaze u krvi, premda poseduju sposobnost da velikom brzinom dospevaju u tkiva gde se odigrava zapaljenje i gde preuzimaju svoju efektorsku ulogu [25, 31].

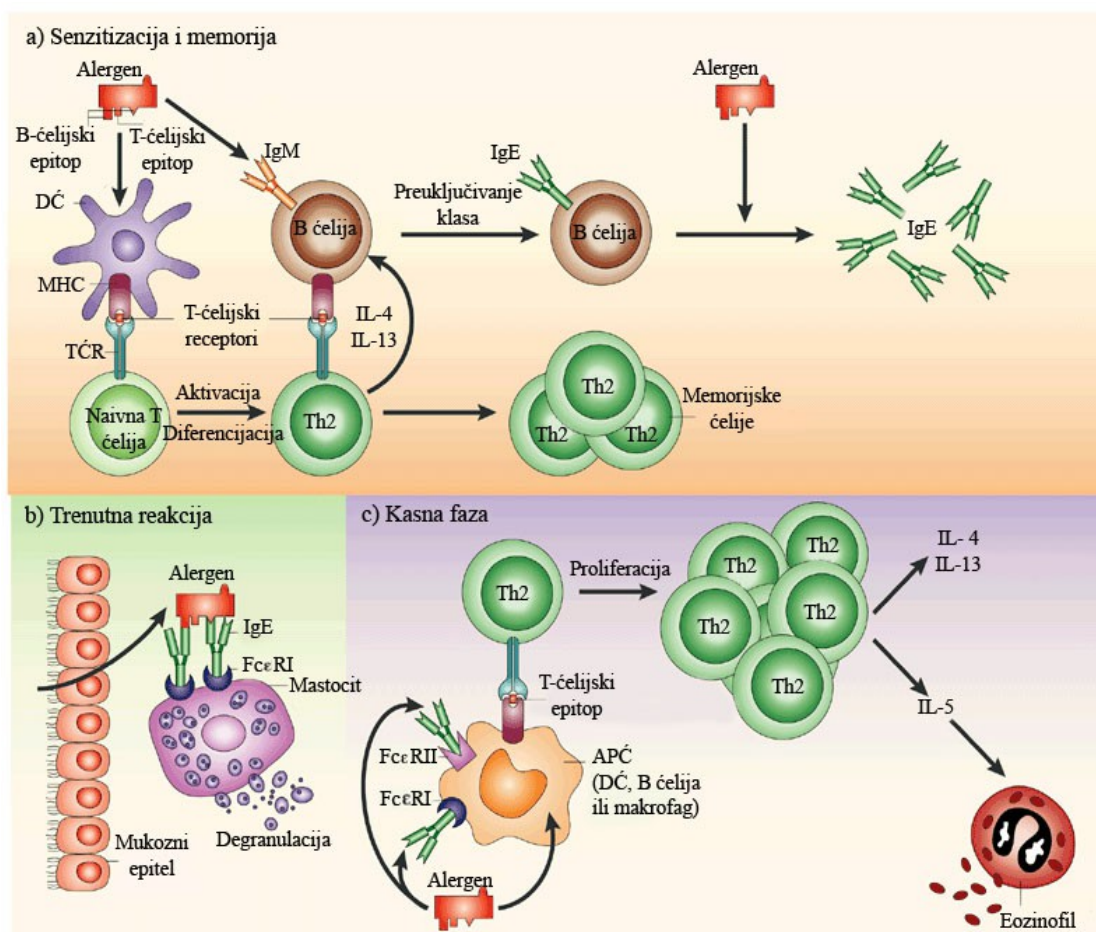
Kada se usled vezivanja alergena za IgE molekule „zakačene” za visokoafinitetne receptore na efektorskim ćelijama ukršteno povežu, iz mastocita i bazofila se oslobađaju medijatori zapaljenja koji uključuju histamin, leukotrijene i citokine [25, 31, 32]. Ovo zapaljenje se deli na ranu fazu za koju se vezuju kratko-živeći medijatori od kojih je najznačajniji histamin, i na kasnu fazu koja uključuje prisustvo leukotrijena, citokina, i hemokina koji dalje privlače eozinofile i bazofile na mesto zapaljenja. Medijatori mogu biti unapred sintetisani i skladišteni u ovim ćelijama (histamin, proteaze i citotoksični proteini) i oni bivaju oslobođeni u roku od nekoliko sekundi ili minuta nakon aktivacije ćelija, ili mogu biti naknadno sintetizovani kao posledica aktivacije (metaboliti arahidonske kiseline, hemokini, citokini) i oslobađati se u roku od minuta, sata ili dana nakon aktivacije [25, 32].

Način na koji se odvija IgE posredovana aktivacija efektorskih ćelija se razlikuje od načina aktivacije efektorskih ćelija imunološkog sistema posredovanim drugim klasama imunoglobulina. Ostale klase antitela se vezuju za efektorske ćelije i pokreću imunološki odgovor tek nakon što specifično prepoznaju i vežu antigene preko svojih varijabilnih regiona. U tom smislu se IgE molekul razlikuje od ostalih klasa imunoglobulina, jer se on vezuje za FcεR receptore efektorskih ćelija u odsustvu vezanog antigena. IgE se u organizmu uglavnom nalazi vezan za mastocite u tkivima, kao i na cirkulišućim bazofilima. Postoje dva tipa IgE-vezujućeg FcεR receptora [25, 33, 34]. FcεRI je receptor visokog afiniteta na mastocitima i bazofilima. Kada vezivanjem antigena dođe do unakrsnog povezivanja IgE molekula koji je vezan za ovaj receptor, pokreće se transdukcija signala i aktivacija efektorskih ćelija. Kod atopičnih osoba kao i kod onih kod kojih su učestale parazitske infekcije, nalazi se i veći broj ovih receptora prisutnih na efektorskim ćelijama, što pojačava njihovu osetljivost i olakšava njihovu aktivaciju malim dozama specifičnih antigena značajno povećavajući IgE-zavisno otpuštanje citokina i hemijskih medijatora zapaljenja. IgE receptor FcεRII, koji se označava i sa CD23, vezuje IgE molekule nižim afinitetom. CD23 nalazimo na površini različitih ćelija među kojima su B ćelije, aktivirane T ćelije, monociti, eozinofili, krvne pločice, folikularne dendritske ćelije i neke epitelne ćelije timusa [25, 35].

IgE zavisna alergijska reakcija se deli na ranu i kasnu fazu. Rana faza IgE-posredovane alergijske reakcije je trenutna reakcija koja započinje već kroz nekoliko sekundi, dok je kod reakcije kasne faze potrebno 8-12 sati da bi se ispoljila. Ova dva vida aktivacije mastocita se klinički jasno razlikuju. Trenutna reakcija je posledica aktivnosti histamina, prostanglandina i drugih medijatora koji su ili skladišteni u ćelijama, ili se sintetišu u kratkom vremenskom roku i dovode do povećane vaskularne propustljivosti i kontrakcije glatke muskulature. U trenutnom odgovoru prethodno formirani medijatori koji se otpuštaju degranulacijom su kratko živeći i njihovi efekti na krvne sudove i glatku muskulaturu bivaju ispoljeni samo u neposrednoj blizini aktiviranih mastocita.

Trenutna alergijska reakcija izazvana degranulacijom mastocita je često praćena daljim zapaljenjem koje se naziva reakcijom kasne faze, a efekti se ispoljavaju pre

svoga na mestu gde se prvobitno odigrala degranulacija mastocita [32, 34, 36].



Slika 2.1. Kako alergeni dovode do pojave alergijske reakcije? a) Senzitivizacija i memorija. Inicijalni kontakt alergena sa antigen prezentujućim ćelijama poput dendritičnih ćelija (DC). Interleukini (IL) 4 i IL-13 favorizuju preključivanje klasa imunoglobulina kod specifičnih B ćelija i proizvodnju IgE molekula (senzitivizacija). Senzitivizacija vodi ka uspostavljanju alergen-specifične IgE⁺ B i T-ćelijske memorije. Ponovljeni kontakt sa alergenom dovodi do pojačavanja IgE⁺ B-ćelijske memorije i povećane proizvodnje specifičnih IgE molekula. **b) Trenutna reakcija.** Ukršteno povezivanje IgE molekula koji se nalaze na površini efektorskih ćelija dovodi do oslobađanja biološki aktivnih medijatora (histamina, leukotrijena) degranulacijom i trenutnih simptoma alergije. **c) Kasna faza.** Do ove faze dolazi usled prezentovanja alergena T ćelijama koje postaju aktivirane, proliferišu i otpuštaju prozapaljenske citokine (kao što su IL-4, IL-5 i IL-13). Th2 citokini kao što je IL-5 mogu dovesti do eozinofilije otpuštanja medijatora zapaljenja od strane eozinofila. APC – antigen-prikazujuće ćelije, DC – dendritične ćelije, TCR – T ćelijski receptor. Preuzeto iz [34].

Slika 2.1. prikazuje korake u aktivaciji koji dovode do oslobađanja hemijskih medijatora koji dovode do alergijskih reakcija. Ova neželjena reakcija imunološkog sistema je povezana i sa prisustvom Th2 ćelija koje sekretuju imunološke medijatore poznate kao interleukini (IL)-4, IL-5 i IL-13 [34, 37, 38].

Reakcija kasne faze se takođe fokusira na primarno mesto aktivacije mastocita, a anatomska svojstva ovog mesta određuju kako će se reakcija razrešiti. Reakcija kasne faze (reakcija neosetljiva na prisustvo anihistaminika) nastaje usled sinteze i otpuštanja medijatora u koje ubrajamo leukotrijene, hemokine i citokine iz aktiviranih mastocita. Oni služe da privuku druge leukocite na zapaljensko mesto uključujući eozinofile i T limfocite označene kao pomoćničke T ćelije tipa 2 (Th2). Reakcija kasne faze lako prelazi u hronično oboljenje ukoliko antigen učestalo dospeva istim putem u organizam i nastavi da stimuliše antigen specifične Th2 ćelije koje favorizuju eozinofiliju i dalju pojačanu proizvodnju IgE molekula [32, 34, 36, 37].

Klinički simptomi alergijske reakcije pre svega zavise od količine prisutnog antigen specifičnog IgE molekula, puta kojim antigen dospeva u organizam i doze dospelog alergena. To mogu biti crvenilo i svrab, ali i anafilaksija. Ukoliko je alergen dospeo direktno u krvotok ili je apsorbovan putem gastrointestinalnog trakta (GIT-a) može dovesti do anafilakse jer rasprostranjena aktivacija mastocita nosi brojne potencijalno smrtonosne efekte poput povećane vaskularne propustljivosti koja dovodi do naglog pada krvnog pritiska, konstrikcije disajnih puteva, kao i otoka koji mogu prouzrokovati gušenje [23, 34, 37, 38]. O anafilaktičkom šoku će biti više reči u jednom od narednih odeljaka, jer ovaj fenomen treba posebno istaći.

2.1.2 Alergeni

Alergeni su najčešće proteini i glikoproteini koji izazivaju alergijsku reakciju. Mogu se opisati i klasifikovati na osnovu porekla, puta kojim dospevaju u organizam i prirode proteina [39, 40]. Ekstrakti koji se načelno koriste u kliničkoj praksi za testiranje pacijenata na alergije predstavljaju smeše različitih proteina [41-43].

Jedna od podela alergena je na:

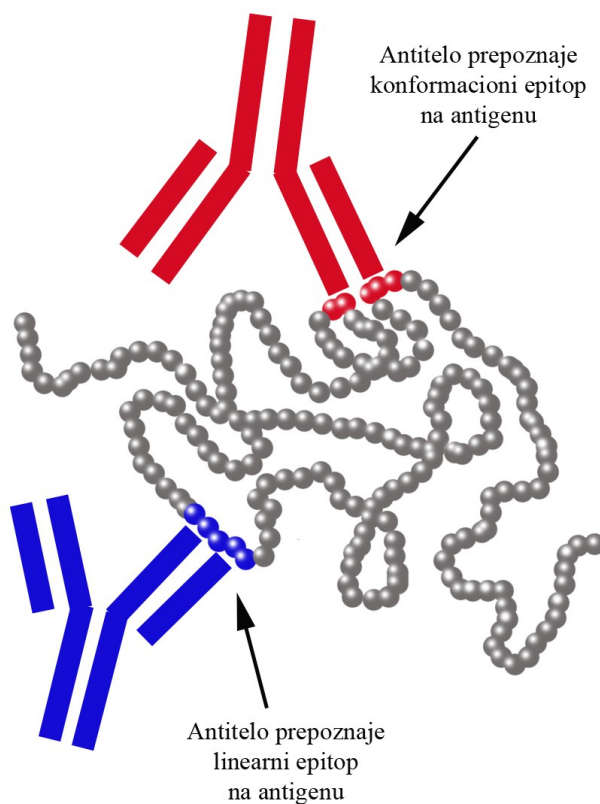
1. kućne alergene (alergeni grinja, kućnih životinja, bubašvaba i plesni),
2. alergene iz spoljašnje sredine (alergeni polena trava i drveća, spora plesni),
3. alergene hrane (alergene voća, povrća, orašastih plodova, mleka, jaja, morskih plodova i ribe), i na
4. alergene koji se unose injektovanjem (otrovi insekata i terapeutici poput penicilina) [40].

Više molekulskih formi istog alergena koje dele izrazitu alergenu (IgE) ukrštenu reaktivnost su definisani kao izoalergeni. Takođe se definišu i kao alergeni iz iste vrste koji dele sličnu molekulsku masu, identičnu biološku funkciju i bar 67% identičnosti u aminokiselinskoj sekvenciji [44, 45].

Otkako su osamdesetih godina 20. veka proizvedeni prvi rekombinantni alergeni, stotine alergena je identifikovano i određena je njihova aminokiselinska sekvencija, a formirane su brojne baze podataka koje sadrže molekulske, biohemijske i kliničke podatke o njima, a u koje spada i *Official List of Allergens issued by the International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Sub-committee* [12], *Allergome* [46], *Food Allergy Research and Resource Program Allergen* baza podataka [47] i *InFormAll* [48] baze podataka [39, 40]. Bazi podataka *AllFam* u kojoj se nalaze podaci iz više spojenih baza podataka (*Allergome database* i *Pfam database*) se slobodno može pristupiti [49] i u njoj se mogu naći podaci o pojedinačnim alergenima, kao i o proteinskim familijama kojim ovi alergeni pripadaju [39]. U većini ovih baza su podaci organizovani na osnovu izvora ili na osnovu načina kojim alergični pojedinci njima bivaju izloženi. Po nomenklaturi, alergeni se označavaju na osnovu izvora, i to sa prva tri slova roda kojem vrsta pripada, početnim slovom naziva vrste, i brojem koji se najčešće odnosi na redosled kojim je alergen iz tog izvora prepoznat i registrovan [40,

50].

Kada govorimo o alergenima, važno je pomenuti i pojam epitopa. Epitopi su strukture na alergenima koje bivaju specifično prepoznate od strane IgE molekula. Kod proteinskih alergena možemo govoriti o linearnim i o konformacionim epitopima [51], što je slikovito objašnjeno na slici 2.2.



Slika 2.2. Uprošćeni prikaz formiranja konformacionih i linearnih epitopa kod globularnih proteina (antigena). Kuglice predstavljaju uprošćeni prikaz aminokiselinskih ostataka u polipeptidnom nizu. Sive kuglice ne ulaze u sastav epitopa, crvene kuglice ulaze u sastav konformacionog epitopa, dok plave kuglice ulaze u sastav linearnog epitopa.

2.1.3 Pojam anafilaktičkog šoka

Iako se otkriće anafilaktičkog šoka vezuje za 20. vek i Šarla Rišea (*Charles Richet*) i Pola Portjea (*Paul Portier*) koji su eksperimentalno dokazali anafilaksu kod pasa, brojna druga otkrića su zapravo prethodila njihovom. Magendi (*Magendie*) je još 1839. godine pokazao iznenadnu smrt pasa nakon ponovljenog injektovanja uzoraka belanceta jajeta [52], kao što je i Fon Bering (*Von Behring*) zabeležio da su pojedini zamorci bili osetljiviji na ponovljeno u odnosu na inicijalno injektovanje toksina, a što je tada nazvao “paradoksalnom reakcijom na toksin” [14].

1902. godine su već pomenuti Šarl Riše i Pol Portje objavili kratak članak o kojem su diskutovali ispred pariskog udruženja biologa (*Paris “Societe de Biologie”*) gde je po prvi put uveden naziv anafilaktička reakcija, odnosno anafilaksija, a Riše je za ovo otkriće 1913. godine dobio Nobelovu nagradu. Oni su pokušali da imunizuju pse na ekstrakt morske sase aktinije (*Actinia tenebrosa*). Prilikom ponovljenog injektovanja male količine toksina, pas kojeg su koristili u eksperimentu je preminuo nakon 25 min. Otkriće da imunizacija ne dovodi isključivo do zaštite jedinke, već i do ozbiljnih negativnih posledica je ubrzo postalo poznato širom sveta [53]. Kasnije su Dejl (*Dale*) i Lajdlou (*Laidlow*) pokazali da tada novootkriveni histamin može dovesti do posledica koje su opisane u anafilaksi. Poznato je da je anafilaksija sistemska reakcija organizma i manifestuje se naglim padom krvnog pritiska i gušenjem, I koja zahteva brzu primenu odgovarajuće terapije. Tretman epinefrinom je jedan od adekvatnih tretmana za ovo životno ugrožavajuće stanje. Epinefrin je terapeutik koji se u svrhe tretmana anafilaktičkog šoka koristi već više od stoleća. U današnje vreme su za potrebe akutnog tretmana proizvedeni autoinjektorji epinefrina za individualnu upotrebu [54-57].

2.1.4. Alergije na hranu

Alergije na hranu predstavljaju neželjenu reakciju imunološkog sistema na antigene koji dospevaju u organizam oralnim putem. Rasprostranjene su širom sveta i, poput ostalih atopijskih poremećaja, pokazano je da je zastupljenost ovog poremećaja u

konstantnom porastu, pri čemu dovodi do akutnih i hroničnih problema kod pojedinaca [20, 56]. Alergija na hranu bitno utiče na kvalitet života i svakodnevicu, tako da se sve više pridaje značaj dijagnostici i tretmanima. Informisanost ne samo stručne već i šire javnosti je ključni faktor za blagovremenu dijagnostiku i terapiju alergijskih oboljenja [56, 58]. Do sada je registrovano preko 170 namirnica koje predstavljaju izvore alergena, a tretmani uključuju striktno izbegavanje konzumacije hrane koja je prepoznata kao uzročnik alergije. U terapijskom smislu dostupni su samo medikamenti koji se koriste za ublažavanje ili uklanjanje simptoma, ali ne i za uspostavljanje tolerancije imunološkog sistema [59].

Prevalencija za razvoj preosetljivosti na hranu je najveća u najranijim godinama života, afektujući oko 6% novorođenčadi mlađe od 3 godine, a zatim ovaj procent opada tokom prve dekade života [58, 60].

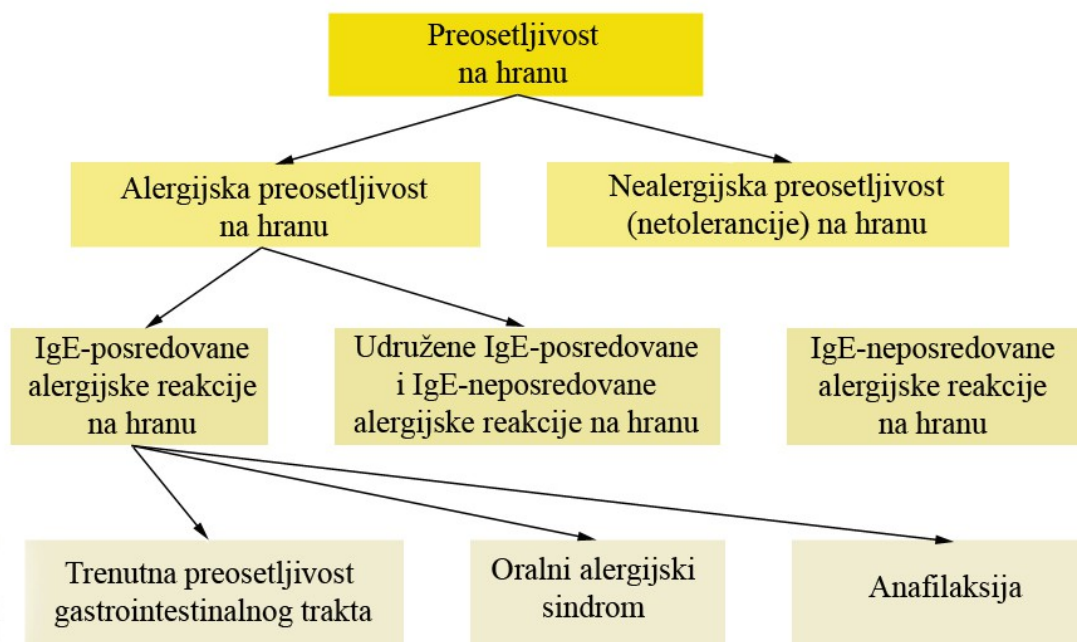
Neželjena reakcija na hranu može biti rezultat netolerancije (nealergijska preosetljivost na hranu) ili alergijske preosetljivosti na hranu. U osnovi alergije na hranu predstavljaju odgovor imunološkog sistema na hranu koji je štetan za jedinku, i sastoje se od poremećaja koji se javljaju nakon unošenja određenih antigena hrane [61]. Dele se na:

1. IgE-posredovane alergijske reakcije na hranu (smatraju se za alergijske reakcije na hranu u pravom smislu reči i, ukoliko nije naznačeno drugačije, prilikom pomena alergija na hranu misli se na ovaj vid reakcije),
2. udružene IgE-posredovane i IgE-neposredovane reakcije, i
3. IgE-neposredovane alergijske reakcije na hranu [61-63].

IgE-posredovane alergijske reakcije na hranu se dalje dele na trenutnu preosetljivost GIT-a, na OAS, i u retkim slučajevima na anafilaksu. OAS je vid IgE-posredovane alergijske reakcije koji se javlja prilikom kontakta alergena hrane i mukoznih površina u organizmu alergičnih osoba [63], dok je hranom izazvana anafilaksija sistemska alergijska reakcija koja otpočinje ubrzo i može izazvati fatalni ishod [55-58].

Imunološka reakcija na hranu koja nije posredovana IgE molekulima uključuje sindrome enteropatije, enterokolitisa i proktokolitisa koji su uzrokovani proteinima hrane. Ova stanja se prvenstveno javljaju kod novorođenčadi i mlađe dece, a

manifestuju se kao abdominalni problemi poput povraćanja, abdominalnih grčeva, dijareje i krvarenja. Kod odraslih akutni simptomi alergije na hranu se manifestuju obično 2 sata nakon unosa hrane ili izlaganja hrani i tipično je da zahvataju kožu, gastrointestinalni trakt i respiratorni trakt [62].



Slika 2.3. Shematski prikaz podele preosetljivosti na hranu.

U slučajevima kombinovane IgE posredovane i IgE neposredovane alergijske reakcije javljaju se još i eozinofilni ezofagitis i atopijski dermatitis [59]. Kada se govori o kombinaciji IgE-posredovanih i IgE neposredovanih alergijskih reakcija, smatra se da ova kombinacija uključuje eozinofilne gastroenteropatije: eozinofilni protokolitis, eozinofilni gastroenteritis i eozinofilni ezofagitis, a karakteriše ih prisustvo eozinofila u GIT-u bez prisustva drugih ćelija učesnika u inflamaciji [63].

Netolerancija na hranu koja predstavlja nealergijsku preosetljivost je neželjeni odgovor prouzrokovan specifičnim fiziološkim karakteristikama domaćina, kao što su

metabolički poremećaji (npr. deficijencija laktaze) [58].

Konzumiranje hrane koja sadrži toksične supstance može dati lažnu sliku o preosetljivosti. Primer su kontaminacije toksinima poput tiramina u starom siru, koje uzrokuju neželjene reakcije kod zdravih osoba [58].

Takođe, postoje i averzije ka određenoj hrani koje nalikuju neželjenoj reakciji i alergiji, međutim, ove reakcije ne bivaju ispoljene kada pacijenti konzumiraju tu istu hranu, a pritom nemaju vizuelni doživljaj vezan za to koju hranu konzumiraju i zato ih ne treba poistovećivati sa alergijskim reakcijama.

Tabela 2.1. Klasifikacija alergije na hranu [64].

Tip alergijske reakcije	Primeri kako se manifestuju
IgE-posredovana	Anafilaksija, polen-hrana alergijski sindrom, kontaktno crvenilo
IgE-neposredovana	Enterokolitis uzrokovan proteinima hrane, proktokolitis uzrokovan proteinima hrane
Kombinacija IgE-posredovane i IgE- neposredovane	Eozinofilni ezofagitis

2.1.5 Nastanak IgE-posredovane alergije na hranu

Za razliku od sistemskog imunološkog sistema koji se uglavnom susreće sa relativno malim količinama antigena i proizvodi jak imuni odgovor, mukozni imuni sistem se susreće sa enormnim količinama antigena svakodnevno, i generalno suprimira imunološku aktivnost na bezopasne strane antigene kao što su proteini hrane i antigeni komensalnih mikroorganizama. Gastrointestinalna mukozna barijera predstavlja složenu strukturu velike površine za procesovanje i apsorbovanje unesene hrane, kao i izbacivanje nepotrebnih proizvoda [58]. Ova barijera koristi fiziko-hemijske i ćelijske faktore da bi sprečila prolazak stranih antigena. Fizička barijera je sačinjena od epitelnih ćelija koje su spojene čvrstim vezama i prekrivene debelim slojem mukusa koji ima

funkciju da zarobljava bakterije, viruse, razne čestice; faktore koji pomažu jačanje i obnavljanje ove barijere, kao i enzime lumena i četkaste ivice koji služe za uništavanje patogena i čine antigene neimunogenim. Komponente urođenog (NK ćelije, polimorfonuklearni leukociti, makrofagi, epitelne ćelije i *Toll-like* receptori) i adaptivnog (intraepitelijalni i leukociti iz lamine propije, Pejerove ploče, sIgA i citokini) imunološkog odgovora predstavljaju aktivnu barijeru za strane antigene. Kod dece je ova gastrointestinalna barijera još uvek nedovoljno razvijena i nedovoljno efikasna [65].

U elegantnoj seriji eksperimenata su dvadesetih godina prošlog veka Valcer (*Walzer*) i saradnici koristeći serume pacijenata alergičnih na hranu pasivno senzitsali dobrovoljce i pokazali da imunološki intaktni antigeni prolaze mukoznu barijeru i brzo se raznose kroz organizam [66]. Uprkos razvijenosti ove složene mukozne barijere, oko 2% unesenih antigena hrane se apsorbuje i transportuje dalje kroz organizam u imunološki intaktnoj formi, čak i nakon prolaska kroz zdrav i dobro razvijen GIT [67]. Premda ovi intaktni antigeni prolaze kroz barijeru GIT-a, oni i dalje retko indukuju kliničke simptome alergije jer većina zdravih individua razvija toleranciju, što su Husbi (*Husby*) i saradnici eksperimentalno pokazali [68].

Senzitizacija na alergene hrane se odvija unutar GIT-a (tradicionalna ili alergija na hranu klase 1) ili kao posledica senzitanosti na inhalatorne alergene (alergija na hranu klase 2) [69]. Preosetljivost na hranu se razvija kod osoba sa genetskom predispozicijom [70], najverovatnije u momentu kada izostane ili bude narušena oralna tolerancija. Alergijska senzitizacija na hranu nastaje kada IgE molekuli koji specifično prepoznaju antigene hrane bivaju produkovani od strane plazma ćelije koja je potomak alergenspecifične B ćelije [58]. Nastala specifična IgE antitela se vezuju za površinu mastocita u tkivima i krvnih bazofila i prilikom ponovnog izlaganja toj hrani, proteini hrane (alergeni) se vezuju i unakrsno povezuju specifična IgE antitela na efektorkim ćelijama, a to dalje dovodi do oslobađanja medijatora kao što su histamin i leukotrijeni koji dovode do nastanka karakterističnih simptoma [59].

2.1.6. Alergeni hrane

Do sada je identifikovan i okarakterisan veliki broj molekula hrane koji imaju sposobnost da izazovu alergijske simptome kod ljudi. Alergeni hrane su obično proteini i glikoproteini, ali mogu biti i hapteni (konzervansi, pesticidi, pojačivači ukusa) [38, 39, 71].

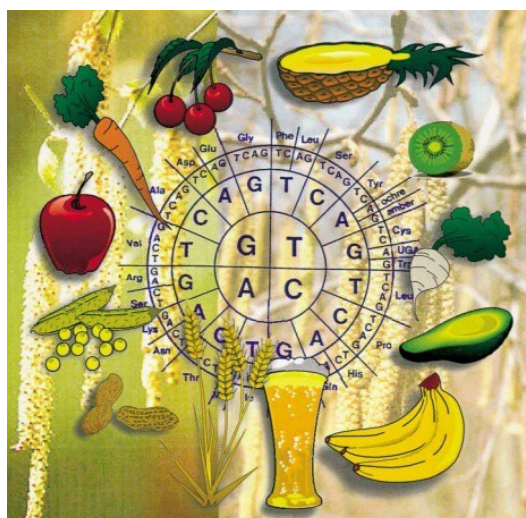
Značaj poznavanja svojstava alergena hrane, njihovih trodimenzionalnih struktura, biološke aktivnosti i stabilnosti doprinosi unapređenju dijagnostike alergije na hranu, izuzimanju nepotrebne restriktione dijete, svesti o riziku prisustva ukrštene reaktivnosti sa alergenima iz drugih izvora [71] i unapređenju pristupanja eventualnim rizicima ukrštene reaktivnosti sa alergenima iz drugih izvora [72]. Pod karakteristikama alergena hrane pre svega se misli na njihovu zastupljenost u hrani, prisustvo ponavljajućih epitopa na njihovoj površini, kao i otpornost ka enzimima GIT-a i pripremu (obradu) hrane [63].

Pored toga što je registrovan veliki broj alergena, oni se ipak mogu svrstati u ograničen broj proteinskih familija. Nekoliko proteinskih familija i superfamilija dominira među alergenima poreklom iz biljne hrane. Superfamilija prolamina, kupinska superfamilija, Bet v 1 proteinska familija i profilini čine oko 65% svih do sada registrovanih alergena iz namirnica biljnog porekla, a važno je i pomenuti PR (eng. *patogenensis-related*) proteine [39, 63], gde se posebno izdvaja PR-10 grupa proteina. Kada govorimo o alergenima hrane životinjskog porekla nađena je slična distribucija na osnovu koje se alergeni hrane životinjskog porekla većinom svrstavaju u familije tropomiozina, parvalbumina i kazeina [73]. Radauer i saradnici su pokazali da postoji najmanje 29 različitih proteinskih familija koje sadže više od jednog alergena hrane koji se svrstava u tu familiju [39].

Aditivi hrane i boje koje sadrže proteine (npr. želatin) mogu takođe dovesti do alergijske reakcije. Hemijski aditivi poput veštačkih aroma (npr. tetrazin) i konzervansi (npr. glutamati i sulfiti) mogu dovesti do neželjenih reakcija, ali nije primećen imunološki mehanizam u tim slučajevima i stoga se takve reakcije klasifikuju kao netolerancija [59].

Alergijska reakcija na određene antigene iz hrane može biti posledica ukrštene

reaktivnosti, odnosno prethodne senzitivizacije na alergen iz drugog izvora. Ukrštena reaktivnost alergena hrane sa drugim alergenima je posledica sličnosti u strukturi i aminokiselinskoj sekvenci sa drugim alergenima hrane ili aeroalergenima. Verovatnoća pojave klinički relevantne alergijske reakcije na ukršteno reaktivne alergene je različita [59]. Iako strukturne sličnosti mogu predstavljati objašnjenje IgE ukrštene reaktivnosti između alergena iz različitih namirnica, do sada nije otkriveno zajedničko svojstvo koje dele svi poznati alergeni. Ovi pristupi su uspevali da ukažu na potencijalnu alergenost proteina kada bi potvrdili da ovi proteini dele sličnosti u aminokiselinskoj sekvenci i/ili trodimenzionalnoj strukturi determinanata koje nalazimo kod poznatih alergena, ali još uvek nije pronađen metod koji bi sa sigurnošću predviđao alergenost samu po sebi kada su u pitanju novootkriveni proteini [71].



Slika 2.4. Biljne namirnice koje su izvori ukršteno reaktivnih alergena hrane.

Simboličan prikaz genetskog koda kojim se ukauje na homologiju u DNK zapisu za ukršteno reaktivne alergene [74].

Većina alergena hrane može izazvati kliničke simptome alergijske reakcije kada se hrana unosi bilo sveža ili termički obrađena. Alergeni poreklom iz voća i povrća dovode do alergijskih reakcija najčešće ukoliko se unesu termički netretirani. Kod alergena hrane se često uočava i opstajanje proteina prilikom prerade hrane i varenja u

GIT-u. Jedno od značajnih strukturnih svojstava proteina koje je povezano sa njihovom stabilnošću je prisustvo disulfidnih veza. Bez obzira na to da li se radi o intralančanim ili interlančanim disulfidnim vezama, one stabilizuju trodimenzionalnu strukturu proteina i često omogućavaju veću otpornost proteina na strukturne perturbacije prilikom termičkog tretmana. Primećeno je da brojni alergeni hrane sadrže višestruke disulfidne mostove, poput članova prolaminske superfamilije proteina [74].

Vanćelijski proteini, uključujući i brojne alergene hrane, podležu glikozilovanju prilikom prolaska kroz endoplazmatični retikulum. Klinički značaj IgE antitela specifičnih za ugljenohidratnu komponentu glikoproteina jeste tema o kojoj se diskutuje otkako je otkriven N-glikan-specifični IgE usled činjenice da može doprineti ukrštenoj reaktivnosti alergena polena i biljnih namirnica [75]. Ugljenohidratna komponenta takođe utiče na stabilizaciju proteinske strukture i na otpornost na denaturaciju [76].

Prisustvo ponavljajućih struktura i sklonost agregaciji, bilo u fiziološkim uslovima ili prilikom tretmana hrane može uticati na senzitivizaciju i pojačanu imunogenost, kao i pojačani potencijal za oslobađanje histamina iz mastocita [74].

Baze podataka koje su dostupne na internetu omogućavaju pretraživanje alergena poreklom iz hrane. IUIS baza podataka daje podatke o preciznoj i nedvosmislenoj nomenklaturi alergena, kao i dokaze o njihovoj IgE reaktivnosti [40].

Druge baze podataka mogu biti vezane za kliničke podatke o reaktivnosti alergena hrane kao što je *InformAll* [77]. Prilikom pretraživanja je važno obratiti pažnju na to da postoje i baze poput *Allergom* [46] baze podataka koje sadrže neregulirane podatke [71]. Analizom podataka upravo iz ovakvih baza se stekao uvid u to da proteini sa alergenim potencijalom uglavnom pripadaju manjem broju proteinskih familija [39, 73, 74].

Tabela 2.3. Prikaz i podela alergena hrane biljnog i životinjskog porekla [71].

Proteinska familija		Funkcija	Molekulska masa (kDa)	Poreklo alergena
Alergeni hrane biljnog porekla				
Prolaminska superfamilija	Prolamini	Rezervni proteini semenki	65	žitarice
	2S albumini	Rezervni proteini semenki	15-17	kikiriki, koštuničavo voće, senf
	Nespecifični LTP	Odbrambena i transportna	7-9	sva biljna hrana, lateks
	Bifunkcionalni α -amilazni/proteazni inhibitori	Proteazni inhibitori	15-16	žitarice
Kupinska superfamilija	7/8S globulini	Rezervni proteini semenki	150-190	leguminoze, semenke, koštuničavo voće
	11S globulini	Rezervni proteini semenki	60	kikiriki, koštuničavo voće
Profilin		Aktin vezujuća regulatorna	14	sva biljna hrana, lateks
Proteini srodni Bet v 1 (PR-10)		Odbrambena, transfer steroida	17	sva biljna hrana
Oleozini		Stabilizuju lipidna tela	14-17	leguminoze, semenke, koštuničavo voće
Endohitinaze		Odbrambena, hidroliza hitina	25-35	banana, avokado, kesten, lateks
β-1,3-glukanaze		Odbrambena	25-35	banana, avokado, kesten, lateks
Proteini slični taumatinu		Odbrambena	20-30	banana, kivi, grožđe, citrusi
Alergeni hrane životinjskog porekla				
Tropomiozini		Regulišu kontrakciju mišića	36-38	ljuskari, mekušci
Parvalbumini		Ca ²⁺ vezujući	12	ribe, vodozemci
Kazeini		Ca ²⁺ vezujući	20-30	kravlje, kozje i ovčije mleko
β-laktoglobulini		Nosači malih molekula	18	mleko
Lizosomalna/α-laktoglobulinska familija		Sinteza laktoze	14	kravlje mleko, kokošije jaje
Serin-proteazni inhibitori		Proteazni inhibitori	28	kokošije jaje
Serpini		Proteazni inhibitori	44	kokošije jaje
Transferini		Transport gvožđa	67-69	kravlje mleko, kokošije jaje

2.2 Banana (*Musa acuminata*)

Banana (*M. acuminata*) je voće koje poseduje visoku nutritivnu vrednost, prijatnog je ukusa, niske cene na tržištu i konzumira se širom sveta. Proizvodi se u Aziji, Centralnoj i Južnoj Americi i u Africi. Banana koja se danas nalazi na tržištu je diploidna ili triploidna biljka dobijena ukrštanjem dve vrste poreklom iz Jugoistočne Azije, *M. acuminata* i *M. balbisiana*. Poreklo banane se vezuje za jugoistočni deo azijskog kontinenta, odnosno Kinu i džungle Malezije, Indonezije i Filipina gde i danas možemo naći brojne divlje varijetete banane. Naziv je afričkog porekla s obzirom da *banan* na arapskom znači prst. Čak je i ime roda (*Musa*) ove biljke poreklom iz arapskog i potiče od reči biljka (*mouz*) [78, 79].

U mnogim zemljama u razvoju banana je najvažniji usev nakon pirinča, pšenice i kukuruza [80]. U više od 150 zemalja se proizvodi oko 105 miliona tona ovog voća na godišnjem nivou. Procenjeno je da se od te ukupne količine 43 miliona odnosi na proizvodnju dezertne banane, što ima veliki uticaj na svetsku ekonomiju. Pored dezertne banane koja se može konzumirati bez ikakve obrade, oko 45 miliona tona proizvedene banane se mora termički obraditi pre konzumacije i među njima su najpopularniji plantani [80].

U pojedinim zemljama u razvoju konzumacija banane dostiže čak 21 kg po osobi na godišnjem nivou, gde ovo voće ne predstavlja samo izvor energije već i izuzetno važan izvor nutrijenata [81]. Pored prijatnog ukusa, banana sadrži mnoštvo korisnih nutrijenata poput bioaktivnih amina (dopamin i serotonin), antioksidanasa (beta karotena i vitamina C i E), flavonoida (katehina i indolnih alkaloida), vitamina K, vitamina B₆, kao i ugljenih hidrata (prostih i složenih). Predstavlja i dobar izvor minerala, pre svega kalijuma, bakra, magnezijuma i mangana [81-85].

Ova tropska biljka je sposobna da se izbori sa oksidativnim stresom izazvanim jakim sunčevim zračenjem i visokim temperaturama zahvaljujući visokom sadržaju antioksidanasa [86]. Pored toga što sadrži brojne već pomenute antioksidanse, banana sadrži i enzime koji takođe doprinose njenom antioksidativnom kapacitetu [87]. Pokazano je da antioksidativna aktivnost banane zavisi od varijeteta i stadijuma zrenja [88, 89], a da zrenje dovodi do promena u antioksidativnom kapacitetu kao i u

hemijskom i nutritivnom sastavu [90].

2.2.1. Alergija na bananu i alergeni banane

Smatra se da banana ima nizak alergeni potencijal, što je jedan od razloga zašto se često uvodi u ishranu novorođenčadi [7]. Međutim, kod pojedinih osoba banana izaziva i neželjene reakcije. To su najčešće blagi i lokalni simptomi alergije kao što je OAS koji se odigrava u ustima i ždreću, ali u retkim slušajevima dovodi i do anafilaktičkog šoka [91, 92]. Jedna od prvih publikacija koja se odnosila na alergene prisutne u voću, uključujući i bananu, je vezana za alergen mase 30 kDa i kliničku sliku rinitisa i OAS-a kod pacijenata koji su se javili nakon ingestije banane i drugog voća [93]. To je potvrdilo činjenice koje su 1970. godine objavili Anderson i njegovi saradnici [94]. Pomenuta publikacija je ukazala na povezanost polinoze izazvane polenom ambrozije i alergijske reakcije na ingestiju banane. Godinama nakon toga su kliničke manifestacije alergije na bananu uglavnom karakterisane blagim simptomima, dok su 1991. godine po prvi put opisani simptomi angioedema i anafilaktičkog šoka izazvani konzumiranjem banane [95]. Danas se zna da se ovi veoma ozbiljni simptomi izazvani konzumiranjem banane ne smeju zanemarivati [91, 92, 95].

U Japanu je najučestalija alergija na voće alergija na kivi, a odmah zatim sledi učestalost alergije na bananu [96]. Anafilaktičke reakcije koje su posledica konzumacije voća su postale uobičajna pojava u kliničkoj praksi i uobičajen savet alergičnim pacijentima je prepisivanje dijeta koje izuzima konzumaciju i drugih namirnica koje potencijalno sadrže ukršteno-reaktivne antigene. Pacijenti takođe dobijaju savete za nošenje pribora za hitnu i brzu intervenciju u kojima se nalaze epinefrin, antihistaminici i kortikosteroidi [92].

S obzirom na to da se radi o hrani koja se rano uvodi u ishranu, postoji opasnost da banana postane važan uzročnik anafilakse kod novorođenčadi. Postoje brojni registrovani slučajevi alergijskih reakcija na bananu kod beba starosti 5-7 meseci. Neki od registrovanih slučajeva su uključivali samo koprivnjaču [7, 97-99], dok su se neki odnosili i na anafilaksu kod beba [7, 97, 100]. S obzirom na to da anafilaksija kod

novorođenčadi biva učestalija, banana bi se mogla posmatrati kao njen važan uzročnik koji se najčešće unosi sirov i industrijski neobrađen. Opisan je i slučaj četvoromesečnog dečaka koji je prilikom konzumacije banane dobio simptome povraćanja, koprivnjače i cijanoze, iako je to bila prva konzumacija banane u životu tog dečaka, nakon čega su kožne probe (SPT) koje je izvelo stručno medicinsko osoblje dale pozitivne rezultate na svežu bananu i na ekstrakt banane [7].

Alergijska reakcija na bananu može biti izazvana i prilikom konzumiranja dečjih lekova sa ukusom banane. Metju (*Matheu*) i saradnici su zabeležili slučaj u kojem je osmogodišnja pacijentkinja doživela alergijsku reakciju pošto je primila dozu od 250 mg *Penilevel* leka (*Laboratorios ERN SA*, Barselona, Španija) koji sadrži fenoksi-metilpenicilin u kombinaciji sa ekstraktom banane koji je dodat kao aditiv za poboljšanje ukusa. Nakon tretmana antihistaminicima je alergijska reakcija uklonjena. U ovom slučaju je bilo zanimljivo da je SPT komercijalno dostupnim reagensom za dijagnostiku alergije na bananu dao negativne rezultate, dok su kožne probe sa svežim voćem (tzv. prik-prik test) dale pozitivnu reakciju na koži sa radijusom od 11×7 mm, a količina ukupnog sadržaja IgE molekula u serumu je iznosila 71,7 kU/L, a IgE molekula specifičnog na alergene banane 1,25 kU/L. Reakcija na sve ostale komponente leka je bila negativna. Ovo je primer angioedema i koprivnjače koji se javljaju nakon konzumacije leka sa ukusom banane. Nije redak slučaj da se voćni ekstrakti dodaju dečijim lekovima u cilju poboljšanja ukusa [101].

Kao i brojno drugo voće banana sadrži i alergene koji dovode do preosetljivosti kod ljudi, a mogu dovesti i do „lateks-voće“ i „voće-polen“ sindroma koji su posledica ukrštene reaktivnosti [99, 102, 103]. Za ukrštenu reaktivnost koja se javlja kod alergena koji potiču iz evolutivno udaljenih botaničkih familija odgovoran je visok stepen homologije koju nalazimo u alergenima iz različitih izvora [92]. Lateks-voće sindrom se takođe može javiti kao vid trenutne alergijske reakcije koji uključuje koprivnjaču, astmu i ozbiljne anafilaktičke reakcije sa potencijalno fatalnim ishodom [96].

Zarad poboljšanja prevencije potencijalne ingestije banane od strane alergičnih pojedinaca potrebne su specifične i osetljive metode koje mogu da detektuju tragove prisutnih alergena u procesovanoj hrani. Metode koje se baziraju na upotrebi PCR-a su već uspostavljene za detekciju alergena iz pšenice, heljde, kikirikija, soje, oraha,

svinjetine, kivija i banane [96]. Do sada je registrovano šest proteina uzročnika alergijske reakcije na bananu [12]. Pregled ovih alergena se nalazi u tabeli 2.4.

Tabela 2.4. Registrovani alergeni banane [12]:

<i>Alergen</i>	<i>Biohemijski naziv</i>	<i>Molekulska masa (kDa) (SDS PAGE)</i>
Mus a 1	Profilin	15
Mus a 2	Hitinaza klase I	33
Mus a 3	Nespecifični protein za prenos lipida (nsLTP)	9
Mus a 4	Protein sličan taumatinu (TLP)	20
Mus a 5	β -1,3-glukanaza	33
Mus a 6	Askorbat peroksidaza	27

U banani, ali i u drugom voću i povrću sa visokim sadržajem vode kao što su trešnje, višnje, papaja ili avokado i koje su zbog toga podložne gljivičnim infekcijama hitinaze, proteaze i antifungalni proteini predstavljaju dominantne alergene. Pomenuti proteini jesu zapravo proteini povezani sa patogenošću (PR proteini) čija se ekspresija indukuje patogenima, ranjavanjem biljke ili određenim stresom iz spoljne sredine [69].

2.2.1.1 Profilin iz banane

Profilin, odnosno Mus a 1 je prvi registrovan alergen banane, pa je odatle **Mus(a) a(cuminata) 1**, pri čemu je 1 redni broj pod kojim je protein unesen u WHO/IUIS bazu podataka [12]. Profilin (12-15 kDa) je panalergen koji se nalazi u svim eukariotskim ćelijama i jedan je od glavnih izazivača ukrštene reaktivnosti polena i plodova biljaka. Asero (*Asero*) i saradnici su 2008. godine u svojim eksperimentima zasnovanim na SPT pokazali da profilin treba smatrati klinički značajnim alergenom hrane. Alergije na dinju, lubenicu, paradajz, bananu, ananas, i narandžu mogu biti izazvane preosetljivošću upravo na profilin [104, 105].

Profilini pokazuju ukrštenu reaktivnost i oko 20% pacijenata alergičnih na biljke ima specifični IgE na profilin. Ukrštena reaktivnost alergena je posledica svojstava IgE antitela da prepoznaju strukturno slične epitope na različitim proteinima koji su obično

filogenetski srodni ili predstavljaju evolutivno konzervirane strukture. Kao posledica ukrštene reaktivnosti se javlja preosetljivost na određene alergene bez prethodne senzitivacije na taj konkretni alergen [106, 107]. Istraživanja su pokazala da reaktivnost humanih IgE antitela na profiline u mnogome zavisi od konzerviranih konformacionih struktura, što je zaključeno nakon upoređivanja sekvenci profilina iz različitih izvora, uključujući i profiline banane [107, 108]. Postoji mala sličnost u sekvenciji profilina poreklom iz nižih eukariota, biljaka i životinja, dok biljni profilini međusobno dele oko 75% identičnosti u sekvenciji. Svi do sada poznati profilini imaju kompaktnu globularnu strukturu sa glavnim motivom izgrađenim od antiparalelnih β -pločica koje su međusobno povezane preko N- i C- terminalnih α -heliksa sa jedne strane i jednog ili dva heliksa sa druge strane [39, 108].



Slika 2.5. Struktura profilina banane. Preuzeto iz [116].

Za razliku od nsLTP (o kojem će kasnije biti reči), profilini se denaturišu toplotom i podložni su digestiji u GIT-u, tako da se smatra da nisu u stanju da izazovu senzitivaciju preko gastrointestinalnog trakta [74, 110].

Profilini se ubrajaju u PR (eng. *pathogenesis related*) proteine koji se načelno gledano pojačano eksprimiraju u biljnom tkivu pri kontaktu sa patogenima ili prilikom izlaganja abiotičkom stresu [111]. Interesantno je da brojni proteini koji se ubrajaju u alergene pripadaju PR proteinima, a tu ubrajamo pre svega profiline, hitinaze, β -glukanaze i proteine slične taumatinu [112-115].

Korišćenjem informacije o sekvenciji proteina iz Uniprot baze podataka [116] i

programa dostupnih na internetu smo odredili signalnu sekvenciju ove ukupne sekvencije od 131 aminokiselinskih ostataka, i to je prvih 35 aminokiselinskih ostataka. To je deo sekvence koji ne ulazi u sastav zrelog alergena [117] tako da smo taj deo sekvencije izuzeli prilikom *Blast* analize.

Kada se uradi *Blast* analiza u okviru *Uniprot* baze podataka, uočavamo pre svega sličnosti u sekvenci sa ostalim profilinima koji se nalaze u vrstama roda *Musa*, ali i profilinima drugog voća kao što su profilini kokosa 85%, grožđa 84%, zatim kukuruza 82% i lateksa 83%. U za sada dostupnoj literaturi ne postoje podaci o IgE vezujućim epitopima, ali je programima dostupnim na Internetu moguće odrediti teorijske linearne epitope zahvaljujući podacima iz IEDB baze podataka. Potencijalni linearni IgE vezujući epitopi su ³⁰GSVWAQSDAFPQCKPEE⁴⁶, ⁵⁴FDEPGSLAP⁶², ⁷⁷GEPGAVIRGKKKSGGGVTI⁹⁴ i ¹⁰⁸EPMTPGQ¹¹⁴ [118].

2.2.1.2 Hitinaza iz banane (klasa I)

Hitinaza klase I se smatra glavnim alergenom banane, odnosno najučestalijim uzročnikom alergijske reakcije na bananu [106, 119]. U okviru WHO/IUIS baze podataka se hitinaza klase I nalazi označena kao Mus a 2 [12].

Hitinaze (MM 25-35 kDa, E.C. 3.2.1.14) su široko zastupljene u biljnom svetu. Skoro sve biljne hitinaze koje su do sada izolovane jesu endohitinaze i hidrolizuju hitin koji predstavlja strukturnu komponentu egzoskeleta insekata i ćelijskog zida mnogih gljiva. Iz tog razloga se hitinaze smatraju delom odbrambenog sistema biljaka od patogena i hitinaza klase I iz banane pripada PR-3 klasi PR proteina [102].

Poseduju hitin-vezujući domen koji se takođe naziva i domen sličan haveinu. Domen sličan haveinu je karakteristika svih proteina koji pripadaju ovoj familiji, sadrži brojne cisteinske ostatke, sačinjen je od oko 40 aminokiselinskih ostataka i nalazi se na N-terminusu proteina [120, 121]. Pokazano je da je upravo domen sličan haveinu determinanta odgovorna za ukrštenu reaktivnost između haveina iz lateksa (Hev b 6) i alergena iz avokada (Pers a 1), kestena (Cas s 5), grožđa (Vit v 5) i banane (Mus a 2), i samim tim doprinosi pojavi lateks-voće sindroma [106, 122, 123], dok je pokazano je da

katalitički domen hitinaze klase I nema ili pokazuje nizak IgE vezujući afinitet. Alergije na bananu, avokado, kesten i kivi su detektovane kod 30-70% pacijenata alergičnih na lateks [123, 124]. Kod lateksa, havein (Hev b 6.02) nastaje sazrevanjem prohaveina (Hev b 6.01), i deli veliku homologiju u sekvenci sa PR-3 i PR-4 proteinima [69, 125].

Kompletna sekvencija Mus a 2 je sačinjena od 317 ak, dok je sekvencija zrelog proteina zapravo 299 ak. Sadrži jedan domen za vezivanje hitina tipa 1, dok od posttranslacionih modifikacija sadrži jedan disulfidni most [116].

BLAST analizom uočavamo najveću sličnost u sekvenci ovog proteina sa proteinima koje nalazimo u rodu *Musa*. Najveća sličnost hitinaze klase I banane je 82-95% u aminokiselinskoj sekvenci sa hitinazom klase I iz avokada, pšenice 78-79%, i 75-76% sličnosti sa hitinazom iz kukuruza [116].

Istraživanja na polju proteomike su pokazala da su hitinaze najzastupljeniji proteini u pulpi nezrele banane, a čak je identifikovano 11 izoformi kisele hitinaze klase III (30 kDa) [126]. Tokom zrenja se smanjuje ekspresija hitinaze klase III i raste nivo ekspresije hitinaze klase I (31 kDa), pre svega u pulpi [127, 128].

Pokazano je da se u pulpi zrele banane mogu pronaći bar dve izoforme hitinaze klase I koje dele veliki stepen homologije sa haveinom [106].

		% Identity to	
		Hev b 6.02	Hev b 11-HLD
Hev b 6.02	-EQ C GRQAGGK L CPNN L CC S QWGW C GSTDEY C SPDH N C Q S-N C KD--	100	68
Hev b 11-HLD	-EQ C GRQAGG A L C PGG L CC S QY G W C ANTPEY C GS G -- C Q S - Q CDGGG	68	100
Mus a 2-HLD	-EQ C GRQAGG A L C PGG L CC S QY G W C GN T DPY C GQ G -- C Q S - Q CGGSG	71	86
Pers a 1-HLD	-EQ C GRQAGG A L C PGG L CC S Q F GW C G S TSDY C GP T -- C Q S - Q CGGVT	73	77
Tri a 18 domain 1	-QR C GE Q GSN M E C PNN L CC S QY G Y C GMGGDY C GK G -- C Q N G A C W T--	49	51
Tri a 18 domain 2	SKR C GSQAGG A T C TNN Q CC S QY G Y C GF G AEY C G A G-- C Q G GP C R A --	54	56
Tri a 18 domain 3	DIK C GSQAGG K L C PNN L CC S QW G F C GLGSE F CGG G -- C Q S G A C S T--	66	59
Tri a 18 domain 4	DKP C GKDAGGR V C TNNY C CSKW G S C GIGPGY C G A G-- C Q S GG C D G --	51	54

Slika 2.6. Usporedna analiza sekvence haveina i haveinu sličnog domena (HLD). Poređenje sekvenci; sivo - delovi sekvence koji su identični delovima sekvence u haveinu; podebljano - konzervirani cisteinski ostaci, crtice – delovi gde je izuzeta sekvencija [124].

Mus a 2-HLD



Slika 2.7. Mapirani konzervirani ostataci zajednički za havein i Mus a 2 na površini Mus a 2 su crno obojeni [124].

U poznatoj literaturi do sada nije pokazano da je rađeno eksperimentalno određivanje IgE vezujućih epitopa hitinaze iz banane. Kada se uradi *in silico* predviđanje linearnih epitopa hitinaze klase I za izoformu Q8VXF0 iz banane dobijaju se podaci o 11 potencijalnih IgE vezujućih epitopa [118, 129].

2.2.1.3 Nespecifični protein za prenos lipida iz banane

U okviru WHO/IUIS [12] baze podataka o alergenima sa Mus a 3 je označen nespecifični protein za prenos lipida (nsLTP). nsLTP je učestali alergen kada su u pitanju alergije na hranu [12]. Najčešće se spominje u kontekstu alergije na breskvu, ali je takođe učestala i ukrštena reaktivnost nsLTP-a iz breskve sa nsLTP iz drugih izvora među kojima je i banana [104]. Pored alergija na hranu, oni se vezuju i za alergije na polen [130].

nsLTP su izuzetno stabilni proteini tokom termičkog procesovanja i digestije što ih čini potentnim alergenima hrane koji mogu izazvati sistemsku reakciju nakon ingestije. Tipična struktura nsLTP molekula sadrži četiri disulfidna mosta za koje se smatra da doprinose njihovoj sveukupnoj stabilnosti i otpornosti na delovanje hidrolitičkih enzima GIT-a, kao i na termalnu denaturaciju [131]. Profilin banane pripada PR-14 familiji proteina čija je karakteristika da poseduju centralni hidrofobni

tunel sačinjen od četiri α -heliksa stabilizovana sa četiri disulfidna mosta i koji interaguje sa lipidnim molekulima [108]. Učestvuju u odbrani biljaka od bakterija, gljiva, kao i faktora sredine poput suše, prekomerne toplote, hladnoće ili prevelike koncentracije soli [132, 133]. Uključeni su u formiranje kutikula i odbranu od patogena koji mogu biti prisutni u voću, povrću i koštuničavim plodovima [105]; omogućava transfer različitih vrsta lipida kroz ćelijsku membranu [115, 134], kao i izgradnju kutina, gde prenosi monomere neophodne za izgradnju ćelijskog zida [135, 136]. Time nsLTP molekuli učestvuju u brojnim fiziološkim procesima poput rasta, razvoja, embriogeneze i germinacije [137].

S obzirom na to da su nsLTP široko rasprostranjeni biljni proteini sa konzerviranim aminokiselinskim sekvencijama, istraživanja su pokazala imunološku ukrštenu reaktivnost između nsLTP-ova iz različitih biljnih vrsta. Ovaj protein je najčešće povezan sa alergijskim reakcijama na biljke iz familije *Rosaceae* u koje ubrajamo breskve, jabuke i kajsije, dok se daleko ređe vezuje za bananu. Oni su daleko zastupljeniji u kori plodova nego u pulpi, tako da se ljuštenjem voća i povrća zapravo uklanja najveći deo ovog alergena [138, 139].

Kompletna sekvencija LTP-ja banane se sastoji iz 114 ak, a molekulska masa proteina je 12,244 kDa. Signalni peptid je izgrađen od 1-24 ak [140].

Kada se uradi Blast na istoj stranici možemo uvideti najveća poklapanja u sekvenci ovog proteina sa LTP-om iz divlje banane 100%, LTP-om iz pirinča 54% i sa LTP iz drugih vrsta ispod 50% [116]. Određivanjem linearnih epitopa na osnovu aminokiselinske sekvence ovog proteina predviđa se prisustvo tri linearna IgE vezujuća epitopa: ⁴²TGQQPAPTPACC⁵³, ⁶⁴ITPAER⁶⁹, ⁸⁵NLKDDAVS⁹² [118, 129].

2.2.1.4 Protein sličan taumatinu iz banane

Proteini slični taumatinu su dobili naziv po proteinu taumatinu koji je slatkog ukusa i nalazi se u slatkim bobicama afričkog žbuna *Tahumatococcus daniellii*. Ovaj slatki protein se koristi kao prirodni zaslađivač, a zanimljivo je da ni jedan od proteina sličnih taumatinu zapravo nema sladak ukus [141].

Biljke sintetišu TLP prilikom biotičkog i abiotičkog stresa kao i u određenim razvojnim stadijumima, naročito tokom zrenja [142]. Pripadaju PR-5 familiji proteina i od alergena hrane u ovu grupu takođe ubrajamo i TLP proteine trešnje (Pru av 2), jabuke (Mal d 2), zelenog kivija (Act d 2), zlatnog kivija (Act c 2) i paprike (Cup a 1). TL proteine takođe nalazimo kao inhalatorne alergene poreklom iz polena (Jun a 3 i Cup a 3) [74]. Do sada je identifikovano 32 TLP-a koji su prepoznati kao alergeni poreklom iz polena i hrane [69, 141].

Do sada poznati TLP molekuli imaju molekulsku masu oko 20 kDa. Struktura TLP-a banane je određena kristalografski, x-zracima. Poseduju 8 disulfidnih mostova [143], koji značajno doprinose njihovoj otpornosti na termički tretman kao i proteolitičke enzime [74].

TLP je jedan od najzastupljenijih proteina u pulpi banane i pokazuje β -1,3-glukanaznu i antifungalnu aktivnost. Najverovatniji mehanizam kojim ovaj enzim ispoljava svoju biološku aktivnost se ogleda u inserciji u lipidni dvosloj ćelijske membrane patogena time formirajući transmembransku poru koja menja ćelijsku permeabilnost patogena [144].

Ukupna sekvencija ovog antifungalnog proteina je deponovana u okviru NCBI baze podataka [145]. Ovo je sekvencija bez signalnog peptida, ukupne dužine od 200 ak. Ukoliko se uradi BLAST analiza dobijaju se brojni podaci o podudarnosti ove sekvence sa sekvencijama drugih protein među kojima su 82% preklapanja sa PR-5 proteinom iz soje, 81% sa TLP-om iz grožđa, 71% sa TLP-om iz kivija, 81% sa proteinom iz breskve [116].

Struktura TLP-a iz banane je razrešena kristalografijom X-zracima rezolucije 170 pm [143]. Iako je polipeptidni niz TLP-a banane veoma slično uvijen kao taumatina, on se dosta razlikuje od ovog slatkog proteina usled prisustva elektronegativnog udubljenja koje se nalazi na njegovoj površini. Prisustvo ove elektronegativne uvale uzrokuje jak elektronegativni karakter koji predstavlja jedno od mogućih objašnjenja njegove antifungalne aktivnosti. Leone i saradnici su 2006. godine ukazali na prisustvo konzerviranih ostataka na površini ovog molekula koje ulaze u sastav epitopa odgovornih za alergene osobine [143].

1z3q

PDB

PDB

1z3q



Slika 2.8. Trodimenzionalna struktura TLP-a iz banane [143].

Pokazali su da TLP iz banane poseduje iste visoko konzervirane IgE vezujuće epitope kao i TLP proteini koje nalazimo u drugim biljnim vrstama i koje vezujemo za alergene voća ili polena poput IgE vezujućih epitopa Jun a 3 TLP aeroalergena. Utvrđivanje prisustva ovih uobičajnih epitopa na TLP-u omogućava razumevanje molekulske osnove za ukrštenu reaktivnost aeroalergena (alergijske reakcije klase 1) i alergena voća (alergijske reakcije klase 2)[143].



Slika 2.9. Dijagram koji prikazuje trodimenzionalnu strukturu TLP-a iz banane koji je sačinjen iz 3 strukturalna domena: domen I koji predstavlja centralno jezgro koji je sačinjen od β -sendviča i dve β -pločice, okružen sa dva kraća domena, domen II (zeleno označen) i domen III (plavo označen). Disulfidni mostovi su prikazani narandžastim lopticama i štapićima. [143].

Eksperimentalno je pokazano prisustvo 11 IgE vezujućih epitopa koji su nalazimo nasumično raspoređeni po površini molekula TLP-a iz banane [143]. Epitopi 8, 9 i 10 (¹⁵⁴NSGSCSPTDY¹⁶³, ¹⁶⁹RNCP¹⁷², ¹⁷⁵YSYPKDDQT¹⁸³, redom) su takođe prisutni na osmotinu, zeamatinu i taumatinu, i u mnogome se poklapaju sa epitopima 2, 3 i 4 na Jun a 3. Takođe, primećena su i 4 konzervirana disulfidna mosta (Cys¹²⁹–Cys¹³⁹, Cys¹⁴³–Cys¹⁵², Cys¹⁵³–Cys¹⁵⁸ i Cys¹²¹–Cys¹⁷¹) koji značajno stabilizuju konformaciju epitopa koje nalazimo na pomenutim proteinima. Ovakav podatak svakako doprinosi razumevanju ukrštene reaktivnosti koja je detektovana kod ovih proteina [116, 143].

2.2.1.5 β -1,3-glukanaza iz banane

Banana endo β -1,3-glukanaza, označena kao Mus a 5 u WHO/IUIS bazi podataka o alergenima, (MM 33 kDa, EC 3.2.1.39) predstavlja jedan od najzastupljenijih proteina u pulpi ovog voća [12, 146]. To je glikozil hidrolaza zastupljena u različitim biljnim vrstama. Ovaj enzim iz različitih izvora načelno poseduje strukturu ($\alpha\beta$) TIM bureta mase u opsegu 25-35 kDa. Katalizuje hidrolizu β -1,3-D-glikozidnih veza u β -1,3-glukanima koje nalazimo u ćelijskim zidovima biljaka i kvasaca. Iz tog razloga se ne smatra da ovi enzimi učestvuju isključivo u odbrani biljaka od patogena, već i da učestvuju u fiziološkim i razvojnim procesima koji se normalno odvijaju ovih organizama i nisu vezani isključivo za pojavu patogena. Takvi procesi su npr. germinacija polena, fertilizacija, zrenje, germinacija semena i mobilizacija proizvoda za skladištenje u endospermu [147].

Pojačano se sintetizuju kao odgovor na ranjavanje, hladnoću, tretman ozonom i UV-B zračenjem. Pokazano je i da količina β -1,3-glukanaze u banani značajno raste tokom zrenja i uključena je u proces omekšavanja pulpe [69].

Glukanaze su do sada kao alergeni hrane nađeni u avokadu, banani, kestenju, smokvi i kiviju [122, 148]. Kao inhalatorni alergeni su do sada pronađene u polenu maslina [149], a poznato je i da glukanaza poreklom iz lateksa doprinosi lateks-voće sindromu [148, 150, 151].

β -1,3-glukanaza hidrolizuje 1,3- β -D-glikozidne veze u 1,3- β -D-glukanima kao

što su laminarin i paramilon, odnosno razgrađuje glukane koji učestvuju u građi hifa filamentoznih gljiva i na taj način ima zaštitnu ulogu. Pripada familiji 2 PR proteina [69].

Ukupna sekvencija β -1,3-glukanaze iz banane je izgrađena od 340 ak, pri čemu je signalni peptid 1-28 ak [116]. BLAST analiza pokazuje da je aminokiselinska sekvencija Mus a 5 najbližnja sekvencijama β -1,3-glukanazama iz drugih sorti banane, dok u odnosu na druge vrste pokazuje sličnost sa beta-1,3-glukanazom iz uljevite palme 77%, đumbira 78% i duvana 66% [116]. Pokazano je da se u imunoblotu umesto anti-Mus a 5 antitela mogu koristiti poliklonski serum na β -1,3-glukanazu iz duvana [151], što je u saglasnosti sa ovim rezultatima koji su dobijeni na osnovu upoređivanja aminokiselinskih sekvenci β -1,3-glukanaza iz banane i duvana.

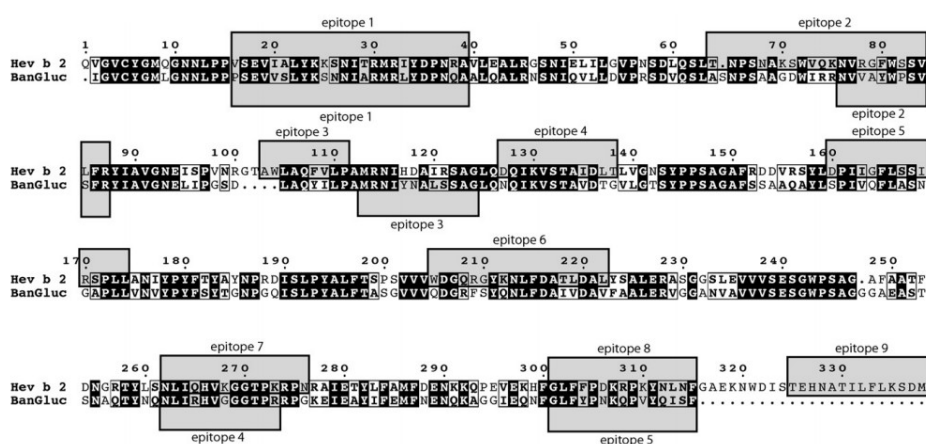
β -1,3-glukanaza iz banane pokazuje ukrštenu reaktivnost sa Hev b 2 alergenom lateksa. 9 različitih IgE vezujućih epitopa je prepoznato u okviru ukupne aminokiselinske sekvence glavnog alergena lateksa Hev b 2, dok je na β -1,3-glukanazi iz banane identifikovano ukupno 5. Eksperimentalno je pokazano prisustvo identičnih epitopa na Hev b 2 i Mus a 5, kao i na alergenu polena masline Ole e 9 koji je takođe β -1,3-glukanaza [149, 152].



Slika 2.10. Trodimenzionalna struktura β -1,3-glukanaze iz banane [153].

Tabela 2.5. IgE vezujući epitopi identifikovani u okviru aminokiselinske sekvence Hev b 2 i Mus a 5. Aminokiselinski ostaci koji su prisutni na površini alergena se nalaze uokvireni crnom bojom i ispisani su belim slovima. Crnim slovima su naznačeni delovi aminokiselinske sekvence koji se nalaze u unutrašnjosti molekula [153].

IgE-binding epitopes of Hev b 2	IgE-binding epitopes of BanGluc
#1 16VSEVIALYKKSNIITRMRIYDPNRA39	#1 16SEVVSLYKSNNIARMRLYDPNQAA39
#2 64TNPSNAKSWVQKNVRFWSSVLF87	#2 67SAAGDWIRRNVVAYW81
#3 103AWLAQFVLP111	#3 109MRNIYNALSSAG120
#4 127DQIKVSTAIDL138	
#5 160DPIIGFLSSIRSPLL174	
#6 205WDGQRGYKQLFDATLDAL223	
#7 262NLIQHVKGGTTPKRPN276	#4 259NLIIRHVGGGTPR270
#8 301GLFFPDKRPS09	#5 298GLFYPNKQP306
#9 325TEHNATILFLKSDM338 (absent on 3D model)	



Slika 2.11. Poređenje aminokiselinske sekvence Hev b 2 i Mus a 5 (BanGluc) i ukazivanje na prisustvo zajedničkih IgE vezujućih epitopa. Delovi sekvenci koji su identični su uokvireni crno i ispisani belim slovima. IgE vezujući epitopi su prikazani svetlo-sivim uokviravanjem [153].

Prilikom određivanja trodimenzionalne strukture ovog proteina zapažena je i elektronegativna katalitička centralna uvala sa dva glutaminska ostatka (Glu⁹⁴ i Glu²³⁶) koji nose katalitičku aktivnost [153]. Eksperimentalno je potvrđeno prisustvo 11 IgE

vezujućih epitopa, od čega je 10 epitopa slično onima koji su detektovani u okviru Hev b 2 alergena lateksa [153].



Slika 2.12. Dijagram koji prikazuje strukturu TIM-bureta Mus a 5. β -pločice koje su prikazane zelenim strelicama su okružene α -heliksima koji su predstavljeni crveno-braon bojom. Brojevi 1 i 312 ukazuju na N- i C-terminalne krajeve na polipeptidnom lancu. Preuzeto iz [153].

2.2.1.6 Askorbat peroksidaza iz banane

Askorbat peroksidaza je najskorije registrovan alergen banane i označen je sa Mus a 6 [12]. Ovaj enzim je identifikovan kod mnogih viših biljaka sa brojnim izoformama koje se nalaze u citosolu, hloroplastima, mitohondrijama i peroksisomima [154].

Do sada poznata forma askorbat peroksidaze iz banane (27 kDa) je locirana u ćelijskom citosolu [155]. Ubraja se u enzime koji učestvuju u uklanjanju reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) u ćelijama aerobnih organizama i predstavlja ključan enzim u velikom detoksifikujućem sistemu za uklanjanje vodonik peroksida u hloroplastima i citosolu u askorbat-glutationskom ciklusu [156]. U pulpi banane ovaj enzim deluje prilikom normalnih metaboličkih procesa, kao i tokom stresnih procesa u koje ubrajamo oksidativni stres, napade patogena, ekstremne promene u temperaturi, isušivanje i delovanje ozona [157]. Takođe je pokazano da zrenje i delovanje etilena podstiče nastajanje vodonik peroksida u banani [158]. Mehanizam delovanja askorbat

peroksidaze se zasniva na korišćenju askorbata kao donora elektrona koji prevodi vodonik peroksid u vodu. Aktivno mesto askorbat peroksidaze iz banane (12,7 kDa, EC 1.11.1. 11) čini aminokiselinska sekvencija ³³APLMLPLAWHSA⁴⁴, koja je povezana sa hemom [159].

Istraživačka grupa sa Tajlanda je u avgustu 2015. godine registrovala ovaj alergen na osnovu pozitivnih rezultata koje su dobili u imunoblotu sa serumima alergičnih osoba. Oni su izolovali prirodni protein, a zatim su proizveli njegovu rekombinantnu formu. Tada su u imunoblotu koristeći serume 11 pacijenata koji su odabrani na osnovu pozitivnog SPT na bananu, uvideli da je 10 seruma odreagovalo pozitivno na prirodni protein, a 7 na rekombinantni protein proizveden u *E. coli* [12].

Dostupna je parcijalna sekvencija ovog proteina [160], a kao rezultat predviđanja potencijalnih linearnih IgE vezujućih epitopa ovog alergena u okviru poznatog dela sekvence nalazimo tri potencijalna IgE vezujuća epitopa: ¹PGREDKTLPREEGRLPDATKGSDDL²⁵, ⁴⁴GGHTVGRCHKERSGFEGAWTS⁶⁴ i ⁷⁹SSEKDDLIQLPSDKALL⁹⁵ [118, 129].

2.2.1.7. Katalaza iz banane

Katalaza (EC 1.11.1.6) je takođe enzim koji učestvuje u neutralisanju ROS [161-163]. Sadrži hem i ima zaštitnu ulogu prilikom oksidativnog stresa, tako da se i njena sinteza posmatra kao jedan od odgovora biljke na oksidativni stres. Pokazano je da nivo transkripta katalaze (*MaCat2*) banane raste kao odgovor na sniženu temperaturu ili mehaničko oštećenje, ali ne i prilikom izlaganja povišenim temperaturama i prilikom zrenja [164].

Širom sveta je prepoznat značajan procent ljudi koji su alergični na katalazu iz različitih vrsta gljiva. Kod *Aspergillus versicolor* to je katalaza označena kao Asp v 5 za koju je nađeno da deli visok stepen homologije sa katalazom Pen c 30 iz *Penicilium citrinum* [165]. Na Pen c 30 je takođe pozitivno odreagovao IgE 48% seruma pacijenata alergičnih na buđ [166].

Na potencijalnu ukrštenu IgE reaktivnost katalaza iz različitih izvora je ukazano

istraživanjem IgE reaktivnosti katalaze iz *Metarhizium anisophilae* u imunoblotu, ali sa minimalnom IgG reaktivnošću [167]. Prisustvo plesni u okolnoj sredini je uobičajno i smatra se da je uključeno u razvoj oboljenja poput alergijskog rinitisa, alergijske astme, alergijskih bronhopulmonarnih mikoza i plućnih preosetljivosti [168, 169].

Proteinska sekvencija katalaze banane je dostupna u okviru *Uniprot* baze podataka od 5. aprila 2011. godine [170]. Urađeno je predviđanje potencijalnih IgE epitopa i dobijen rezultat je ukazao na prisustvo 19 potencijalnih IgE vezujućih linearnih epitopa u okviru sekvence ovog proteina banane [129].

2.3 Dijagnostika alergije na hranu i značaj unapređenja dijagnostičkih reagenasa

Blekli (*Blackley*) je još 1873. godine opisao ideju o dijagnostikovanju alergijskih oboljenja korišćenjem ekstrakta polena koji je nanosio na ogrebotine na sopstvenoj koži, što se kasnije ispostavilo kao kamen temeljac za razvoj alergijske dijagnostike [171]. Kada je u pitanju dijagnostikovanje alergije na hranu, prvi test koji je zabeležen u literaturi potiče sa početka 20. veka kada je američki pedijatar Oskar Menderson Šlos (*Oscar Menderson Schloss*) dijagnostikovao alergiju na jaja koristeći kožne probe 1912. godine i detaljno je opisao ovaj test [171].

Preteča takozvanog SPT (eng. *skin prick test*) je demonstrirana u Beču 6. juna 1907. godine od strane Pirkea koji je koristio tuberkulin u te svrhe. Modifikovani metod kakav se danas koristi u zdravstvu je razvio Helmtrajt Erbuster (*Helmtraut Erbuster*) i publikovao 1959. godine [171]. Ovo je najrasprostranjeniji alergijski dijagnostički test današnjice.

Danas se dijagnostika alergija najčešće zasniva na tri vrste testova, i to:

1. *in vivo* testova (kožne probe i test oralne provokacije),
2. *in vitro* testova (radio alergosorbentnog testa (RAST, od eng. *radio-allergosorbent tests*), enzimskog alergosorbentnog testa (EAST, od eng. *enzyme-allergosorbent tests*), imunosorbentnog testa sa povezanim enzimom (ELISA, od eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*), imunoblot, imuno-alergen čip sa čvrstom fazom (ISAC, od eng. *immuno solid-phase allergen chip*) i imuno-CAP

testovi (*ImmunoCAP assay, Phadia, Upsala, Švedska*), i

3. *ex vivo* testova (test aktivacije bazofila (BAT, *eng. basophile activation test*)) [63].

Kod kožnih proba se uz pomoć lancete blago zagrebe površina kože što omogućuje difuziju alergena iz kapljice dijagnostičkog reagensa i kontakt sa mastocitima koji se nalaze unutar epidermisa. Pojava otoka i crvenila je potvrda senzitivizacije [172]. Histamin se koristi kao pozitivna, a puferisani fiziološki rastvor (PBS) kao negativna kontrola [173]. Izvođenje kožnih proba je jednostavno i jeftino, ali test nije standardizovan. Tumačenje rezultata u mnogome zavisi od lica koje izvodi testiranje, kao i od kvaliteta dijagnostičkog reagensa. Takođe se mogu javiti lažno pozitivni rezultati kod osoba sa atopijskim dermatitisom [174]. Veličina otoka koji se javlja u kožnim probama kao i nivo određenog specifičnog IgE molekula u serumu su svakako povezani sa verovatnoćom da dodje do alergijskih simptoma, ali je pokazano da ne koreliraju u potpunosti sa ozbiljnošću ove reakcije [175]. Kožne probe imaju značajnu prednost u kliničkoj dijagnostici usled niske cene i kratkog vremena testiranja jer su rezultati uočljivi u roku od 15-20 minuta [175, 176].

Oralni provokacioni test se smatra “zlatnim standardom” u kliničkoj dijagnostici kada je u pitanju dijagnostikovanje alergije na hranu [177]. Ovaj test izvode isključivo iskusni alergolozi, a zasniva se na postepenom unošenju povećavajućih doza alergena hrane oralnim putem. Često se uz ovaj test ispituje i placebo efekat da bi se dodatno potvrdila tačnost rezultata. Može se izvoditi tako da su i pacijent i lekar svesni unošenja alergena, da pacijent nije upoznat sa tim da li u određenom trenutku unosi alergen ili lažnu probu, ili se čak pribegava i dvostrukom placebo kada ni pacijent ni lekar nisu sigurni koja proba zaista sadrži alergen. Upravo se ova poslednja varijanta oralnog testa smatra najspecifičnijim testom, ali se u kliničkoj praksi retko izvodi i vremenski je najzahtevnija [176]. Ovakvo testiranje je bezbedno isključivo ukoliko je sprovedeno od strane iskusnog medicinskog osoblja jer postoji rizik da se izazove anafilaktički šok kod pacijenta [175].

Kada su u pitanju *in vitro* testovi, oni uključuju merenje koncentracije IgE molekula u serumu korišćenjem RAST, EAST, ELISA, imunoblot i imuno-CAP testa (*ImmunoCAP assay, Phadia, Upsala, Švedska*) [63, 175, 178].

Prilikom merenja specifičnog IgE molekula u serumu utvrđujemo senzitivizaciju na određenu hranu [64, 176]. *ImmunoCAP* sistem jeste strategija za razlikovanje ukrštene reaktivnosti od prave ko-senzitivizacije koja se izvodi uz korišćenje prirodnih ili rekombinantno proizvedenih prečišćenih alergena hrane. Dijagnostika sa pojedinačnim /razdvojenim komponentama (*component-resolved diagnostics* ili CRD) je kreirana tako da može da ukaže na razliku između klinički značajne i irelevantne senzitivizacije (izostaju klinički simptomi alergije). Metod se bazira na detekciji specifičnog prepoznavanja proteina hrane od strane IgE molekula pacijenta [179-181].

Problem je što mnogi ekstrakti hrane nisu standardizovani. Degradacija proteinskih alergena hrane tokom ekstrakcije je pojava koja je uobičajna, a rezultat je niska koncentracija alergena u finalnom ekstraktu [180]. Sa druge strane, sličnosti u strukturi alergena hrane sa alergenima iz vazduha i okolne sredine (polen, kućna prašina, lateks...) dovode do višestrukih pozitivnih rezultata u kožnim probama i RAST-u. Postoji i ISAC test koji predstavlja sistem za *in vitro* testiranje i dijagnostiku koja omogućava analizu velikog broja alergeničkih komponenti u samo jednom koraku [181]. Korišćenjem ISAC tehnologije mnogi važni pokretači alergijske reakcije mogu biti određivani uz korišćenje malih zapremina krvnog seruma pacijenata. *Ex vivo* testovi se odnose na oslobađanje histamina i pojavu CD63 i CD203c površinskih markera na ćelijama bazofila, što je poznato kao test aktivacije bazofila (BAT, *eng. basophile activation test*) [182, 183].

Dijagnostički pristup obuhvata upoznavanje istorije bolesti koja može ukazati na to koja konkretna hrana bi mogla biti uzročnik pojave alergijskih simptoma. Kada se utvrdi koja je hrana potencijalni pokretač alergijske reakcije prelazi se na dijagnostička testiranja i to pre svega na kožne probe i/ili merenje koncentracije specifičnog IgE molekula u serumu [184]. Određivanje serumskog IgE molekula i kožne probe predstavljaju dva jako osetljiva testa kada je u pitanju IgE-posredovana alergija na hranu [184]. Dosadašnje statističke analize su pokazale da je osetljivost preko 90% kada su u pitanju kožne probe, dok po pitanju merenja specifičnog IgE molekula iz seruma osetljivost iznosi između 70 i 90% [176, 178, 185], ali ni jedan od testova ne daje 100%-tnu osetljivost. Od osobina samog alergena i od kvaliteta dijagnostičkog reagensa zavisi koji će od ova dva testa pokazati veću osetljivost u dijagnostici [184].

Postoji realna potreba u zdravstvu za unapređenje prevencije i kliničkih tretmana IgE posredovane preosetljivosti na hranu, pa su i brojna istraživanja usmerena na razvoj novih dijagnostičkih i terapijskih pristupa za tretiranje alergija na hranu [186].

Terapijski pristupi koji se danas primenjuju su većinom zasnovani na prostom izbegavanju hrane koja izaziva reakciju kao i na tretmanima uz upotrebu adrenalina, antihistaminika i glukokortikosteroida u slučajevima anafilaktičkog šoka [178]. Ovi pristupi su pre svega usmereni na kontrolisanje simptoma i supresiju sistemske reakcije, bez uticaja na pravi uzrok nastanka alergije, ali se saznanja o patofiziologiji alergijskih oboljenja unapređuju i otvaraju se nove ideje za pristupanje ovom problemu [23].

Senzitizacija ne mora da znači i pojavu kliničkih simptoma i može dovesti do nepotrebnog izbegavanja namirnica [175, 187]. Iz tog razloga se ova testiranja sprovode da bi se ispitali i objasnili klinički simptomi koji su se već javili kod pacijenta. Testiranje panelom alergena bez uzimanja u obzir kliničke istorije simptoma može rezultovati pogrešnim tretmanom [184].

Ide se ka tome da se dijagnostika alergije na hranu sve češće zasniva na upotrebi pojedinačnih alergena hrane, odnosno na merenju nivoa IgE u serumu koji je specifičan za pojedinačne alergene umesto korišćenja smeše alergena [178]. Sve dok ovaj vid dijagnostike ne bude do te mere razvijen da se može rutinski koristiti u standardnoj kliničkoj dijagnostici verovatno je da će kožne probe i određivanje specifičnog IgE molekula u serumu ostati testovi izbora prilikom ispitivanja alergije na hranu [184].

2.4 Identifikacija proteina masenom spektrometrijom

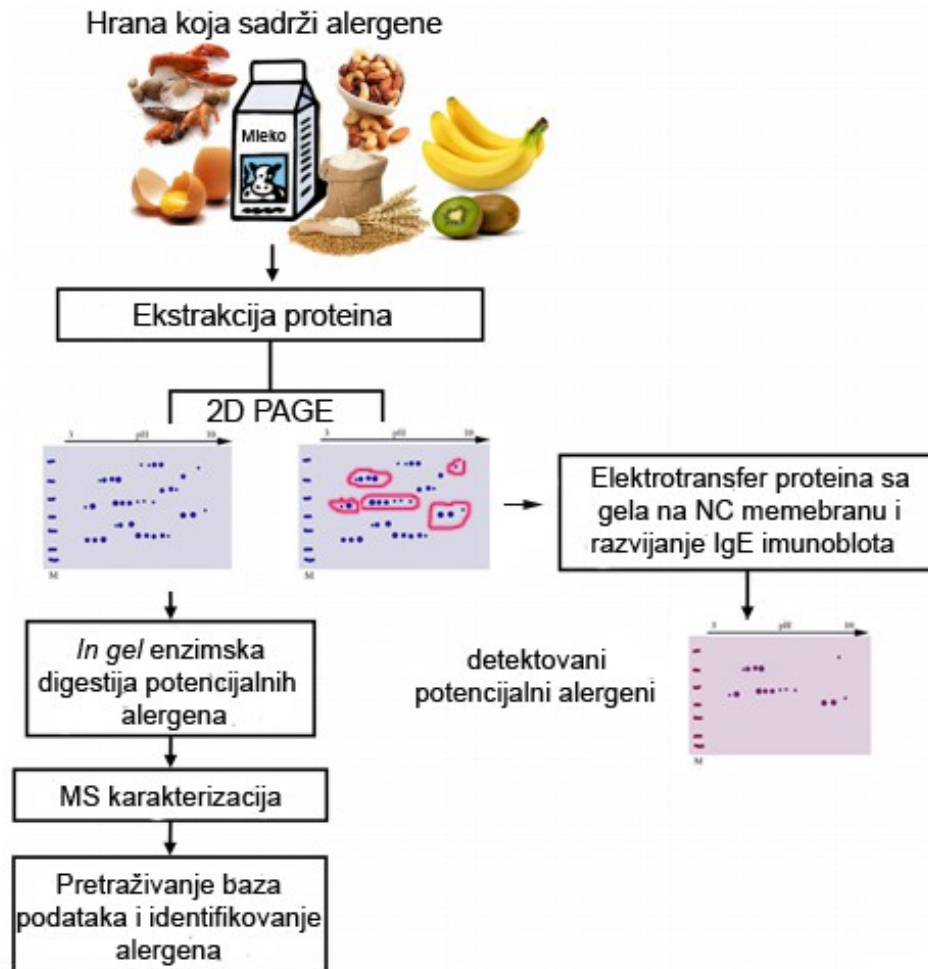
Identifikacija alergena u hrani, piću i farmaceutskim proizvodima je od velikog značaja za zdravstvo i prehrambenu industriju. Poslednjih godina su tehnike dvodimenzionalne gel elektroforeze (2D PAGE) u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (MS) dale brojne rezultate u otkrivanju novih alergena [188, 189].

Proteomika je razvijena zahvaljujući razvoju MS i uvođenja naprednih jonizacionih metoda, odnosno elektro-sprej jonizacije (ESI) i laserske desorpcije/jonizacije potpomognute matriksom (MALDI). Zahvaljujući performansama

ovih MS instrumenata, danas MS predstavlja nezamenljiv alat u proteomici [190]. MS je metod koji nam omogućava nedvosmislenu identifikaciju, karakterizaciju i kvantifikaciju alergena iz različitih izvora. Do današnjeg dana proteomika je omogućila razotkrivanje primarne strukture oko 850 alergena, omogućavajući značajan napredak molekulske dijagnostike [191].

Sa analitičke tačke gledišta, ispitivanja na polju proteomike se zasnivaju na visokoeфикаsnim tehnikama razdvajanja kao što su reverzno-fazna tečna hromatografija visokih performansi (RP-HPLC) ili 2D PAGE u kombinaciji sa enzimskom digestijom i MS analizom, dajući rezultate koje je kasnije neophodno analizirati odgovarajućim programima za pretraživanje proteinskih, genomskih i EST baza podataka [192]. Prilikom identifikacije proteina iz biološkog materijala ukupni proteini uzorka od interesa se najpre razdvoje pomoću 2D PAGE što može razdvojiti stotine proteina u vidu tačaka na poliakrilamidnom gelu. Oni se u jednoj dimenziji razdvajaju na osnovu izoelektrične tačke, a u drugoj dimenziji na osnovu molekulske mase. Za dobru i reproduktivnu 2D elektroforezu, priprema uzorka predstavlja kritičan korak. Kvalitetna ekstrakcija proteina iz voća koje uopšteno sadrži male količine proteina i visok sadržaj supstanci koje ometaju ekstrakciju, razdvajanje i prečišćavanje predstavlja izazov [13, 193].

Nakon uspešne 2D elektroforeze, razdvojeni proteini se dalje mogu elektrotransferom preneti na membranu za razvijanje imunoblota (objašnjenje je prikazano na slici 2.13). Imunoblot se razvija upotrebom seruma alergičnih pacijenata, ukazujući na prisustvo IgE reaktivnih tačaka koje se dalje karakterišu MS ili MS/MS-om. Ukoliko ne postoji dovoljno informacija u proteinskim bazama podataka kako bi se uspešno sprovela identifikacija, mogu se koristiti informacije dobijene na osnovu transkriptomiksa (dobijene na osnovu RNK sekvenciranja) koje su se pokazale kao jako korisne prilikom identifikacije novih alergena. Ovaj kombinovani pristup je uspešno implementiran u karakterizaciji alergena iz alergeničkih ekstrakata [194-196], a primer su alergeni polena trava [195].



Slika 2.13. Princip detekcije i identifikacije alergena hrane proteomikom.

Proteomiks koji ima za cilj detekciju alergena se često naziva i alergenomiks, i predstavlja uobičajni metoda za identifikaciju alergena. Ovakva analiza se odlikuje jednostavnošću, niskom cenom i brzom detekcijom IgE vezujućih proteina [197].

Proteomika hrane je ne samo važna za razumevanje veze između proteinskog sadržaja i nutritivnih i tehnoloških svojstava hrane, već i za utvrđivanje prisustva tragova određenih alergena u hrani, uključujući i detekciju alergena, kao i karakterizaciju genetski modifikovanih proizvoda [192].

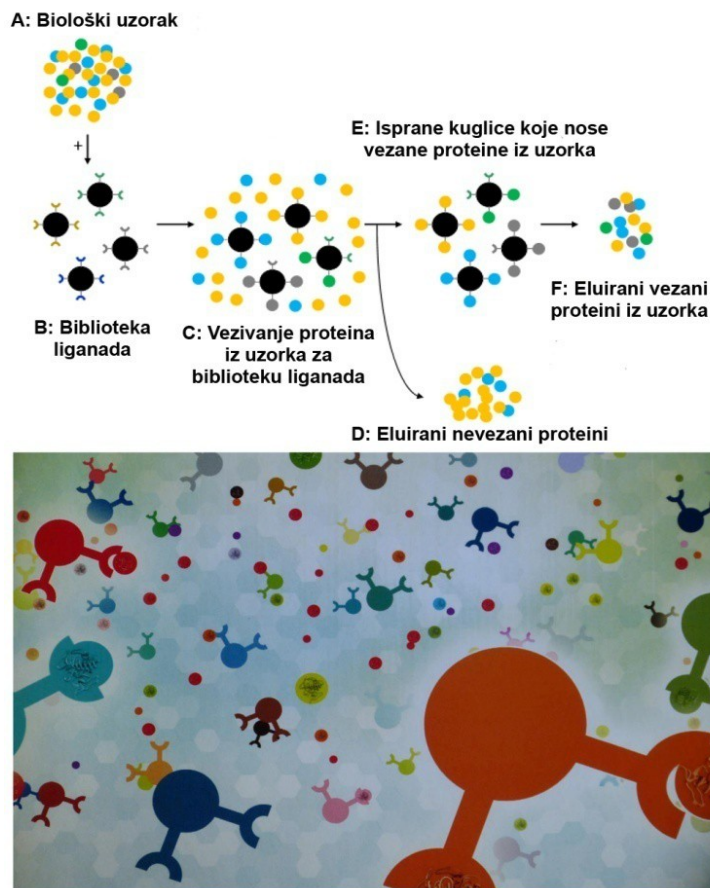
Detekcija alergena MS-om predstavlja popularnu oblast u ispistivanju kvaliteta hrane jer ima potencijal da doprinese osnovi za proizvodnju hipoalergene hrane [198].

Još jedna od prednosti ove metode je to što ne zahteva tradicionalno izolovanje proteina i dozvoljava istovremenu detekciju većeg broja ekstrahovanih IgE reaktivnih proteina, dok je ograničenje metode to što ne može dati informaciju o alergenom potencijalu IgE vezujućih proteina koji su identifikovani. Takođe, ovaj pristup se mora prilagoditi svakom pojedinačnom uzorku, i razvoj novih strategija je neophodan za dobijanje najboljih rezultata [192].

2.4.1 Upotreba biblioteka kombitornih peptidnih liganada

Obogaćivanje uzorka manje zastupljenim proteinima i istovremeno uklanjanje viška visoko zastupljenih proteina u cilju otkrivanja “skrivenog” proteoma, odnosno proteina koji su u manjoj meri zastupljeni u uzorku, je omogućeno upotrebom biblioteka kombinatornih peptidnih liganada (CPLL, od *eng. combinatorial peptide ligand libraries*) [199]. Primećeno je da se u većini bioloških uzoraka nalazi mala grupa proteina (20-30) koji su značajno zastupljeniji u odnosu na preostale proteine iz uzorka, što značajno otežava analizu preostalih proteina [199].

CPLL se takođe mogu posmatrati kao matriks koji sadrži milione afinitetnih heksapeptidnih proteinskih liganada što je suprotno klasičnoj afinitetnoj hromatografiji u kojoj imamo jednu vrstu liganda koja ima za cilj da veže jedan određeni tip proteina iz uzorka [200]. CPLL su zakačeni za nosač sačinjen od kuglica i u eksperimentu se koristi u hromatografskoj koloni na koju se dodaje velika količina po mogućstvu koncentrovanog uzorka kako bi se zasitili ligandi na nosaču. Na ovaj način se omogućava detekcija daleko većeg broja proteina iz uzorka u odnosu na detekciju kojoj nije prethodio ovakav tretman [201-203].



Slika 2.14. Princip korišćenja biblioteka kombinatornih peptidnih liganada. Preuzeto iz [199].

Korišćenje CPLL za relativno ujednačavanje koncentracija različitih proteina u biološkim uzorcima u cilju detektovanja proteina zastupljenih u niskim koncentracijama je do sada dalo brojne uspješne rezultate. Ovaj metod omogućava analizu šireg spektra ukupnih proteina iz uzoraka uz jednostavno eksperimentalno izvođenje [199].

3. CILJ

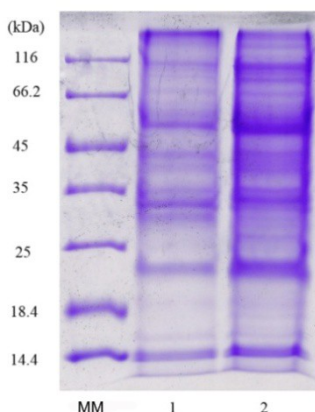
Ciljevi ovog rada su:

1. optimizacija postupka dobijanja proteinskog ekstrakta banane za detekciju i izolovanje IgE reaktivnih proteina,
2. unapređenje protokola za izolovanje do sada okarakterisanih glavnih alergena banane,
3. detekcija i identifikacija novih alergena banane, i
4. razvoj strategije za prečišćavanje i karakterizaciju novih alergena koji će poboljšati dijagnostiku alergije na bananu.

4. NAŠI RADOVI

4.1. Priprema proteinskog ekstrakta banane

Za pripremu proteinskog ekstrakta banane koristili smo pulpu banane (*Chiquita*) kupljenu u lokalnoj prodavnici. Oljuštena pulpa banane (524 g) je homogenizovana blenderom u 1000 mL 50 mM NH_4HCO_3 pufera, pH 8,5, sa 1%-tnim polivinilpolipirrolidonom (PVPP), 0,01%-tnim NaN_3 , 0,01%-tnim CaCl_2 , i 10 mM askorbinskom kiselinom. Nakon ekstrakcije mešanjem na magnetnoj mešalici (2 h na 4°C), sirovi proteinski ekstrakt je centrifugiran (5000 rpm, 30 min) na 4°C . Supernatant (1100 mL) je prikupljen i dijalizovan naspram 50 mM NH_4HCO_3 pufera, pH 8.5 pufera (4°C , 24 h). Koncentracija proteina ekstrakta banane je određena Bradfordovim reagensom (0,94 mg/mL). U cilju dobijanja koncentrovanog ekstrakta, proteini banane su zatim precipitirani amonijum sulfatom (20-60%). Dobijeni precipitat je rastvoren u minimalnoj zapremini 20 mM NH_4HCO_3 pufera, pH 8,5 i dijalizovan naspram istog pufera uz nekoliko izmena (4°C , 48 h). Koncentracija proteina u koncentrovanom ekstraktu banane je izmerena Bradfordovim reagensom (6,14 mg/mL). Za skladištenje tokom dužeg perioda koncentrovani ekstrakt banane je alikvotiran, liofilizovan i liofilizat je odlagan na -20°C do upotrebe. Elektroforetski profil ekstrakta banane je analiziran pomoću SDS PAGE.

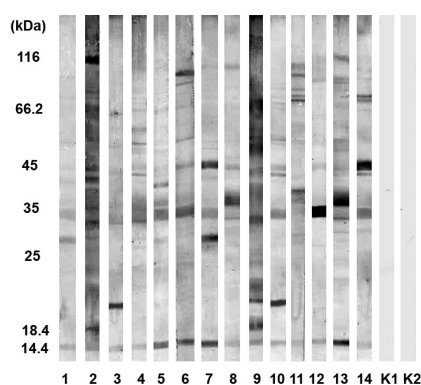


Slika 4.1. SDS PAGE uzorka ekstrakta banane pre i posle precipitacije amonijum sulfatom. MM.
Molekulski markeri, 1. Uzorak pre precipitacije, 2. Rastvoreni uzorak nakon precipitacije.

Slika 4.1. je pokazatelj elektroforetskih profila ekstrakta banane pre i posle koncentrovanja amonijum sulfatom, tako da je na SDS PAGE naneto 40 µg proteina uzorka 1 i 60 µg uzorka 2. U daljem tekstu će biti naglašeno da li je korišćen ekstrakt pre ili posle precipitacije amonijum sulfatom, odnosno koncentrovani banana ekstrakt. Precipitat koji se dobija nakon 20%-tnog zasićenja amonijum sulfatom ne pokazuje prisustvo proteinskih traka u elektroforetskom profilu.

4.2. Razvijanje alergograma na proteine ekstrakta banane

Radi analize alergenog profila osoba alergičnih na bananu razvijen je alergogram koji ukazuje na pojedinačnu IgE reaktivnost seruma prema proteinima iz ekstrakta banane. Za dobijanje alergograma korišćen je ekstrakt banane bez prethodne precipitacije amonijum sulfatom. Ukupni proteini ekstrakta banane su razdvojeni na 12% SDS PAGE u redukujućim uslovima, a zatim polusuvim transferom preneseni na NC membranu za razvijanje IgE imunoblota. Korišćeno je ukupno 14 seruma pacijenata alergičnih na bananu koji su obezbeđeni od strane Univerzitetske klinike u Libeku, Nemačka, i potiču od pacijenata kod kojih su registrovani alergijski simptomi prilikom konzumiranja banane. Rezultat razvijanja alergograma je prikazan na slici 4.2.



Slika 4.2. Alergogram IgE reaktivnosti pojedinačnih seruma prema proteinima ekstrakta banane.

1-14. IgE imunoblot sa pojedinačnim serumima alergičnih pacijenata, K1 – kontrola sekundarnih i tercijskih antitela, K2 -kontrola tercijskih antitela.

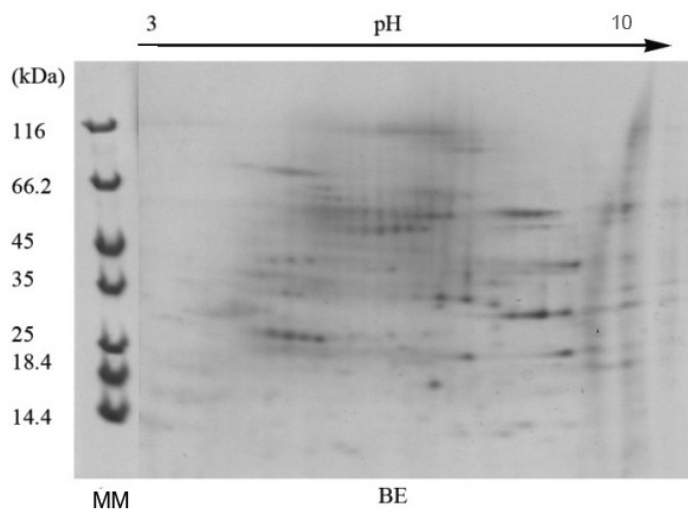
S obzirom da su svi analizirani serumi pokazali IgE reaktivnost u imunoblotu, oni su korišćeni u ispitivanju IgE reaktivnosti proteina banane i u daljim eksperimentima. Za korišćenje ovih seruma je dobijena dozvola od strane Etičkog komiteta Univerziteta u Libeku, kao i odobrenje Etičke komisije sa Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Dokazi o posedovanju odobrenja se nalaze u Prilogu.

4.3 Dobijanje 2D mape proteina banane

2D PAGE proteinskog koncentrovanog ekstrakta banane je urađen pomoću izoelektrofokuseranja (IEF) na tračicama sa imobilizovanim pH gradijentom (*Serva*, Nemačka) u prvoj dimenziji, i SDS PAGE u redukujućim uslovima u drugoj dimenziji.

Uzorak za 2D PAGE analizu je pripremljen tako što je nanet na *ProteoMiner* kolonu (*BioRad*, SAD) sa bibliotekama kombinatornih peptidnih liganada kapaciteta za vezivanje do 10 mg proteina, zatim su uklonjeni nevezani proteini, a vezana frakcija koja je eluirana sa kolone je korišćena u daljem radu. Ukupna količina eluiranih proteina je određena Bradfordovim reagensom (0,25 mg). Zaostala ometajuća jedinjenja iz uzorka (pre svega soli iz pufera za eluiranje sa *ProteoMiner* kolone) su uklonjena precipitacionom metodom, uz korišćenje *Clean up* kita (*BioRad*, SAD) prema instrukcijama proizvođača. Dobijeni precipitat je rastvoren u rehidratacionom puferu (7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 0,6% amfolita pH 3-10 (*Serva*, Nemačka), 40 mM ditiotritol (DTT), bromfenol plavo (BFB) u tragu). IPG tračice su inkubirane sa proteinskim uzorkom u rehidratacionom puferu (155 µL) preko noći.

Urađeno je IEF u prvoj i zatim SDS PAGE u drugoj dimenziji, pri čemu je IPG tračica između ova dva koraka tretirana ekvilibracionim puferom (6 M urea, 30% (w/v) glicerol, 2% (w/v) SDS, 0.05 M Tris-HCl, pH 8.8, BFB u tragu) najpre sa 1% (w/v) DTT, a zatim sa 4% (w/v) jodacetamidom (IAA). Zatim je urađeno SDS PAGE razdvajanje na 4-12% Bis-Tris gelu (*Novex*, SAD), a gel je nakon toga ili bojen CBB bojom (slika 4.3) i korišćen za MS analizu, ili su sa njega transferovani proteini na membranu za potrebe imunoblota.

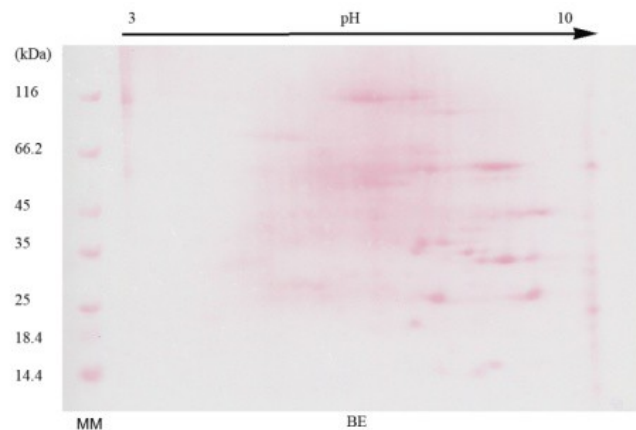


Slika 4.3. 2D PAGE ukupnih proteina ekstrakta banane. MM. Molekulski markeri, BE. Koncentrovani ekstrakt banane.

Na 2D mapi se nakon CBB bojenja uočava preko 200 proteinskih tačaka. Naša istraživanja su dalje bila usmerena na proteinske tačke koje pokazuju masu ≥ 25 kDa jer do sada registrovani proteini ne prevazilaze masu od 36 kDa u SDS PAGE u redukujućim uslovima, dok smo u alergogramu detektovali prisustvo IgE reaktivnih proteinskih traka većih molekulskih masa.

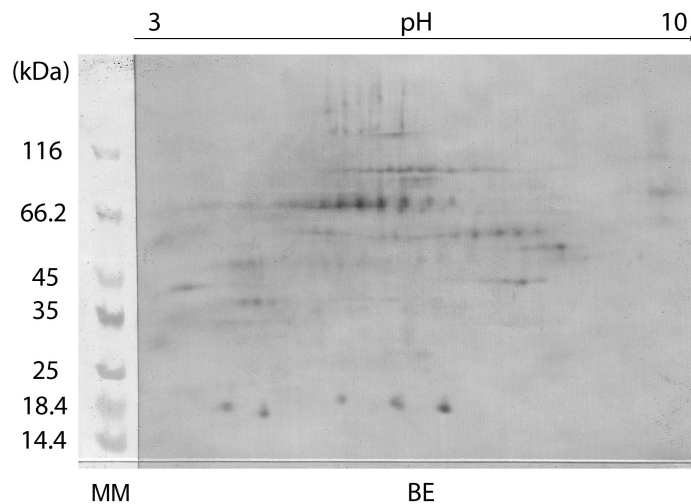
4.4 Dobijanje 2D mape IgE reaktivnih proteina banane

Za potrebe 2D imunoblota, proteini razdvojeni pomoću 2D PAGE su transferovani polu-suvim transferom na nitroceluloznu (NC) membranu (45 min, 2 mA/cm²). Provera transfera je urađena *Ponceau S* bojenjem. Rezultat transfera je prikazan na slici 4.4.



Slika 4.4. Provera transfera proteina iz koncentrovanog ekstrakta banane sa 2D PAGE gela na membranu Ponceau S bojenjem. MM. Molekulski markeri, BE. Koncentrovani ekstrakt banane.

Razvijen je imunoblot pomoću pula seruma pacijenata alergičnih na bananu. Korišćeni pul je sačinjen od 14 seruma koji su korišćeni za razvijanje alergograma. Vidljive tačke na NC membrani (slika 4.5) su detektovani IgE reaktivni proteini banane.



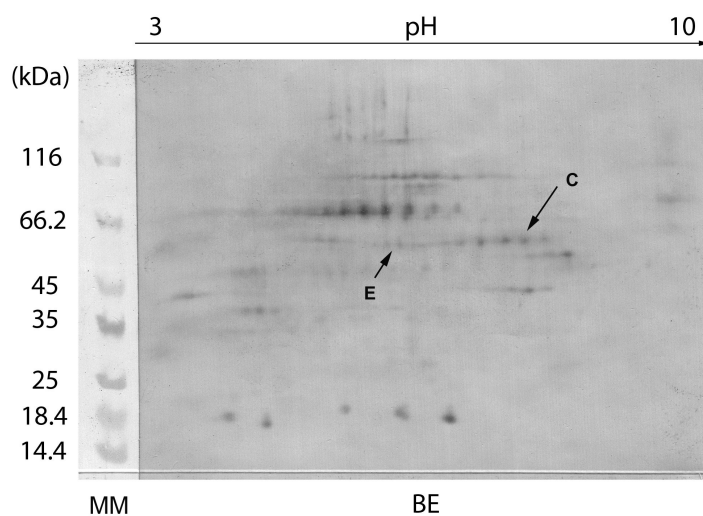
Slika 4.5. Detektovani IgE reaktivni proteini banane.
MM. Molekulski markeri, BE. Koncentrovani ekstrakt banane.

U 2D imunoblotu su jaku IgE reaktivnost pokazali proteini mase oko 70 kDa (4,5-5,5 pI), oko 90 kDa (6-7,5 pI), i oko 55 kDa (6,5-8 pI), a ove mase ne odgovaraju

do sada registrovanim alergenima iz banane.

4.5 Identifikacija IgE reaktivnih proteina banane

IgE reaktivni proteini su identifikovani tehnikom tzv. “masenog otiska prsta”, odnosno MS tehnikom kojoj prethodi digestija tripsinom u gelu. IgE reaktivni proteini banane su isečeni iz gela, tretirani tripsinom i analizirani pomoću MALDI TOF metoda. Dobijeni sirovi rezultati masene analize su analizirani pomoću MASCOT programa koji je dostupan na www.expasy.org. Kao rezultat obrade rezultata prepoznati su glavni alergeni banane koji su već registrovani, ali i IgE reaktivni proteini banane za koje ne postoje literaturni podaci da su opisani kao alergeni iz ovog izvora. Od do sada neidentifikovanih IgE reaktivnih proteina banane, mi smo identifikovali katalazu, i enolazu kao potencijalne alergene iz banane. Njihove pozicije na 2D PAGE gelu i u 2D blotu su prikazane na slici 4.6.



Slika 4.6. 2D blot IgE reaktivnih proteina ekstrakta banane.

Strelicama i oznakama su označene pozicije enolaze (E) i katalaze (C).

U daljem tekstu su prikazani MASCOT rezultati koji se odnose na detekciju katalaze banane, kao i glavnih alergena banane koji su registrovani kao Mus a 2, Mus a 4 i Mus a 5.

Katalaza banane:

1) catalase 2 [Musa acuminata AAA Group]; Protein View: ABV55108.1

Pokrivenost proteinske sekvence: 48%

Detektovani peptidi su označeni *crvenom bojom*.

```
1 MDPYKFRPSS SFDTNFTTTN AGAPVWDDQ ALTVGSRGPI LLEDYHLVEK
51 IAHFARERIP ERVVHARGAS AKGFFECTHD VTHLTCADFL RAPGVQTPII
101 LRFSTVIHER GSPETIRDPG GFAVKFYTRE GNWDLGNNF PVFFIRDGIK
151 FPDVIHAFKP NPKSHVQEYW RVDFLSHHP ESLHTFFFLF DDVGVPDYR
201 HMEGFGVNTY TFVSKGKVN YVKFHWKPTC GVKCLEDEA IVVGGKNHSH
251 ATQDLYDSIA AGNYPEWKLF VQVMDPDTEG RYDFDPLDDT KTWPEDLLPL
301 QPVGRLVLRN NIDNFFSENE QLAFGPGLVV PGIYYSDDKM LQCRVFAFGD
351 TQRYRLGPNY LTLPVNAPKC AHHNNHYDGL MNVMHRDEEV DYFPSRHASL
401 RHAERFPIPN RVVTGKREKN VIPKQDNFKQ PGERYRSWAP DRQERFVRRW
451 AEQLAHPKVS YELRSIWISF LSKCDTSLGQ KVANRLNMRA NI
```

2) PREDICTED: catalase isozyme A [Musa acuminata subsp. Malaccensis]; Protein View: XP_009398521.1

Pokrivenost proteinske sekvence: 42%

Detektovani peptidi su označeni *crvenom bojom*.

```
1 MDPYKFRPSS SFDTNFTTTN AGAPVWDDQ ALTVGSRGPI LLEDYHLVEK
51 IAHFARERIP ERVVHARGAS AKGFFECTHD VTHLTCADFL RAPGVQTPII
101 LRFSTVIHER GSPETIRDPG GFAVKFYTRE GNWDLGNNF PVFFIRDGIK
151 FPDVIHAFKP NPKSHVQEYW RVDFLSHHP ESLHTFFFLF DDVGVPDYR
201 HMEGFGVNTY TFVNKEGKVN YVKFHWKPTC GVKCLEDEA IVVGGKNHSH
251 ATQDLYDSIA AGNYPEWKLF VQVMDPDTEG RYDFDPLDDT KTWPEDLLPL
301 QPVGRLVLRN NIDNFFSENE QLAFGPGLVV PGIYYSDDKM LQCRVFAFGD
351 TQRYRLGPNY LTLPVNAPKC AHHNNHYDGL MNVMHRDEEV DYFPSRHASL
401 RHAERFPIPN RIVTGKREKN VIPKQDNFKQ PGERYRTWAP DRQERFVRRW
451 AEQLAHPKVS YELRSIWISF LSKCDTSLGQ KVANRLNMRA NI
```

Enolaza banane:

1) PREDICTED: enolase [Musa acuminata subsp. malaccensis]

Pokrivenost proteinske sekvence: 29%

Detektovani peptidi su označeni *crvenom bojom*.

```
1 MVRITSVKAR QIFDSRGNPT VEVDLRCDDG TFARAAVPSG ASTGVYEALE
51 LRDGGSYDLG KGVLKAVENV NAIIPALIG KDPTEQAQID NFMVQQLDGT
101 QNEGWCKQK LGANAILAVS LAVCKAGASV KKIPLYQHIA NLAGNKNLVL
151 PVPAFNVING GSHAGNKLAM QEFMILPVG A SFKEAMKMG VEVYHNLKAV
201 IKKKYQDAT NVGDEGGFAP NIQENKEGLE LLKTAIAKAG YTGKVVIGMD
251 VAASEFYSEK DKTYDLNFK E ENNDGSQKIS GDSLKNVYKS FVSEYPIVSI
301 EDPFDQDDWI HYAKLTTEEIG EQVQIVGDDL LVTNPTRVAK AIKEKACNAL
351 LLKVNQIGSV TESIEAVKMS KHAGWGMAS HRSGETEDTF IADLSVGLAT
```

401 GQIKTGAPCR SERLAKYNQL LRIEELGAA AVYAGAKFRA PVQPY

2) PREDICTED: enolase-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]

Pokrivenost proteinske sekvence: 37%

Detektovani peptidi su označeni *crvenom bojom*.

1 MVTIKSVKAR QIFDSRGNPT VEVDLHCDDG TFARAAVPSG ASTGVYEALE
51 LRDGGS DYLG KGV LKAVENV NTIIAPALIG KDPTEQAQID NFMVQQLDGT
101 QNEWGWCKQK LGANAILAVS LALCKAGASV KKIPLYQHIA NLAGNKNLVL
151 PVPAFNVING GSHAGNKLAM QEFMILPVGA SSFKEAMKMG VEVYHNLKAV
201 IKKKGQDAT NVGDEGGFAP NIQENKEGLE LLKTAIAKAG YTGKVVIGMD
251 VAASEFYSEK DKTYDLNFKE ENNDGSQKIS GDSLKNVYKS FVSEYPIVSI
301 EDPFDQDDWT HYAKMTEEIG DKVQIVGDDL LVTNPNTRVAK AIKEKSCNAL
351 LLKVNQIGSV TESIEAVKMS KHAGWVMAS HRSGETEDTF IADLSVGLAT
401 GQIKTGAPCR SERLAKYNQL LRIEELGAA AVYAGAKFRA PVEPY

Mus a 2:

1) endochitinase, partial [Musa acuminata AAA Group]; Protein View: AAL05885.1

Pokrivenost proteinske sekvence: 62%

Detektovani peptidi su označeni *crvenom bojom*.

1 GTRRNDAACP GKGFYTYNAF IAAANSFSGF GTTGDDATK REIAAFLAQT
51 SHETTGGWAT APDGPYAWGY CFVQEQNPPS DYCVAQQWP CAAGKYYGR
101 GPIQISFNYN YGPAGRAIGS DLLNNDLVA TDATISFKTA LWFWMTPQSP
151 KPSCHDVITG RWTPSNADRA AGR LPGYGV T NIINGGLEC GKGDARVAD
201 RIGFYKRYCD LLGVS YGDNL DCYNQSPFT

2) putative chitinase [Musa acuminata]; Protein View: CAC81812.1

Pokrivenost proteinske sekvence: 45%

Detektovani peptidi su označeni *crvenom bojom*.

1 MPRAAGIRHE VIFTLASSLG AFAEQCGRQA GGALCPGGLC CSQFGWCGNT
51 DPYCGKDCQS QCGSGGSGG GSGGSVGSII SSSLFEQMLK HRNDAACPGK
101 GFYTYNAFIA AANSFSGFGT TGDDATKRE IAAFLAQTSH ETTGGWATAP
151 DGPYAWGYCF VQEQNPPSDY CVASSQWPCA AGKYYGRGP IQISFNINYG
201 PAGRAIGSDL LNNPDLVATD ATISFKTALW FWMTPQSPKP SCHDVITGRW
251 TPSNADRAAG RLPYGVTTN IINGGLECGK GSDARVADRI GFYKRYCDLL
301 GVS YGDNLDC YNQSPFT

Mus a 4:

1) Chain A, Resolution Of The Structure Of The Allergenic And Antifungal Banana Fruit Thaumatin-like Protein At 1.7a; Protein View: gj|88191901

Pokrivenost proteinske sekvence: 26%

Detektovani peptidi su označeni *crvenom bojom*.

```
1 ATFEIVNRCS YTVWAAAVPG GGRQLNQGQS WTINVNAGTT GGRIWGRGTC
51 SFDGSGRGRC QTGDCGGVLS CTAYGNPPNT LAEFALNQFN NLDFFDISLV
101 DGFNVPMDFS PTSGGCRGIR CAADINGQCP GALKAPGGCN NPCTVFKTDQ
151 YCCNSGACSP TDYSQFFKRN CPDAYSYPKD DQTTFTFCPG GTNYRVVFCP
```

Mus a 5:

1) beta-1,3-glucanase, partial [Musa acuminata AAA Group]; Protein View: AAF08679.1

Pokrivenost proteinske sekvence: 55%

Detektovani peptidi su označeni *crvenom bojom*.

```
1 LVAVPTRVQS IGVCYGLGN NLPPPSEVVS LYKSNNIARM RLYDPNQAAL
51 QALRNSNIQV LLDVPRSDVQ SLASNPSAAG DWIRNVVAY WPSVSFRYIA
101 VGNELIPGSD LAQYILPAMR NIYNALSSAG LQNQIKVSTA VDTGVLGTSY
151 PPSAGAFSSA AQAYLSPIVQ FLASNGAPLL VNVYPYFSYT GNPQISLPY
201 ALFTASGVVQ QDGRFSYQNL FDAIVDAVFA ALERVGGANV AVVVSESGWP
251 SAGGGAEAST SNAQTYNQNL IRHVGGGTPR RPKGEIEAYI FEMFNENQKA
301 GGIEQNFGLF YPNKQPVYQI SF
```

2) beta-1,3-glucanase [Musa acuminata]; Protein View: ABU40624.1

Pokrivenost proteinske sekvence: 47%

Detektovani peptidi su označeni *crvenom bojom*.

```
1 MATKASLSIK GFALLVSVLV AVPTRVQSIG VCYGLGNL PPPSEVVS LY
51 KSNNIARMRL YDPNQAALQA LRNSNIQVLL DVPRSDVQSL ASNPSAAGDW
101 IRRNVVAYWP SVSFRYIAVG NELIPGSDLA QYILPAMRNI YNAFVLGWPA
151 KTRFRVSTAV DTGVLNTSYP PSAGAFSSAA QAYLSPIVQF LASNGAPLLV
201 NVYPYFSYTG NPGQISLPYA LFTASGVVQ DGRFSYQNLF DAIVDAVFAA
251 LERVGGANVA VVVSESGWPS AGGGAEASTS NAQTYNQNL RHVGGGTPRR
301 PGKEIEAYIF EMFNENQKAG GIEQNFGLFY PNKQPVYQIS F
```

3) beta-1,3-glucanase [Musa x paradisiaca]; Protein View: ABJ98942.1

Pokrivenost proteinske sekvence: 41%

Detektovani peptidi su označeni *crvenom bojom*.

```
1 MATKASLSIK GFALLVSVLV AVPTAQSIG VCYGLGNL PPPSEVVS LY
51 KSNNIARMRL YDPNQAALQA LRNSNIQVLL DVPRSDVQSL ASNPSAAGDW
```

101 IRRNVVAYWP SVSFRYIavg NELIPGSDLA QYILPAMRNI YNALSSAGLQ
 151 NQIKVSTAVD TGVLDKSYPP SAGAFSSAAQ AYLSPIVQFL ASNGAPLLVN
 201 VYPYFSYTGn PGQISLPYAL FTASGVVVQD GRFSYQNLFD AIVDAVFAAL
 251 ERVGGANVAV VVSESGWPSA GGGAEASTSN ARTYNQNLIR HVGGGTPrRP
 301 GKEIEAYIFE MFNENQKAGG IEQNFGLFYP NKQPvYQISF

Tabela 4.1. sadrži podatke o svim proteinima banane koje smo detektovali na 2D mapi. U tabeli je naznačeno da li su ovi proteini prepoznati kao alergeni banane, kao i to da li se analogni proteini iz drugih izvora u literaturi pominju kao alergeni.

Tabela 4.1. Svi identifikovani proteini banane:

Redni br.	Pristupni br.	Naziv proteina i njegove izoforme u okviru NCBI baze podataka	% pokrivenosti sekvence	MM/pI	Registrovani alergeni banane (WHO/IUIS)	Iz kojih drugih izvora je protein registrovan kao alergen (WHO/IUIS)
1	1Z3Q_A	Thaumatococcus-like protein	26	21218/6.34	Mus a 4 (<i>Musa acuminata</i> - banana)	Jun v 3 (<i>Juniperus virginiana</i> – evropski crveni kedar), Mal d 2 (<i>Malus domestica</i> – jabuka), Pru av 2 (<i>Prunus avium</i> - trešnja), Pru p 2 (<i>Prunus persica</i> - breskva), Cup s 3 (<i>Cupressus sempervirens</i> - čempres), Act d 2 (<i>Actinidia deliciosa</i> – kivi)
	XP_009406737	PREDICTED: protein P21-like [<i>Musa acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i>]	51	25060/7.34		
2	CAC81812	Putative chitinase [<i>Musa acuminata</i>]	64	34301/6.84	Mus a 2 (<i>Musa acuminata</i> – banana)	Cas s 5 (<i>Castanea sativa</i> – kesten), Cof a 1 (<i>Coffea arabica</i> - kafa), Der f 15 (<i>Dermatophagoides farinae</i> – američke grinje iz prašine), Der p 15 (<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> – evropske grinje iz prašine), Hev b 11 (<i>Hevea brasiliensis</i> - lateks), Per a 12 (<i>Periplaneta americana</i> – američka bubašvaba), Pers a (<i>Persea americana</i> - avokado), Trips 1 (<i>Triplochiton scleroxylon</i> - abači), Zea m 8 (<i>Zea mays</i> - kukuruz), Ziz m 1 (<i>Ziziphus mauritiana</i>)
	AAL05885	Endochitinase, partial [<i>Musa acuminata</i> AAA Group]	63	25133/7.66		
3	AIT56226	beta-1,3 glucanase [<i>Musa</i> AB Group]	52	36444/8.74	Mus a 5 (<i>Musa acuminata</i> - banana)	Hev b 2 (<i>Hevea brasiliensis</i> - lateks), Ole e 9 (<i>Olea europaea</i> - maslina)
	ADN67614	beta-1,3 glucanase [<i>Musa</i> AB Group]	56	33903/8.96		
	AAB82772	beta-1, 3-glucanase [<i>Musa acuminata</i> AAA Group]	43	36356/8.84		

	ABJ98942	beta-1,3-glucanase [Musa x paradisiaca]	51	36413/8.82		
	AAF08679	beta-1,3-glucanase, partial [Musa acuminata AAA Group]	55	34511/6.81		
	ABU40624	beta-1,3-glucanase [Musa acuminata]	47	36704/9.04		
	ACP43630	beta-1,3-glucanase [Musa AB Group]	31	32735/7.88		
	ADG36438	glucanase, partial [Musa acuminata AAA Group]	30	33479/5.47		
4	XP_009401920	PREDICTED: enolase-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	38	48255/5.67	Nije prepoznat kao alergen	Alt a 6 (<i>Alternaria alternata</i> - alternarija), Asp f 22 (<i>Aspergillus fumigatus</i> - obična plesan), Cla h 6 (<i>Cladosporium herbarum</i> – biljna plesan), Cur l 2 (<i>Curvularia lunata</i> , sinonim: <i>Cochliobolus lunatus</i>), Cyn d 22w (<i>Cynodon dactylon</i>), Gad m 2 (<i>Gadus morhua</i> - bakalar), Gal d 9 (<i>Gallus domesticus</i> – kokoška), Hev b 9 (<i>Hevea brasiliensis</i> - lateks), Pen c 22 (<i>Penicillium citrinum</i>), Rho m 1 (<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> - kvasac), Sal s 2 (<i>Salmo salar</i> – losos)
	XP_009384633	PREDICTED: enolase [Musa acuminata subsp. malaccensis]	29	48233/5.71		
5	ABV55108	catalase 2 [Musa acuminata AAA Group]	48	57325/6.75	Nije prepoznat kao alergen	Pen c 30 (<i>Penicillium citrinum</i>)
	XP_009398521	PREDICTED: catalase isozyme A [Musa acuminata subsp. malaccensis]	46	57380/6.75		
6	XP_009390960	formate dehydrogenase 1, mitochondria [Musa acuminata subsp. malaccensis]	40	42491/8.36	Nije prepoznat kao alergen	Nije prepoznat kao alergen
	XP_0093909601	PREDICTED: formate dehydrogenase 1, mitochondrial [Musa acuminata subsp. Malaccensis]	33	42491/8.36		
7	XP_009407534	PREDICTED: alpha-glucan phosphorylase, H isozyme [Musa acuminata subsp. Malaccensis]	17	95435/6.09	Nije prepoznat kao alergen	Nije prepoznat kao alergen

	XP_010030975	PREDICTED: heat shock cognate 70 kDa protein 2-like [Eucalyptus grandis]	14	71624/5.14		
8	XP_004492128	PREDICTED: heat shock cognate 70 kDa protein 2-like [Cicer arietinum]	30	70896/5.07	Nije prepoznat kao alergen	Nije prepoznat kao alergen
	XP_009388623	PREDICTED: heat shock cognate 70 kDa protein 2-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	24	71514/5.22		
9	XP_009413746	PREDICTED: phosphoglucomutase, chloroplastic [Musa acuminata subsp. malaccensis]	18	68272/5.73	Nije prepoznat kao alergen	Nije prepoznat kao alergen
10	XP_009418669	PREDICTED: UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase [Musa acuminata subsp. malaccensis]	46	51485/5.57	Nije prepoznat kao alergen	Nije prepoznat kao alergen
	XP_009415939	PREDICTED: adenosylhomocysteinase [Musa acuminata subsp. Malaccensis]	31	53709/5.95		
11	XP_009403608	PREDICTED: adenosylhomocysteinase-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	21	53773/5.79	Nije prepoznat kao alergen	Nije prepoznat kao alergen
	XP_009413566	PREDICTED: adenosylhomocysteinase-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	21	53828/5.76		
12	XP_009391194	PREDICTED: pectinesterase-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	16	54608/5.15	Nije prepoznat kao alergen	Nije prepoznat kao alergen
13	XP_009407067	PREDICTED: polyphenol oxidase, chloroplastic-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	23	64392/6.43	Nije prepoznat kao alergen	Nije prepoznat kao alergen
14	XP_009386049	PREDICTED: probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolyase protein 32 [Musa acuminata subsp.	25	33211/7.04	Nije prepoznat kao alergen	Nije prepoznat kao alergen

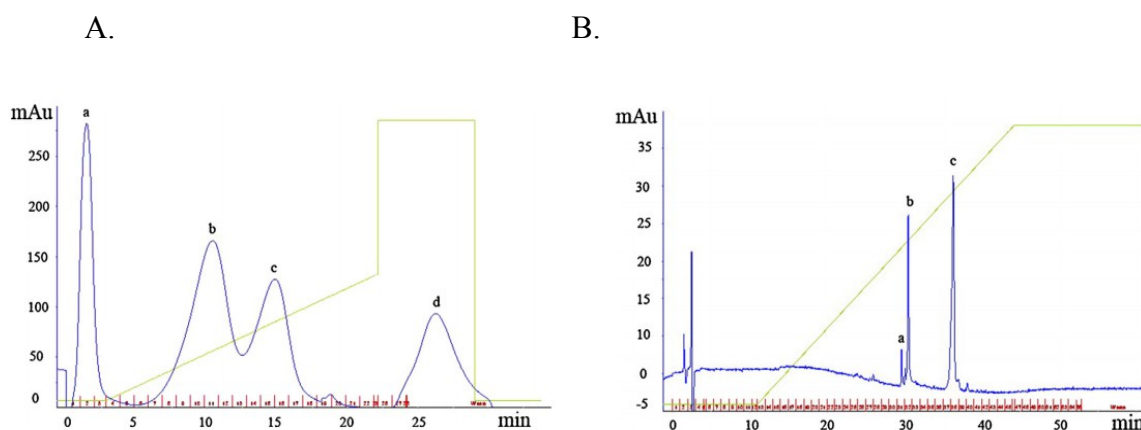
Malaccensis]						
15	XP_00938 8829.1	isoflavone reductase-like protein [Musa acuminata subsp. malaccensis]	37	34070/6,10	Nije prepoznat kao alergen	Nije prepoznat kao alergen
16	XP_00941 1401.1	RRP15-like protein [Musa acuminata subsp. malaccensis]	32	33251/8.58	Nije prepoznat kao alergen	Nije prepoznat kao alergen
17	AOI33691 .1	AP2/ERF and B3 domain-containing protein, partial [Musa ABB Group]	33	36472/9,89	Nije prepoznat kao alergen	Nije prepoznat kao alergen
18	XP_01868 3520.1	dnaJ protein homolog 1-like isoform X4 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	10	22733/5,97	Nije prepoznat kao alergen	Nije prepoznat kao alergen
	XP_01868 3519.1	dnaJ protein homolog 1-like isoform X3 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	10	22195/6,32	Nije prepoznat kao alergen	Nije prepoznat kao alergen
	XP_01868 3517.1	dnaJ protein homolog 1-like isoform X1 [Musa acuminata subsp. Malaccensis]	9	25870/6,95	Nije prepoznat kao alergen	Nije prepoznat kao alergen
19	XP_00939 7231.2	transcription termination factor MTERF15, mitochondrial [Musa acuminata]	19	55358/9,40	Nije prepoznat kao alergen	Nije prepoznat kao alergen

4.6 Prečišćavanje glavnih alergena banane (Mus a 2, Mus a 4 i Mus a 5)

U literaturi nema navoda o tome da su proteini banane Mus a 2, Mus a 4 i Mus a 5 simultano izolovani do sada. Naš cilj je bio da pronađemo jednostavan način da dobijemo prečišćene pojedinačne alergene iz banane koji se mogu primeniti u kliničkoj dijagnostici. Glavni alergeni banane označeni sa Mus a 2, Mus a 4 i Mus a 5 su prečišćeni kroz tri hromatografska koraka: jonoizmenjivačkom hromatografijom na QAE-*Sephadex* A-50 matriksu, drugom jonoizmenjivačkom hromatografijom na *Hi Trap* SP FF koloni (V=1 mL, *GE Healthcare*, Upsala, Švedska), i na kraju reverzno-

faznom hromatografijom ($V=1.667$ mL, *Supelco*, Belfont, Pensilvanija, SAD).

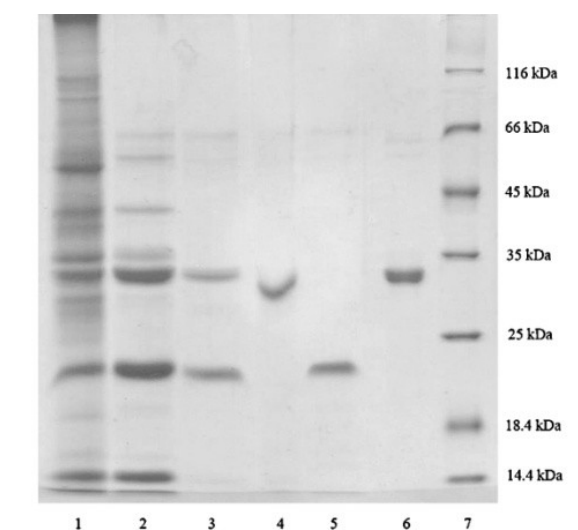
Prečišćenost proteina je praćena SDS PAGE tehnikom (slika 4.8). Koncentracije prečišćenih proteina su određene na osnovu molarnih ekstinkcionih koeficijenata (www.expasy.com), koji su izračunati na osnovu aminokiselinske sekvence proteina (*UniProt* Q8VXF1, O22322 i O22317).



Slika 4.7. A. Hromatografsko prečišćavanje na HiTrap SP koloni pri čemu se tokom 5-15 min eluira smeša sva tri alergena. B. Revezno-fazna hromatografija kada se odvajaju Mus a 2, Mus a 4 i Mus a 5 (redom prikazano na slici u vidu pikova a, b i c).

Korišćenjem ovog protokola, kroz tri hromatografska koraka smo dobili 3,6 mg Mus a 2, 23,5 mg Mus a 4 i 27,2 mg Mus a 5 iz 160 g pulpe banane kao polaznog materijala.

Fracije koje su dobijene tokom prečišćavanja su analizirane i elektroforetski pomoću SDS PAGE tehnike u redukujućim uslovima. Rezultat je prikazan na slici 4.8.



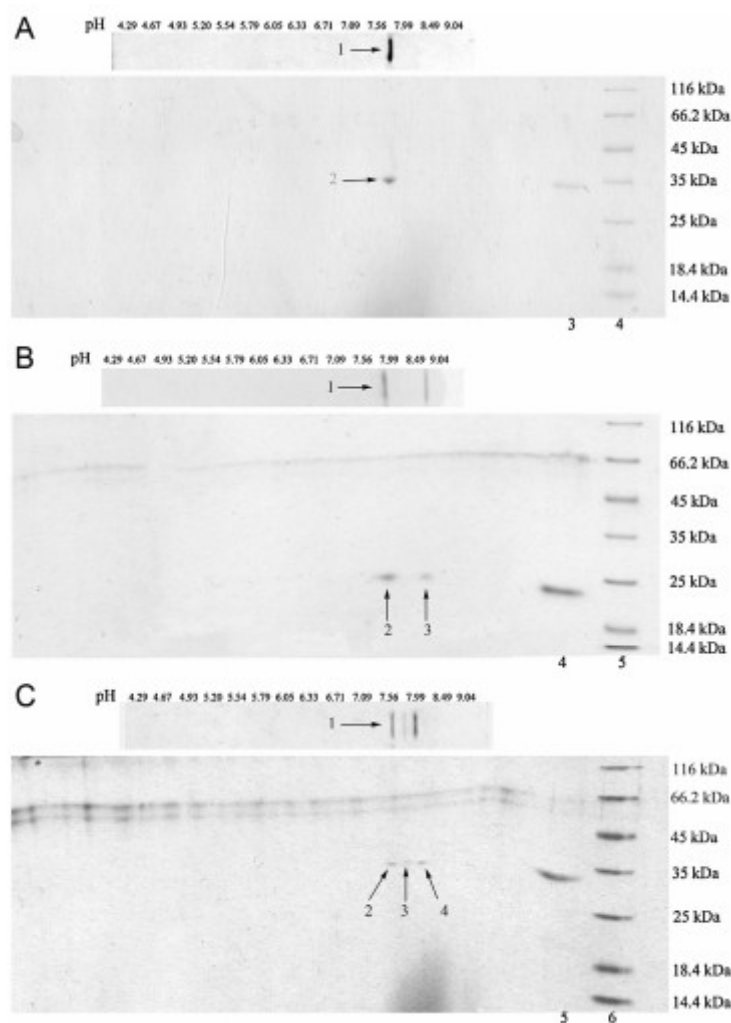
Slika 4.8. Praćenje prečišćavanja prirodnih Mus a 2, Mus a 4 i Mus a 5. 1. ekstrakt banane, 2. uzorak nakon QAE jonoizmenjivačke hromatografije, 3. uzorak nakon SP jonoizmenjivačke hromatografije, 4. prečišćeni Mus a 2 nakon reverzno-fazne hromatografije, 5. prečišćeni Mus a 4 nakon reverzno-fazne hromatografije, 6. prečišćeni Mus a 5 nakon reverzno-fazne hromatografije, 7. molekularni markeri.

4.6.1 Biohemijska karakterizacija prečišćenih Mus a 2, Mus a 4 i Mus a 5

U cilju karakterizacije prečišćenih Mus a 2, Mus a 4 i Mus a 5 urađene su 2D elektroforeze, MS analiza i N-terminalno sekvenciranje.

2D elektroforeze su potvrdile čistoću ova tri proteina. Rezultati su prikazani na slici 4.9 (A, B, C).

IEF razdvajanje je pokazalo prisustvo izoformi izolovanih proteina. 2D PAGE rezultat razdvajanja Mus a 2 je pokazao prisustvo jedne dominantne izoforme sa pI 7,7 i molekulskom masom 31 kDa. Kod Mus a 4 smo uočili da postoje dve dominantne izolovane izoforme sa pI 7,8 i 8,4, a sa molekulskom masom 21 kDa. Izolovani Mus a 5 alergen pokazao je prisustvo tri dominantne izoforme sa pI vrednostima 7,6, 7,75, i 7,9, respektivno i molekulskom masom 33 kDa.



Slika 4.9. 2D PAGE analiza prečišćenih alergena banane. (A) Mus a 2: 1. IEF, 2. 2D PAGE, 3. SDS PAGE, 4. molekularni markeri. (B) Mus a 4: 1. IEF, 2,3. 2D PAGE, 4. SDS PAGE, 5. molekularni markeri. (C) Mus a 5: 1. IEF, 2,3,4. 2D PAGE, 5. SDS PAGE, 6. molekularni markeri.

Za potrebe N-terminalnog sekvenciranja proteini banane su razdvojeni SDS PAGE tehnikom, pa transferovani polu-suvim blotom na PVDF membrane (*Serva*, Hajdelberg, Nemačka). Delovi membrane na kojima se nalazi protein (utvrđeno CBB bojenjem) su isečeni i korišćeni za mikrosekvenciranje pomoću proteinskog sekvenatora koji je povezan sa PTH aminokiselinski analizatorom (*Procise*, *PE Biosystems*, Viterštatt, Nemačka). Edmanovom degradacijom je određeno prvih 7 aminokiselinskih ostataka na N-terminusu svakog od prečišćenih proteina, a njihov identitet je potvrđen pomoću programa koji poredi zadatu aminokiselinsku sekvencu sa aminokiselinskim

sekvencijama dostupnim u proteinskim bazama podataka (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

- Aminokiselinska sekvencija **EQXGXQA** je identifikovana kao N-terminus Mus a 2, gde prvo X označava cisteinski, a drugo X argininski ostatak.
- sekvencija **ATFEIVN** je prepoznata kao sekvencija N-terminus Mus a 4,
- dok je sekvencija **IGVXYGM** prepoznata kao N-terminus Mus a 5 i X odgovara cisteinskom ostatku.

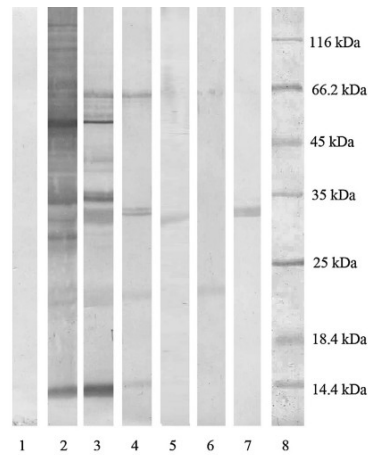
MS analiza je urađena nakon *in gel* tripsinske digestije. Rezultati su potvrdili da su izolovani čisti alergeni banane i da nije bilo prisutnih kontaminacija drugim proteinima. Rezultat je ukazao na prisustvo:

- dve izoforme Mus a 2 (NCBI CAC81812 i NCBI CAC81811),
- jedne izoforme Mus a 4 (NCBI 022322), i
- dve izoforme Mus a 5 (NCBI AAB82772 i NCBI ADG36438).

4.6.2 Ispitivanje antigenosti prečišćenih Mus a 2, Mus a 4 i Mus a 5

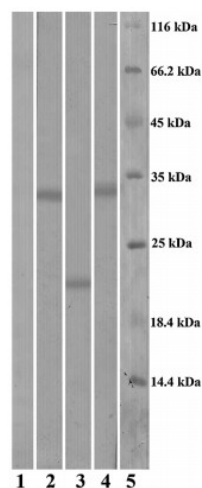
U cilju ispitivanja antigenosti izolovanih proteina banane korišćena je tehnika imunoblot. U te svrhe ova tri proteina su transferovana na NC membrane i inkubirana sa poliklonskim zečjim anti-banana antitelima proizvedenim na Institutu za virusologiju, vakcine i serume Torlak. Vezivanje antitela za protein banana je detektovano anti-zečjim antitelima obeleženim alkalnom fosfatazom.

Sva tri proteina su pokazala IgG reaktivnost na membrani, što je prikazano na slici 4.10.



Slika 4.10. Ispitivanje IgG reaktivnosti izolovanih proteina banane. 1. Kontrola antitela, 2. ekstrakt banane, 3. uzorak nakon prvog koraka prečišćavanja, 4. uzorak nakon drugog koraka prečišćavanja, 5. prečišćeni Mus a 2, 6. prečišćeni Mus a 4, 7. prečišćeni Mus a 5, 8. molekularni markeri obojeni Ponceu S bojom.

U cilju ispitivanja alergijskih osobina prečišćenih proteina banane takođe je korišćenja tehnika imunoblota. Urađena je SDS PAGE i proteini su transferovani sa gela na NC membranu koja je inkubirana sa pulom seruma pacijenata alergičnih na bananu. Na slici 4.11 prikazan je rezultat koji je potvrdio IgE reaktivnost izolovanih proteina. Slika 4.11 pokazuje da IgE iz seruma pacijenata specifično prepoznaje i vezuje se za sva tri prečišćena alergena banane.



Slika 4.11. Ispitivanje IgE reaktivnosti izolovanih proteina banane. 1. Kontrola antitela, 2. prečišćeni Mus a 2, 3. prečišćeni Mus a 4, 4. prečišćeni Mus a 5, 5. molekularni markeri obojeni Ponceu S bojom.

4.6.3 Primena prečišćenih Mus a 2, Mus a 4 i Mus a 5 u kliničkoj dijagnostici

U kliničkoj dijagnostici komercijalno dostupnim *ImmunoCap* testom je pokazano da kod dvadesetdevetogodišnje pacijentkinje ne postoji specifični IgE na bananu, dok su simptomi i imuno blot sa prečišćenim alergenima banane pokazali suprotno. Pacijentkinja je najpre imala alergijsku reakciju na kivi, a kroz dve nedelje je nakon 10-15 min od ingestije jedne polovine banane doživela anafilaktičku reakciju. Testiranje na klinici je urađeno korišćenjem *ImmunoCap* (*Pharmacia*, Uppsala, Švedska) diskova za detekciju IgE antitela na bananu i kivi. *ImmunoCap* ISAC (*Pharmacia*, Uppsala, Švedska) urađen je na pojedinačne alergene iz kivija, dok takav dijagnostički test za bananu nije komercijalno dostupan. Ovo testiranje je pokazalo da serum pacijenta pokazuje IgE reaktivnost ka alergenima kivija, ali ne i ka alergenima banane. Rezultat ovih testova je prikazan u tabeli 4.3.

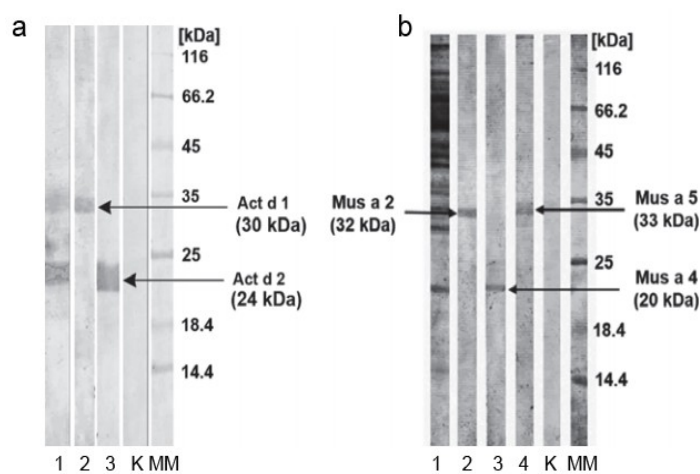
Tabela 4.3. Rezultat kliničkog testiranja pacijenta p-431.

Antigen / Ekstrakt ukupnih alergena		CAP-FEIA IgE (kIU/mL)	Antigen / Pojedinačni alergen	CAP-FEIA IgE (kIU/mL)	ISAC IgE (ISU-E)
Polen breze (<i>Betula</i> <i>verrucosa</i>)	Polen breze	negativno	Bet v 1	negativno	negativno
			Bet v 2	negativno	negativno
Banana (<i>Musa</i> <i>acuminata</i>)	Banana	negativno	Nedostupan dijagnostički reagens	Nedostupan dijagnostički reagens	Nedostupan dijagnostički reagens
Kivi (<i>Actinidia</i> <i>deliciosa</i>)	Kivi	0,679	rAct d 1	Nedostupan dijagnostički reagens	negativno
			rAct d 2	Nedostupan dijagnostički reagens	pozitivno
			rAct d	Nedostupan dijagnostički reagens	negativno
			rAct d	negativno	negativno
Prirodni lateks	Ekstrakt lateksa	negativno	Hev b 1, 3, 5, 6, 8	nije određeno	negativno

Ovi rezultati rutinske IgE detekcije u kliničkoj dijagnostici su zapravo pokazali da je serum (p-431) IgE reaktivan u odnosu na rekombinantno proizveden TLP iz kivija (rAct d 2), ali ne i na druge alergene kivija, kao i da ne pokazuje IgE reaktivnost na alergene banane i lateksa.

Da bi bila proverena IgE reaktivnost razvijen je imunoblot na proteine ekstrakta kivija i prečišćene alergene Act d 1 i Act d 2, kao i na ukupni ekstrakt banane i prečišćene alergene Mus a 2, Mus a 4 i Mus a 5. Rezultat je prikazan na slici 4.12.

Pojedinačni alergeni banane koji su korišćeni u IgE imunoblotu nisu dostupni za rutinsku kliničku dijagnostiku. IgE imunoblot je ukazao da su rutinski testovi dali lažno negativne rezultate, što korelira sa reakcijama pacijenta pri ingestiji kivija i banane. Molekulska osnova kliničke reakcije na kivi i bananu se može objasniti ukrštenom reaktivnošću koja je delom posledica sličnosti u sekvenci Act d 2 i Mus a 4 koji predstavljaju TLP iz kivija i banane, redom. Identičnost aminokiselinske sekvence koji smo dobili poređenjem je 64%.



Slika 4.12. (a) IgE imunoblot alergena iz kivija sa serumom p-431. 1. ekstrakt kivija, 2. Act d 1, 3. Act d 2, K. Kontrola sekundarnih i tercijarnih antitela, MM. Molekulski markeri. (b) IgE imunoblot alergena banane sa serumom p-431. 1. ekstrakt banane, 2. Mus a 2, 3. Mus a 4, 4. Mus a 5, K. Kontrola sekundarnih i tercijarnih antitela, MM. Molekulski markeri.

```

TLP Ban 3   SSTILSFLLFALLLALSRAVTFEIVNGCPFTVWPAAVPGGGLQLDQGQTWVLDVNAGTTG 62
          S ++ + L A L +R TF I+N CPFTVW AAVPGGG +LD+GQ W+++ GT G
TLP kivi 6   SLSLSALLFIAFLFTCARGATFNIIINNCPFTVWAAAVPGGGKRLDRGQNWIINPGAGTKG 65

Query 63   GRIWGRTGCSFDGSGSGSCQTGDCGGVLDCKGYGSPPNTVAEFAVGQFNN---FDVSLVD 119
          R+W RTGC+FDG+G G CQTGDC G+L C+ +G PPNT+AE+A+ QFNN FD+SLVD
Sbjct 66   ARVWPRTGCNFDGAGRGKQCTGDCNGLLQCQAFGQPPNTLAEYALNQFNNLDFDISLVD 125

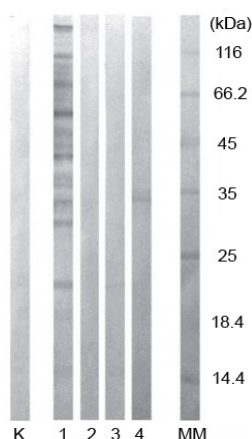
Query 120  GFNVPMEF-----GSCRAIRCSADINGRCPAELRTPGGCNNPCTVFKTDEYCCNSGSCGP 174
          GFNV MEF G R I+C+ADING+CP ELR PGGC>NNPCTVFKTD+YCCNSG+CG
Sbjct 126  GFNVAMEFSPTSGGCTRGIKCTADINGQCPNELRAPGGC>NNPCTVFKTDQYCCNSGNCGL 185

Query 175  TTYSKFFKRNCPDAYSYPKDDQTSTFTCPPGGTNYKVIFCP 214
          T +SKFFK CPDAYSYPKDDQTSTFTCP GTNYKV+FCP
Sbjct 186  TNFSKFFKDRCPDAYSYPKDDQTSTFTCPAGTNYKVVFCP 225

```

Gornji red se odnosi na sekvencu TLP proteina iz banane, dok se donji red odnosi na sekvencu TLP proteina iz kivija. Poređenje je urađeno preko *online* dostupnog programa (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Žutom bojom su označeni IgE epitopi Mus a 4 [143]. Sličnost koju nalazimo u aminokiselinskoj sekvenci predstavlja jedno od mogućih objašnjenja ukrštene reaktivnosti banane i kivija.

Dijagnostika alergije na bananu u IgE imunoblotu je takođe urađena u slučaju dvadesetšestogodišnjeg pacijenta koji je doživeo anafilaktičku reakciju 20 min nakon unosa banane. Pacijent nije konzumirao drugu hranu satima pre toga. Najpre je doživeo trnjenje u ekstremitetima, napad astme i zatim je izgubio svest. Kod pacijenta je prethodno konstatovana alergija na jabuku, mačju dlaku, paradajz i belo brašno, kao i kontaktni dermatitis u kontaktu sa krompirom. Pacijent je svakodnevno iz profesionalnih razloga nosio rukavice što je prouzrokovalo svakodnevni svrab i oštećenja na koži, i dijagnostifikovan atopijski dermatitis. Prik-prik test je pokazao pozitivnu reakciju na bananu (10 mm), kivi (7 mm) i lateks (4 mm). Urađen je IgE imunoblot gde je pokazana IgE reaktivnost seruma pacijenta na prečišćene alergene iz banane. Rezultat IgE imunoblota je prikazan na slici 4.13.



Slika 4.13. IgE imunoblot alergena iz banane sa serumom p-315. K. Kontrola antitela, 1. ekstrakt banane, 2. Mus a 2, 3. Mus a 4, 4. Mus a 5, MM. Molekulski markeri.

Na slici 4.13. je pokazana IgE reaktivnost na više proteinskih traka iz ekstrakta banane, reaktivnost sa Mus a 5, i slaba reaktivnost sa Mus a 4.

4.7 Proizvodnja i prečišćavanje katalaze iz banane

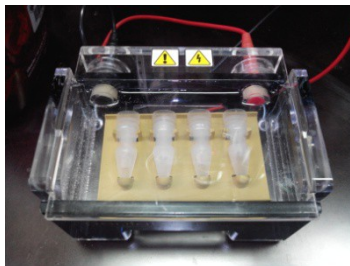
Nakon što je pomoću rezultata 2D imunoblota i MS analize proteina banane sa 2D mape primećeno da je katalaza potencijalni alergen banane, pokušano je i izolovanje ovog proteina. Na 8%-tni poliakrilamidni gel bez SDS-a (dimenzija 16 cm×15,5 cm×1,5 mm), u preparativni bunar je nanoseno 2,5 mL koncentrovanog ekstrakta banane (C=6,08 mg/ml proteina) sa 625 µL 5X nativnog PUZ-a. Nativna elektroforeza je urađena na *Hoefler* sistemu, uz korišćenje pufera za nativnu elektroforezu (bez SDS-a). Kao marker praćenja elektroforeze je korišćena BPB boja koja ulazi u sastav pufera za pripremu uzorka.

Po završetku elektroforeze isečena je uzdužna traka gela koja služi za zimogramsku detekciju katalaze u gelu. Zimogramska detekcija na delu gela je urađena u cilju pozicioniranja katalaze duž celog gela nakon elektroforeze.



Slika 4.14. Zimogramska detekcija katalaze iz banane na preparativnom gelu.
Prozirni region na tamno zelenoj pozadini je posledica katalazne aktivnosti.

Komadi gela koji pokazuju katalaznu aktivnost su usitnjeni i iz njih je elektroelucijom ekstrahovana katalaza. Elektroelucija je izvođena u puferu za nativnu PAGE pri naponu od 100 V na sobnoj temperaturi, u trajanju od 2 h.



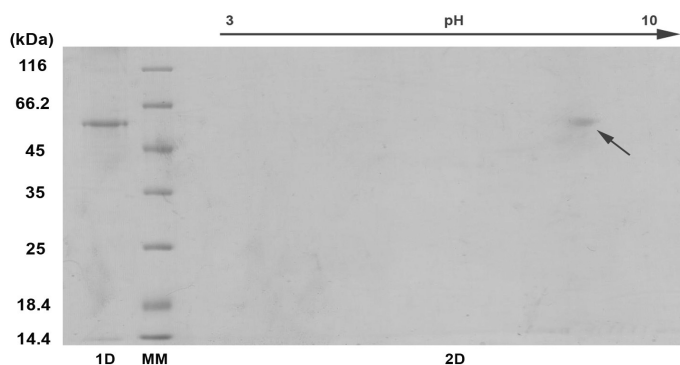
Slika 4.15. Aparatura za elektroeluciju.

Nakon elektroelucije je urađena SDS PAGE u cilju provere čistoće eluiranih proteina. Iako je u dobijenim eluatima detektovana katalazna aktivnost, usled niske koncentracije eluiranog proteina od interesa pristupilo se proizvodnji rekombinantne katalaze iz banane. Gen za katalazu je poručen na osnovu sekvence dostupne u *Uniprot* bazi podataka [116] a koja se poklapa sa sekvencom identifikovane katalaze na 2D mapi proteina banane.

Gen je ukloniran u pET 23b ekspresioni vektor, koji je transformacijom ubačen u SOX *E. coli* bakterijski soj koji koekspirira i *Erv1p* sulfidril oksidazu [204], dobijen

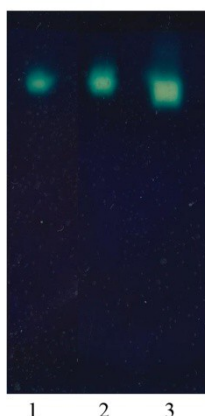
ljubaznošću Prof. dr Arija de Marka (*Ario de Marco*). Protein je proizveden fermentacijom u LB tečnom medijumu tokom petočasovne ekspresije. Proizvedeni enzim je prečišćen metal afinitetnom (IMAC hromatografija na IDA *Sepharose* 6B matriksu) i jonoizmenjivačkom hromatografijom (anjonska hromatografija na MiniQ koloni (*GE Healthcare*, SAD)) i pokazano je da je tokom ovih postupaka očuvao svoju enzimsku aktivnost. Kao rezultat prečišćavanja dobili smo jednu traku na 1D SDS PAGE i jednu tačku na 2D elektroforezi. 2D PAGE prečišćenog rekombinantnog proteina je prikazana na slici 4.16.

Katalaza se prilikom IEF pozicionirala u baznom regionu što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u 2D PAGE ukupnih proteina ekstrakta banane. *pI* vrednost (8,7) je određena na osnovu *pI* markera koji su razdvojeni na posebnoj IPG tračici i obojeni CBB bojom. Teoretsko *pI* (izračunato na osnovu aminokiselinske sekvence) proteina je 6,75. Eksperimentalni podaci dobijeni na osnovu analize ukupnih proteina banane i analizom rekombinantne katalaze banane (molekulska masa i *pI* vrednost) se međusobno poklapaju.



Slika 4.16. 2D PAGE banana katalaze. 1D katalaza analizirana 2D PAG elektroforezom. 1D. Katalaza nakon jednodimenzionalne SDS PAGE, MM. Molekulski markeri, 2D. Dvodimenzionalna PAGE katalaze. Strelica ukazuju na poziciju katalaze na gelu.

Enzimska aktivnost je pokazana zimogramskom detekcijom katalazne aktivnosti u gelu, kao što je prikazano na slici 4.17.



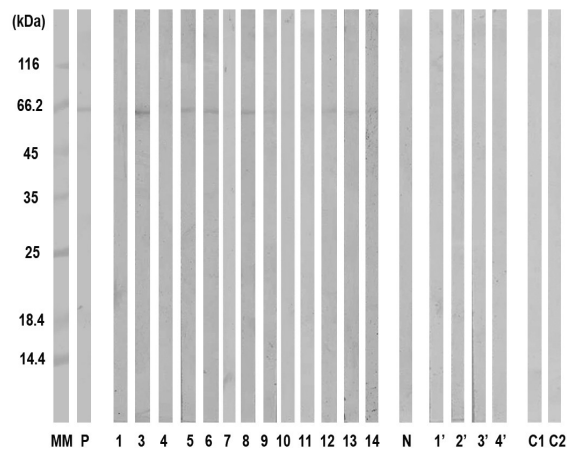
Slika 4.17. Zimogramska detekcija katalazne aktivnosti u gelu. 1. Prečišćena katalaza banane proizvedena rekombinantnom tehnologijom, 2. katalazna aktivnost detektovana u ekstraktu banane, 3. katalazna aktivnost detektovana u uzorku komercijalne katalaze iz goveđe jetre (Serva, Hajdelberg, Nemačka).

Katalaza proizvedena rekombinantnom DNK tehnologijom je enzimski aktivna, što ukazuje na pravilno formirane sekundarne i tercijarne strukture proteina.

4.7.1 Ispitivanje IgE reaktivnosti katalaze iz banane

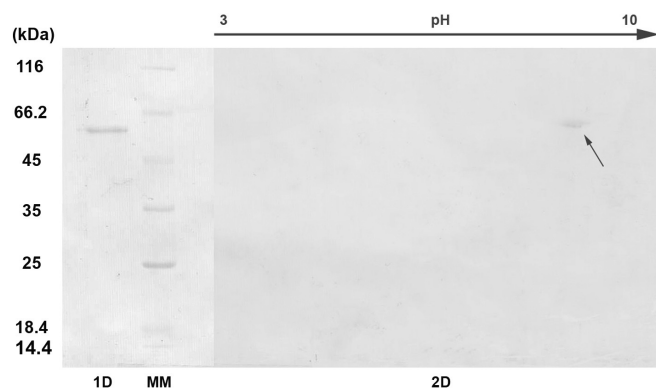
IgE reaktivnost rekombinantne katalaze je potvrđena u IgE imunoblotu korišćenjem 13 pojedinačnih seruma pacijenata alergičnih na bananu. Korišćeni su isti serumi koji su korišćeni za razvijanje alergograma.

Specifični IgE je detektovan pomoću anti-humanih kozjih antitela (1:5000, Sigma-Aldrich, Nemačka) sa kojim su membrane inkubirane u trajanju od 1 h, i zatim inkubacijom sa zečjim anti-kozjim IgG antitelima obeleženim alkalnom fosfatazom (1:30000, Sigma-Aldrich, Nemačka) u trajanju od 1 h. Kao negativne kontrole su korišćeni serumi pacijenata alergičnih na grinje, i bez kliničke istorije alergije na bananu. Rezultat ovog imunoblota je prikazan na slici 4.18. i pokazuje da je 8 od 13 pacijenata alergičnih na bananu senzitivisano na katalazu iz banane.



Slika 4.18. Ispitivanje IgE reaktivnosti rekombinantno proizvedene katalaze iz banane u imunoblotu. MM. Molekulski markeri, P. provera transfera katalaze sa gela na membranu Ponceau S bojenjem, 1, 3-14. reaktivnost rekombinantne katalaze u imunoblotu sa pojedinačnim serumima (redoled kao u alergogramu), N. kontrola sa serumom zdrave osobe, 1'-4'. kontrole sa serumima pacijenata alergičnih na grinje, C1. kontrola tercijarnih antitela, C2. kontrola sekundarnih i tercijarnih antitela.

Urađen je i 2D IgE imunoblot prečišćene rekombinantne katalaze banane, a rezultat je prikazan na slici 4.19.



Slika 4.19. 2D IgE imunoblot rekombinantne katalaze. 1D. Katalaza nakon jednodimenzionalne SDS PAGE (obojeno Ponceu S bojom), MM. Molekulski markeri (obojeno Ponceu S bojom), 2D. Dvodimenzionalna PAGE katalaze. Strelica ukazuje na poziciju katalaze na membrani.

Rezultati prikazani na slikama 4.18. i 4.19. pokazuju da je proizvedena katalaza iz banane prečišćena i da je specifično prepoznata od strane IgE molekula iz seruma pacijenata alergičnih na bananu.

5 DISKUSIJA

Priprema pouzdanih dijagnostičkih reagenasa za ispitivanje alergije na voće je važna s obzirom na to da se ekstrakti voća sastoje od mešavine alergeni i nealergeni komponenti koje mogu dovesti do pogrešnog dijagnostikovanja alergija [124], usled varijacija u prisustvu proteolitičkih enzima, stadijuma zrenja i/ili uslova skladištenja koji prethode pripremi [127, 205, 206]. Ekstrakt banane pa i sveža banana koja se koristi u kožnim probama (direkno nanošenje voća na kožu) su se do sada u kliničkoj praksi pokazali kao nepouzdana dijagnostički materijali, bez obzira na to da li se radi o pacijentima koji su doživeli blage lokalne simptome alergije na bananu poput OAS ili onim koji su doživeli anafilaktičku reakciju nakon konzumiranja banane [100].

Dijagnostički reagensi koje smo pripremili su korišćeni u dijagnostici alergije na bananu, kod pacijenata kod kojih se alergija na bananu nije mogla utvrditi korišćenjem komercijalno dostupnih reagenasa uprkos jasnim kliničkim simptomima. Jedan od slučajeva je pacijent koji je doživeo anafilaktički šok nakon konzumacije banane, premda je u rutinskom bolničkom testiranju (*Immuno CAP, Thermo Fisher Scientific*) isprva je pokazano da je pacijent IgE-negativan na ekstrakt banane. Rezultat rutinski urađene dijagnostike nije korelirao sa kliničkom slikom, dok smo u imunoblot testiranju sa pojedinačnim alergenima banane pokazali da je pacijent alergičan na bananu. Rezultat dijagnostike pomoću prečišćenih alergena banane je u korelaciji sa alergijskom reakcijom ovog pacijenta. Ovim je ukazano na to da su značajni alergeni banane neadekvatno zastupljeni u komercijalno dostupnim ekstraktima alergena i da se dijagnostički reagensi moraju unaprediti zarad postizanja pouzdanih rezultata. Usled varijacija u ekspresiji alergena, teži se ka tome da se dijagnostički reagensi za alergije na voće unaprede tako što će se proizvesti i formirati paneli pojedinačnih alergena koji bi se koristili umesto ekstrakata voća u dijagnostici. Iz tih razloga je jedan od ciljeva ovog rada bio pripremiti i testirati dijagnostičke reagenasa koji sadrže prečišćene IgE reaktivne proteine banane.

Ispitivanja IgE reaktivnosti seruma pacijenata alergičnih na bananu i ukupnih proteina ekstrakta banane su pokazala prisustvo još uvek neidentifikovanih IgE reaktivnih proteina [99, 207] koje je potrebno okarakterisati kako bi se unapredile

kliničke metode za dijagnostiku i terapiju kod alergičnih pacijenata. Takođe je primećeno da su do sada okarakterisani alergeni banane proteini koji su među najzastupljenijim u ekstraktu, i njihova koncentracija u pulpi se povećava tokom zrenja [151], što je olakšalo njihovo prečišćavanje u dovoljnoj količini a zatim i karakterizaciju. To je bila značajna olakšica u razvoju metoda za simultano izolovanje Mus a 2, Mus a 3 i Mus a 5 prirodnih alergena banane koje smo izolovali i koristili u ovom radu.

Identifikacija novih alergena banane je postignuta razvojem 2D mape proteina banane koja je ujedno poslužila za visokorezolutivno razdvajanje proteina u gelu, i za razvoj 2D IgE imunoblota. Problem velikih varijacija u zastupljenosti proteina banane u uzorku je uklonjen upotrebom CPLL za potrebe razvoja reproduktivnog 2D PAGE. Pomoću CPLL metode uklonjen je višak dominantnih proteina, i istovremeno je obogaćen sadržaj proteinima koji su manje zastupljeni u polaznom uzorku ekstrakta banane. Cilj je bio da se uravnoteži prisustvo proteinskih vrsta prisutnih u ekstraktu banane kako bi se detektovali IgE reaktivni proteini koji su u ekstraktu minorno zastupljeni. Korak koji je prethodio upotrebi CPLL jeste uklanjanje ometajućih supstanci iz ekstrakta banane uključujući polifenolna jedinjenja, ugljene hidrate i soli iz ekstrakta. U literaturi je već mnogo puta opisan problem prisustva ovih jedinjenja ne samo u dijagnostici alergija na voće [124, 127, 205], već i u razvijanju 2D proteinskih mapa [208-211].

Razvojem 2D proteinske mape proteina iz banane detektovano je preko 200 proteinskih tačaka na gelu, i pokazano je prisustvo novih IgE reaktivnih proteina koji još uvek nisu registrovani i okarakterisani. Jedan od ovih proteina je katalaza iz banane koju je detektovana kao IgE reaktivan protein, a zatim je proizvedena rekombinantnom DNK tehnologijom i okarakterisana kao nov alergen. Panelu koji čine Mus a 2, Mus a 4, Mus a 5 pridodata je katalaza čime je unapređen set alergena za dijagnostiku alergije na bananu.

6 ZAKLJUČAK

Eksperimentalno je pokazano da je korišćenje panela alergena banane pouzdaniji dijagnostički pristup u odnosu na korišćenje komercijalno dostupnih reagenasa koji se trenutno rutinski primenjuju u dijagnostici alergije na bananu. Prilikom izrade ove teze je razvijen jednostavan i brz postupak za izolovanje glavnih alergena banane iz prirodnog izvora, sa očuvanim imunološkim osobinama. Takođe je detektovan, proizveden i okarakterisan novi alergen banane kojim se može upotpuniti ovaj panel alergena za dijagnostiku alergije na bananu sa razdvojenim komponentama čime se unapređuje testiranje, i ujedno smanjuje rizik lažno negativnih reakcija u kliničkom testiranju.

7 EKSPERIMENTALNI DEO

7.1 Priprema ekstrakta banane

Za pripremu proteinskog ekstrakta korišćen je plod banane (*M. acuminata*) kupljene u lokalnoj trgovačkoj radnji. Odnos polaznog materijala i ekstrakcionog pufera (1% polivinilpolipirolidona (PVPP), 0,01% NaN₃, 0,01% CaCl₂, 5 mM Na-L-askorbata, 50 mM NH₄HCO₃, pH 8,5) je 1:2 wt/vol. Homogenizacija je izvedena u blenderu u trajanju od 1 min. Homogenat je mešan 2 h na magnetnoj mešalici na 4 °C, a zatim centrifugiran na 6000×g u trajanju od 30 min. Dobijeni supernatant je dijalizovan naspram 50 mM NH₄HCO₃, pH 8,5, i dalje korišćen kao sirovi ekstrakt banane. Pripremljeni banana ekstrakt je čuvan na -20°C.

Rastvor za ekstrakciju (50 mM NH₄HCO₃, 1% PVPP, 0,01% NaN₃ i 0,01% CaCl₂, pH 8,5)

NH₄HCO₃..... 2,37 g

PVPP..... 6 g

NaN₃..... 0,6 g

CaCl₂..... 0,6 g

Dodati oko 500 mL dH₂O, rastvoriti sadržaj i dotitrovati prema potrebi

dH₂O..... do 600 mL

Rastvor za dijalizu (50 mM NH₄HCO₃, pH 8,5)

NH₄HCO₃..... 2,37 g

Dodati oko 500 mL dH₂O, rastvoriti sadržaj i dotitrovati po potrebi

dH₂O.....do 600 mL

7.2 Koncentrovanje proteina

U zavisnosti od potreba eksperimenta primenjuvane su različite metode koncentrovanja proteina. Metode koje su korišćene su koncentrovanje ultrafiltracijom, liofilizacija, precipitacija amonijum sulfatom, i acetonska/TCA precipitacija.

7.2.1 Koncentrovanje proteina ultrafiltracijom

Ultrafiltracija je izvođena pomoću ćelije za ultrafiltraciju ($V=50$ mL, *Millipore*, SAD), NC membrane sa graničnom veličinom pora 3 kDa i natpritiska azota 3,5 bara. Polazni proteinski ekstrakt je dodavan u rezervoar ultrafiltracione ćelije, i nakon podešenog pritiska azota i broja obrataja na magnetnoj mešalici na 50 ob/min, uzorak je koncentrovan do željene zapremine.

7.2.2 Koncentrovanje proteina liofilizacijom

Liofilizacijom se koncentruju zamrznuti uzorci u amonijum-bikarbonatnom ili nekom drugom puferu (vodeni rastvori). Uzorci su zamrzavani na -20°C u odgovarajućim sudovima (npr. plastične vaje ili ependorf tube) i stavljeni u liofilizator koji je podešen da liofilizuje uzorke pod pritiskom od 0,11 mbar. Uzorci su liofilizovani do suva ili delimično, zavisno od potreba eksperimenta.

7.2.3 Koncentrovanje proteina precipitacijom amonijum-sulfatom

Precipitacija proteina aluminijum-sulfatom je korišćena za uklanjanje interferirajućih supstanci iz ekstrakta i koncentrovanje proteina. U ove svrhe je amonijum-sulfat sprашen u avanu sa tučkom, koji je zatim postepeno dodavan u ekstrakt koji je mešan na magnetnoj mešalici u ledenom kupatilu. Po postizanju željenog

zasićenja ekstrakta amonijum-sulfatom, uzorak je ostavljen preko noći na 4 °C, a zatim se na istoj temperaturi centrifugiran na 6000×g u trajanju od 30 min. Najpre je postignuto 0-20%-tno zasićenje gde je talog odbačen, a zatim 20-60%-tno zasićenje nakon čega je talog rastvaran u minimalnoj količini 20 mM NH₄HCO₃, pH 8,5 i dijalizovan naspram istog rastvora u trajanju od 48 h uz nekoliko izmena pufera.

7.2.4 Koncentrovanje proteina precipitacijom aceton-TCA metodom

Ovaj korak je urađen po preporuci proizvođača *Clean Up* kita (*Bio Rad*, SAD) u cilju koncentrovanja proteina i uklanjanja soli iz uzorka. Primenjuje kao priprema uzorka za dvodimenzionalnu elektroforezu (2D PAGE) o čemu će biti reči u daljem tekstu. Ukupni proteini uzorka su tretirani sa devet zapremina hladnog (-20°C) precipitacionog sredstva iz kita, nakon 1 h uzorak je centrifugiran, supernatant je odbačen, a pelet rastvoren u odgovarajućem puferu i korišćen je u daljem radu.

7.3. Određivanje koncentracije proteina

Za uzorke u kojima se nalazi smeša različitih proteina korišćen je *Bradford*-ov metod za određivanje koncentracije proteina, a za uzorke u kojima se nalazi prečišćen protein spektrofotometrijsko određivanje merenjem absorbance na 280 nm ($A_{280\text{nm}}$), uz korišćenje specifičnog ekstinkcionog koeficijenta određenog na osnovu aminokiselinske sekvencije proteina (<http://web.expasy.org/protparam/>).

Tabela 7.1. Ekstinkcioni koeficijenti *Mus a 2*, *Mus a 4* i *Mus a 5*.

<i>Alergen banane</i>	<i>Ekstinkcioni koeficijent [M⁻¹cm⁻¹]</i>	<i>Ekstinkcioni koeficijent [mL g⁻¹cm⁻¹]</i>
<i>Mus a 2</i>	64830	1,934
<i>Mus a 4</i>	27930	1,315
<i>Mus a 5</i>	43320	1,311

7.3.1 Određivanje koncentracije proteina *Bradford*-ovim reagensom

Bradford-ov metod [212] za određivanje koncentracije proteina je prilagođen za rad sa malim količinama uzorka u mikrotitar pločicama (F-tip), a apsorbanca je očitavana ELISA čitačem, na talasnoj dužini $\lambda=595$ nm.

Za konstruisanje standardne prave korišćeni su rastvori BSA u destilovanoj vodi koncentracije 1,0 mg/mL, 0,75 mg/mL, 0,50 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,10 mg/mL. Za mikro metode, rastvor polazne koncentracije 0,1 mg/mL je razblažen destilovanom vodom do finalnih koncentracija 0,075 mg/mL, 0,050 mg/mL, 0,025 mg/mL, 0,010 mg/mL. U 200 μ L rastvora boje odmereno je 5 μ L uzorka (za makro test), odnosno 20 μ L uzorka (za mikro test) i nakon 5 minuta je očitavana apsorbanca.

Bradford-ov reagens

CBB G250.....	250 mg
95%-tni etanol.....	50 mL
96%-tna ortofosforna kiselina.....	100 mL
dH ₂ O.....	do 200 mL

Boja je rastvorena u etanolu uz mešanje, i dodate su ortofosforna kiselina i voda do potrebne zapremine. Pred upotrebu je *Bradford*-ov reagens 5 puta razblažen i profiltriran 5-6 puta kroz isti nabrani filter papir. Radni *Bradford*-ov reagens je tamno braon, bez tragova plave boje. Za konstruisanje standardne prave korišćen je rastvor BSA (goveđi serum albumin) i sledeći rastvori:

Osnovni rastvor BSA za makro *Bradford*-ovu metodu (1 mg/mL BSA)

BSA.....	10 mg
dH ₂ O.....	do 10 mL

Osnovni rastvor BSA za mikro *Bradford*-ovu metodu (0,1 mg/mL BSA)

BSA.....	1 mg
dH ₂ O.....	do 10 mL

Pripremanje rastvora BSA za pravljenje standardne prave za određivanje koncentracije proteina *Bradford*-ovim reagensom je prikazano tabelarno:

Tabela 7.2. Priprema rastvora BSA za standardnu pravu makro Bradford-ove metode

Osnovni rastvor BSA za makro Bradford-ovu metodu [μL]	dH ₂ O [μL]	Finalna koncentracija BSA [mg/mL]
100	0	1,00
75	25	0,75
50	50	0,50
25	75	0,25
10	90	0,10

Tabela 7.3. Priprema rastvora BSA za standardnu pravu mikro Bradford-ove metode

Osnovni rastvor BSA za mikro Bradford-ovu metodu [μL]	dH ₂ O [μL]	Finalna koncentracija BSA [mg/mL]
100	0	0,100
75	25	0,075
50	50	0,050
25	75	0,025
10	90	0,010

Prilikom izrade standardne prave zavisnosti $A_{595\text{nm}}$ od koncentracije proteina u uzorku, za makro metodu je dodavano 5, a za mikro 20 μL uzorka u 200 μL pripremljenog *Bradford*-ovog reagensa. Apsorbancija na $\lambda=595$ nm je očitavana nakon 15 min i na osnovu nje je konstruisana standardna prava.

7.3.2 Određivanje koncentracije proteina spektrofotometrijski

Na osnovu poznate aminokiselinske sekvencije izračunat je specifični ekstinkcioni koeficijent proteina (izračunati ekstinkcioni koeficijenti za proteine od interesa su navedeni u opštem delu) i tada je $A_{280\text{nm}} = a \times b \times c$ pri čemu je:

$A_{280\text{nm}}$ - izmerena apsorbancija na $\lambda=280$ nm talasne dužine

a - ekstinkcioni koeficijent za dati protein izražen u mL/(mg \times cm)

b - dužina puta kojim zrak prolazi kroz uzorak, odnosno dužina optičkog puta

c - koncentracija proteina u uzorku izražena u mg/mL

7.4 Proteinske elektroforeze (1D i 2D PAGE)

7.4.1 Jednodimenzionalna elektroforeza

Elektroforetsko razdvajanje proteina je rađeno poliakrilamidnom gel elektroforezom po originalnom *Laemli*-jevom protokolu [213].

Korišćene su nativna poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE), kao i SDS PAGE u redukujućim i neredukujućim uslovima. Dok se u nativnoj PAGE ne koriste ni SDS PAGE ni 2-merkaptoetanol (2-ME), u neredukujućoj SDS PAGE se ne koristi 2-ME, a u redukujućoj SDS PAGE se koriste i SDS PAGE i 2-ME.

Potrebni rastvori:

A. Monomerni rastvor akrilamida (30% T, 2,7% C)

Akrilamid.....58,4 g
Bisakrilamid.....1,6 g
dH₂O.....do 200 mL

B. Pufer za razdvajajući gel (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)

Tris.....36,3 g
Dodati oko 170 mL dH₂O i dotitrovati rastvor do pH 8,8
dH₂O.....do 200 mL

C. Pufer za koncentrujući gel (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)

Tris.....6 g
Dodati oko 90 mL dH₂O i dotitrovati rastvor do pH 6,8
dH₂O.....do 100 mL

D. 10%-tni rastvor SDS-a

SDS..... 10 g
dH₂O.....do 100 mL

E. 10%-tni rastvor APS-a

APS..... 0,1 g
dH₂O..... do 10 mL

F. Pufer za nadslojavanje polimerizujućeg gela (n-butanol zasićen vodom)

n-butanol.....150 mL
dH₂O.....50 mL

G. Pufer za elektroforezu (0,25 M Tris, 0,192 M glicin, 0,1% SDS, pH 8,3)

Tris.....3 g
Glicin.....14,4 g
SDS.....1 g
Dodati oko 990 mL dH₂O i dotitrovati rastvor do pH 8,3
dH₂O.....do 1000 mL

H. Pufer za pripremu uzoraka (5X PUZ)

Pufer za koncentrujući gel.....1,2 mL
98%-tni glicerol.....5 mL
10%-tni rastvor SDS-a.....2mL
2-ME0,5 mL
1%-tni rastvor bromfenol plave boje.....1 mL
dH₂O.....do 10 mL

I. Rastvor boje (0,1% CBB, 50 %-tni metanol, 10%-tna sirćetna kiselina)

CBB G ili R 250.....0,5 g
Metanol.....250 mL
Sirćetna kiselina.....50 mL
dH₂O.....do 500 mL

J. Rastvor za fiksiranje (50%-tni metanol, 10%-tna sirćetna kiselina)

Metanol.....250 mL
 Sirćetna kiselina.....50 mL
 dH₂O.....do 500 mL

K. Rastvor za obezbojavanje (7%-tna sirćetna kiselina)

Sirćetna kiselina.....70 mL
 dH₂O.....do 1000 mL

U tabeli 7.4 je uputstvo za pripremu 10 mL poliakrilamidnog gela za razdvajanje:

Tabela 7.4. Uputstvo za pripremu 10 mL poliakrilamidnog gela za razdvajanje

<i>Finalna koncentracija akrilamida u gelu [%]</i>												
Rastvor	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
A [mL]	1,67	2,0	2,33	2,67	3,0	3,33	3,67	4,0	4,33	4,67	5,0	5,33
B [mL]	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
dH ₂ O [mL]	5,67	5,33	5,0	4,67	4,33	4,0	3,67	3,33	3,0	2,67	2,33	2,0
D [μL]	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
E [μL]	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

U tabeli 7.5. je uputstvo za pripremu 4%-tnog poliakrilamidnog gela za koncentrovanje:

Tabela 7.5. Priprema poliakrilamidnog gela za koncentrovanje

<i>Finalna zapremina gela za koncentrovanje [mL]</i>								
Rastvor	10	9	8	7	6	5	4	3
A [mL]	1,33	1,2	1,06	0,93	0,8	0,67	0,53	0,4
C [mL]	2,5	2,25	2,0	1,75	1,5	1,25	1	0,75
dH ₂ O [mL]	6,0	5,4	4,8	4,2	3,6	3,0	2,4	1,8
D (μl)	100	90	80	70	60	50	40	30
E (μl)	50	45	40	35	30	25	20	15

Rastvor gela za razdvajanje je neposredno pred dodatak rastvora D i E dezaerisan na vakuum pumpi u trajanju od 5 min. Nakon dezaeracije su dodati rastvori D i E i pripremljen rastvor je naliven između staklenih ploča (dimenzije gela za razdvajanje su 140 × 80 × 1 mm, ukoliko nije naznačeno drugačije), nadslojen rastvorom F i ostavljen da polimerizuje 20-30 min na st. Nakon polimerizacije, vodom je isprana površina ispolimerizovanog gela i naliven rastvor gela za koncentrovanje. U

gel je uronjen češalj (d=1 mm ukoliko nije naznačeno drugačije). Ploče su nakon polimerizacije gela za koncentrovanje isprane vodom i uronjene u kadu sa rastvorom G i elektroforetski sistem je priključen na napajanje. Korišćena je *Hoeffler SCI* aparatura.

Uzorci su pripremani zagrevanjem 3 min na ključalom vodenom kupatilu u rastvoru H (vodeći računa o razblaženju (5×)), centrifugirani i nakon hlađenja do st nanošeni u bunare (do 30 µL). Napon elektroforetskog razdvajanja je podešen na 80 V do ulaska BFP u gel za razdvajanje (oko 45 min) i zatim na 250 V (dok BFP ne stigne na oko 1 cm od donje ivice gela) još 60-90 min, u zavisnosti od gustine gela za razdvajanje. Nakon završetka elektroforeze, ploče su pažljivo razdvojene i gel je prebačen u odgovarajuću posudu. Nakon brzog ispiranja vodom, gel je tretiran na sledeći način:

1. Fiksiranje rastvorom J u trajanju od 15 min,
2. bojenje rastvorom I u trajanju od 15 min,
3. obezbojavanje rastvorom K preko noći.

7.4.2 Dvodimenzionalne elektroforeze

2D elektroforeze se načelno izvode u dva koraka od kojih je prvi izoelektrofokusingiranje (IEF), a drugi najčešće SDS PAGE koja je opisana u prethodnom odeljku. U ovom radu je IEF izvođen u nativnim i u denaturišućim uslovima, zavisno od potreba eksperimenta.

7.4.2.1 Izoelektrofokusingiranje u nativnim uslovima i 2D elektroforeza

Izoelektrofokusingiranju u nativnim uslovima prethodi priprema sledećih rastvora:

Katodni rastvor (150 mM NaOH)

NaOH.....0,6 g
dH₂O..... do 100 mL

Rastvor je zagrejan do ključanja i ohlađen pre korišćenja.

Anodni rastvor (75 mM H₂SO₄)

H₂SO₄..... 0,42 mL
dH₂O..... do 100 mL

Gel za izoelektrofokusinge

Monomerni rastvor akrilamida.....3,75 mL
Rastvor amfolita.....1,20 mL
dH₂O.....9,90 mL
dezaeracija u trajanju od 15 min
TEMED.....15 µL
APS.....100 µL

Dužina papirnih elektroda je jednaka dužini ivica gela na koji naležu. Elektrode se prethodno natapaju katodnim, odnosno anodnim rastvorom, a zatim postavljaju paralelno na ivice gela. Uslovi izoelektrofokusinge su navedeni u tabeli 7.6:

Tabela 7.6. Uslovi rada prilikom izoelektrofokusinge u nativnim uslovima

Uslovi izoelektrofokusinge u nativnim uslovima	
Napon [V]	Vreme [min]
800	30 (u cilju predfokusinge)
Nanošenje po 30 µL uzorka	
400	10
600	10
800	30
1000	10
1200	5

Svaki od ovih koraka je izveden na hladnjaku koji održava temperaturu sistema na 4 °C. U cilju analize proteinskih frakcija, izoelektrofokusinge je izvođeno u duplikatu tako da je jedan deo gela bojen nakon izoelektrofokusinge, a drugi dalje korišćen za analiziranje u drugoj dimenziji.

Deo gela koji služi za određivanje pH gradijenta izoelektrofokusingem je ispran destilovanom vodom 5 min. Na delu gela na koji je nanet uzorak isečene su tračice od katode ka anodi debljine 1 cm, a one se dalje dele na komadiće 1 × 0,5 cm

koji se prebacuju u epruvete sa po 1 mL prethodno prokuvane destilovane vode i koriste za određivanje pH gradijenta, na osnovu kojeg se određuje pI analiziranih proteina. Za fiksiranje proteinskih traka nakon izoelektrofokusanja korišćen je rastvor za fiksiranje:

Rastvor za fiksiranje proteinskih traka nakon IEF (0,3 m/V TCA)

TCA..... 30 g
dH₂O..... do 100 mL

Fiksiranje je trajalo 1 h, a nakon toga je gel ispiran destilovanom vodom i ostavljen u njoj preko noći. Nakon prekonoćnog inkubiranja u destilovanoj vodi proteinske trake su bojene kao što je opisano kod SDS-PAGE.

2D elektroforeza se odnosi na razdvajanje proteina izoelektrofokusanjem u prvoj i zatim izvođenje SDS-PAGE u drugoj imenziji. Trake u okviru kojih je nanešen uzorak na izoelektrofokusanje su isečene debljine 1 cm i zahvataju čitavu dužinu gela od katode do anode. Traka je isprana destilovanom vodom u trajanju od 5 min i zatim je ekvilibrisana u puferu za ekvibraciju uz dve izmene u trajanju od 45 min.

Pufer za ekvibraciju

2-Merkaptoetanol..... 5 mL
Pufer C za SDS-PAGE..... 6,25 mL
Rastvor D za SDS-PAGE..... 23 mL
85%-tni glicerol 10 mL
dH₂O..... do 100 mL

Nakon prve dimenzije ekvilibrisana traka je nanesena na gel pripremljen za SDS-PAGE, s tim što je bunar širine koliko i ekvilibrisana traka dugačka. Pored širokog bunara u koji je dodata ekvilibrisana traka nakon prve dimenzije, u dva klasična bunara su naneseni proteinski markeri i uzorak pripremljen i SDS-PAGE je dalje urađeno kao što je opisano u prethodnom delu teksta koji se odnosi na jednodimenzionalnu elektroforezu.

7.4.2.2 Izoelektrofokusingiranje na imobilizovanom pH gradijentu i 2D elektroforeza

Izoelektrofokusingiranje na imobilizovanom pH gradijentu (IPG) je urađeno na komercijalnim IPG tračicama (*Serva*, Nemačka), a koje sadrže nelinearni pH gradijent sa pH opsegom 3-10. Ovaj opseg je izabran u cilju postizanja bolje rezolitivnosti i preciznijeg određivanja *pI* proteina od interesa u pH opsegu 4-7. Pored IPG tračica, korišćena je i IPG *Runner* (*Novex*, SAD) aparatura za IEF.

Rehidracioni pufer

Urea.....	4,8 g
CHAPS	0,2 g
amfoliti pH 3-10	50 μ L
BPB	u tragu
dH ₂ O	do 10 mL

Rehidracioni pufer je alikvotiran i čuvan na -20 °C do upotrebe. DTT je dodavan u pufer pred samu upotrebu tako da je njegova finalna koncentracija 20 mM.

Koraci u izvođenju IEF:

1. U 1 mL rehidracionog pufera dodato je 3 mg DTT, a zatim su pufer i uzorak pomešaju u odnosu 2:1 V/V,
2. u komoru u koju se ubacuje IPG tračica za IEF, najpre je dodato 155 μ L uzorka u puferu, a zatim je pažljivo ubačena IPG tračica unutra vodeći računa o njenoj orijentaciji, odnosno o tome da se (+) kraj tračice nalazi na dnu komore,
3. kasete je zatvorena lepljivom trakom da se spreči otparavanje uzorka i pufera, i rehidracija se odvijala preko noći na sobnoj temperaturi,
4. sutradan je skinuta lepljiva traka i aplikator, a na njihovo mesto su nanese papirne elektrode, pokvašene sa po 600 μ L bidestilovane vode,
5. aparatura sklopljena prema preporuci proizvođača i nakon dodatka 650 mL bidestilovane vode u rezervoar za hlađenje, urađena je IEF pod sledećim uslovima:

20 min	200 V
15 min	450 V
15 min	750 V
60 min	2000 V

IEF se odvija pri struji i naponu konstantno podešenim na 2 mA i 2 W.

Nakon IEF se IPG tračice mogu zamrznuti na -80° C do daljeg rada. Tračice sa fokusiranim proteinima su pred drugu dimenziju ekvilibrisane u trajanju od 30 min. 15 min je tračica ekvilibrisana u ekvilibracionom puferu 1, a narednih 15 min u mraku je ekvilibrisana u ekvilibracionom puferu 2 (sa jodacetamidom) uz konstantnu agitaciju i pažnju da se gel ne odvoji sa plastične osnove.

Ekvilibracioni pufer za drugu dimenziju

Tris	0,06 g
urea	3,60 g
glicin	3 g
SDS	0,2 g
BPB	u tragu
dH ₂ O	do 10 mL

Ekvilibracioni pufer 1

Ekvilibracioni pufer za drugu dimenziju	5 mL
DTT	0,05 g

Ekvilibracioni pufer 2

Ekvilibracioni pufer za drugu dimenziju	5 mL
IAA	0,125 g

Ekvilibrisane tračice su nanosene na SDS PA gel sa preparativnim bunarom

vodeći računa o orijentaciji tračice (prema instrukcijama proizvođača). SDS PAGE se izvodi na način koji je prethodno opisan.

7.4.2.3 Primena biblioteka kombinatornih peptidnih liganada

Biblioteke kombinatornih peptidnih liganada (CPLL) se nalaze u komercijalno dostupnim kolonicama (*Bio-Rad*, SAD). Upotrebljavaju se prema specifikaciji proizvođača. Kao polazni uzorak korišćen je 1 mL koncentrovanog ekstrakta banane (6,14 mg/mL). Princip metode je da se doda uzorak sa proteinima u višku tako da dođe do zasićenja liganada, zatim su puferom 1 eluirani nevezani proteini, a onda puferom 2 eluirana vezana proteinska frakcija potrebna za dalji rad. Za dalju analizu proteinskog uzorku 2D PAGE udaljene su soli iz rastvora. U našem slučaju urađena je TCA/acetonska precipitacija pomoću *CleanUp* (*Bio-Rad*, SAD) kita, takođe prema instrukcijama proizvođača. Nakon TCA/acetonske precipitacije za potrebe 2D PAGE proteinski talog je rastvoren u odgovarajućoj zapremini rehidracionog pufera za IPG tračice.

7.5 Tripsinska digestija proteina u gelu posle SDS PAGE i MALDI TOF analiza

Za potrebe *mass fingerprint* analize (PMF) su proteinske tačke pažljivo izdvojene iz poliakrilamidnih gelova. Proteini su zatim digestovani tripsinom u gelu, pa su dobijeni peptidni fragmenti ekstrahovani iz gela i dalje analizirani pomoću MALDI TOF ili ESI TOF metode koje omogućavaju precizno određivanje mase peptida.

1. Proteinske trake/tačke su isečene iz gela i prebačeni su u mikrotube sa poklopcem od 1,5 mL,
2. dodato je 200 μ L rastvora za obezbojavanje (100 mM NH_4HCO_3 /50% ACN) i mešano na šejkeru u trajanju od 30 min, nakon uklanjanja CBB-a,
3. gel je dehidriran sa 100 μ L ACN,
4. acetonitril je uparen *SpeedVac*-om,

5. dodato je 30 μL 10 mM DTT rastvora tako da su komadi gela bili pokriveni, i inkubirani 30 min na ST,
6. DTT rastvor je zamenjen sa jednakom zapreminom 55 mM IAA rastvora, i inkubiran u trajanju od 45 min na ST u mraku,
7. IAA rastvor je uklonjen i komadići gela su isprani sa 100 μL 25 mM NH_4HCO_3 u trajanju od 10 min uz vorteksovanje,
8. uklonjen je rastvor za ispiranje i dodat je 100 μL ACN.
9. ACN je uklonjen *SpeedVac*-om,
10. komadi gela su rehidratirani sa 15 μL 20 ng/ μL rastvora tripsina u trajanju od 1 h na 4°C,
11. dodaje se još 40 μL 40 mM NH_4HCO_3 /10% ACN,
12. gel je inkubiran preko noći na 37°C na šejkeru,
13. dodato je 150 μL dH_2O i ekstrahovani su peptidi iz gela u trajanju od 10 min uz mešanje,
14. rastvor ekstrahovanih peptida je prebačen u novu mikroubu sa poklopcem,
15. tretirani su komadi gela sa 50 μL 50% ACN/5% TFA u trajanju od 30 min,
16. spojeni su ekstrakti u istu mikrotubu sa poklopcem i upareni *Speed Vac*-om,
17. dodato je 20 μL 0.1% TFA za rehidrataciju uzoraka,
18. pomoću *Zip-Tip* (C-18) nastavaka prečišćeni su peptidi,
19. uzorak je pomešan sa matriksom u odnosu 1:1, V/V i nanet na MALDI TOF pločicu (1 μL na svako od polja pločice).

7.6 Elektrotransfer proteina sa gela na membranu

Nakon SDS-PAGE kao što je opisano u prethodnom tekstu, za potrebe N-terminalnog sekvenciranja i Western blot-a proteini su polusuvim elektrotransferom sa gela prebačeni na membranu [214]. Bez obzira na to dali se transfer proteina radi na PVDF ili NC membranu, koraci u transferu su isti. Potrebni rastvori:

Pufer za blot (25 mM Tris, 192 mM glicin, 20%-tni metanol, pH 8,3)

Tris.....	3 g
Glicin.....	14,4 g
SDS.....	1 g
Metanol.....	200 mL
Doda se oko 750 mL dH ₂ O i rastvor se dotitruje do pH 8,3	
dH ₂ O.....	do 1 L

„Polu-suvi“ transfer proteina sa gela na membranu:

1. Komad membrane dimenzija gela je pokvašen polako uz pomoć kapilarnih sila i to PVDF membrana u metanolu, a NC membrana u vodi,
2. prethodno pokvašena membrana je prebačena u pufer za blot u trajanju od 5 min,
3. 6 komada filter papira čije dimenzije odgovaraju dimenzijama gela i membrane su takođe ukvašeni u puferu za blot,
4. pre sastavljanja „sendviča“ gel je ispran vodom i ostavljen u puferu za blot radi ekvilibracije u trajanju od 5 min,
5. sklopljen je sendvič pri čemu je pozitivna grafitna elektroda bila na dnu, preko je tri komada pripremljenog filter papira, zatim komad membrane, opet tri komada filter papira i negativna grafitna elektroda na posletku odozgo,
6. izračunata je površina gela i po 1 cm² gela propuštena je struja od 0,8 mA u trajanju od 45 min.

7.7 N-terminalno sekvenciranje proteina

Proteini su nakon SDS-PAGE polu-suvim elektrotransferom prebačeni na PVDF membranu. Nakon transfera na PVDF membranu, membrana je isprana destilovanom vodom i proteini su vizuelizovani bojenjem sa 0,1%-tnom CBB bojom u 50% metanolu. Potrebni rastvori i protokol za rad:

50%-tni rastvor metanola

Metanol.....150 mL
dH₂O..... do 300 mL

Rastvor za bojenje (0,1% CBB, 50%-tni metanol)

CBB G 250..... 0,1 g
Metanol..... 50 mL
dH₂O..... do 100 mL

1. Membrana je inkubirana u 50%-tnom metanolu u trajanju od 5 min,
2. odliven je rastvor metanola i dodat rastvor boje kojim se membrana tretira u trajanju od 20 min,
3. membrana je isprana 50%-tnim metanolom.

Proteinske trake su isečene sa membrane i mikrosekvencirane upotrebom *Procise* proteinskog sekvenatora koji je povezan sa aminokiselinskim analizatorom (*PE Biosystems*, Vajterštat, Nemačka).

7.8 Prečišćavanje Mus a 2, Mus a 4 i Mus a 5

Polazni materijal za prečišćavanje je banana ekstrakt čiji je način dobivanja prethodno opisan u odeljku 7.1. Prečišćavanje ova tri alergena banane su izvedeni u tri hromatografska koraka koja su opisana u daljem tekstu, to su: jonoizmenjivačka hromatografija na QAE Sephadex A 50 matriksu, jonoizmenjivačka hromatografija na *Hi Trap* SP (V = 1 mL, *GE Healthcare*, Upsala, Švedska) koloni i reverzno fazna hromatografija na *Supelco* C5 (V = 1.667 mL, *Supelco*, Belefont, Pensilvanija, SAD) koloni.

7.8.1 Jonoizmenjivačka hromatografija na QAE *Sephadex A 50* matriksu

Potopljeno je 10 g matriksa QAE Sephadex A 50 preko noći da nabubri u radnom rastvoru za QAE jonoizmenjivačku hromatografiju koji je 500 mM u odnosu na NaCl, a zatim je ekvilibrisan radnim rastvorom bez NaCl.

Rastvor za bubreje QAE jonoizmenjivačkog matriksa (50 mM NH_4HCO_3 , 500 mM NaCl i 0,01% NaN_3 , pH 8,5)

NH_4HCO_32,37 g

NaN_30,6 g

NaCl.....17,55g

Dodati oko 500 mL dH_2O , rastvoriti sadržaj i dotitrovati po potrebi

dH_2Odo 500 mL

Radni rastvor za QAE jonoizmenjivački matriks (50 mM NH_4HCO_3 i 0,01% NaN_3 , pH 8,5)

NH_4HCO_32,37 g

NaN_30,6 g

Dodati oko 500 mL dH_2O , rastvoriti sadržaj i dotitrovati po potrebi

dH_2Odo 500 mL

Nakon ekvilibracije matriksa radnim puferom za QAE jonoizmenjivačku hromatografiju urađena je “bač” hromatografija sirovog proteinskog ekstrakta banane. Hromatografija je izvedena (1 h) na sobnoj temperaturi uz konstantno blago mešanje na magnetnoj mešalici. Proteini od interesa su bili u nevezanoj frakciji.

7.8.2 Jonoizmenjivačka hromatografija na *Hi Trap SP FF* koloni

Uzorak koji je nanesen na jonoizmenjivačku hromatografiju na *Hi Trap SP FF* koloni (*GE Healthcare*, Upsala, Švedska) je skoncentrovan ultrafiltracijom ili liofilizacijom do koncentracije 0,77 mg/mL. Ovakav uzorak je dijalizovan preko noći naspram pufera koji predstavlja startni pufer za ovu hromatografiju. Pred samo

nanošenje na kolonu uzorak je centrifugiran 30 min na 3000 ob/min ili proceden kroz filter sa porama ($d=0,22 \mu\text{m}$). Radni puferi:

Pufer A (50 mM Na-formijat, pH 4)

85%-tna mravlja kiselina.....2,7 mL

Dodati kiselinu u oko 950 mL dH_2O i dotitrovati do pH 4 rastvorom NaOH

dH_2Odo 1 L

Pufer B (50 mM Na-formijat, 0,4 M NaCl, pH 4)

85%-tna mravlja kiselina.....2,7 mL

NaCl.....23,5 g

Dodati kiselinu i NaCl u 950 mL dH_2O i dotitrovati do pH 4 rastvorom NaOH

dH_2Odo 1 L

Kolona je prikacena na *Äkta purifier* (GE Healthcare, Uppsala, Švedska) uređaj. Nakon pripreme svakog od korišćenih rastvora usledilo je ceđenje kroz filter sa porama od $0,22 \mu\text{m}$ i dezaeracija na radnoj temperaturi (sobna temperatura).

Zapremina kolone je iznosila 1 mL, gradijent elucije 10 kolonskih zapremina 0-45% pufera B, i brzina protoka kroz kolonu je bila 1 mL/min. Na kolonu je nanošeno po 5 mL pripremljenog uzorka, odnosno 3,85 mg proteina.

7.8.3 Reverzno fazna hromatografija na *Supelco C5* koloni

Reverzno faznom hromatografijom su razdvajani proteini od interesa dobijeni u pulu nakon jonoizmenjivačke hromatografije na *HiTrap SP* koloni (GE Healthcare, Uppsala, Švedska). Uzorak je pripremljen za reverzno faznu hromatografiju tako što je dijalizovan naspram destilovane vode, i pred samo nanošenje na kolonu uzorak je centrifugiran 30 min na 3000 rpm ili proceden kroz filter sa porama $d=0,22 \mu\text{m}$.

Razdvajanje uzoraka na koloni je postignuta gradijentom ACN u 0,1%-tnoj trifluorsirćetnoj kiselini (TFA). Korišćena je C5 kolona (*Supelco*, Belfonte, USA)

zapremine 1,662 mL (10 cm x 4,6 cm). Nanošeno je po 1 mL pripremljenog uzorka na kolonu pri radnom protoku od 1 mL/min, i dužini gradijenta 15 kolonskih zapremina. Gradijent elucije je bio linearan, u opsegu 0-100% B. Prilikom pravljenja pomenutih rastvora, TFA je dodavana u već dezaerisane rastvore zbog svoje isparljivosti.

Rastvor A za reverzno-faznu hromatografiju (0,1% TFA)

TFA.....200 µL
dH₂O.....200 mL

Rastvor B za reverzno-faznu hromatografiju (0,1% TFA u 90% ACN)

TFA.....200 µL
ACN.....180 mL
dH₂O.....do 200 mL

7.9 Proizvodnja i prečišćavanje katalaze iz banane

7.9.1 Priprema čvrstih i tečnih podloga

U radu su korišćeni tečni i čvrsti LB medijum.

Rastvor LB medijuma (0,1% TFA u 90% ACN)

Tripton..... 10 g
Ekstrakt kvasca..... 5 g
NaCl 5 g

Dodati dH₂O do oko 950 mL i dotitrovati do pH 7,4

dH₂O..... do 1 L

Nakon pripreme rastvora, podešavanja pH i razlivanja u odgovarajuće sudove, rastvor je autoklaviran 20 min na 120 °C. Čvrsti LB medijum je pripremljen uz dodavanje agaroze (1-2% w/v) u rastvor tečnog medijuma. Dobijena smeša je autoklavirana i razlivena u sudove koji su prethodno sterilisani. Za pripremu podloga

korišćene su supstance koje su proizvedene na Institutu za virusologiju, vakine, serume *Torlak*. Za gajenje bakterija korišćene su LB podloge sa dodatim odgovarajućim antibiotikom.

Tabela 7.7. Osnovni rastvori antibiotika korišćeni u radu.

<i>Antibiotik</i>	<i>Ampicilin</i>	<i>Hloramfenikol</i>
Količina	100 mg	50 mg
Rastvarač	Voda do 1 mL	Etanol do 1 mL
Konačna konc.	100 mg/mL	50 mg/mL

Osnovni rastvor ampicilina se priprema rastvaranjem u destilovanoj vodi i alikvotira u sterilisane mikrotube sa poklopcem. Pri razlivanju korišćeni su sterilni špric i filter pora prečnika 0,22 µm. Za pripremanje osnovnih rastvora hloramfenikola nije korišćeno sterilisano posuđe pri razlivanju, s obzirom da se rastvaraju u etanolu koji je baktericid. Svi rastvori antibiotika se čuvaju na -20° C do upotrebe.

7.9.2 Kloniranje gena za banana katalazu u pET23b vektor

Strategija kloniranja banana katalaze u ekspresioni vektor pET-23b je bila uvođenje His-tag na C-terminalnom kraju polipeptidnog lanca. Gen za katalazu (*GenBank* EU139298.1) je dobiven u pUC vektoru. Ovaj gen je ukloniran u pET-23b vektor korišćenjem Nde I i Xho I restrikcionih enzima (*ThermoFisher Scientific*, SAD). Potvrda da je gen uspešno ukloniran u ekspresioni vektor dobijena je restrikcionom digestijom rekombinantnog plazmida (pET-23b-Cat).

7.9.3. Ekspresija katalaze iz banane

Za ekspresiju proteina pripremljena je prekonoćna kultura ćelija zasejavaljem bakterija u 5 mL tečne podloge sa odgovarajućim antibioticima i gajenjem na 37 °C na 250 ob/min preko noći. Nakon 16 h, prekonoćna kultura je zasejana u novi medijum u zapreminskom odnosu 1:200. Zasejana kultura je gajena na 37 °C uz mešanje do OD vrednosti 0,6-0,8 na $\lambda=600$ nm uz konstantno mešanje na 250 ob/min. Zatim je dodat IPTG do konačne koncentracije od 1 mM.

Ekspresija katalaze je izvedena u *E. coli* Sox sistemu. Jedna nasumično odabrana kolonija sveže transformisane Sox ćelije je dodata u 5 mL tečne LB podloge sa ampicilinom i hloramfenikolom i ostavljena da raste preko noći na 37 °C uz mešanje na 180 ob/min u šejkeru.

E. coli BL21 (DE3) SOX [204] kolonija koja nosi pET-23-b-Cat konstrukt je inokulisana u 5 mL LB medijuma sa ampicilinom (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) i hloramfenikolom (34 $\mu\text{g}/\text{mL}$), i ostavljena da raste preko noći na 37°C uz konstantno mešanje na 250 ob/min. 0,6 mL prekonoćne kulture je zatim inokulisano u 150 mL svežeg LB medijuma sa ampicilinom (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) i hloramfenikolom (34 $\mu\text{g}/\text{mL}$) i gajeno do postizanja optičke gustine (OD) 0,4 na $\lambda=600$ nm uz konstantno mešanje na 250 ob/min. Zatim je dodata arabinoza do koncentracije 0,5% (w/v), a 30 min nakon dodatka arabinoze dodata je aminolevulinska kiselina do koncentracije 15 mM i hemin do koncentracije 10 μM . Sinteza rekombinantne katalaze je indukovana dodatkom IPTG do finalne koncentracije 0,5 mM na 22°C uz konstantno mešanje od 250 ob/min tokom 6 h.

7.9.4 Prečišćavanje katalaze

Nakon završene fermentacije su ćelije od supernatanta odvojene centrifugiranjem (6000 \times g, 30 min na 4 °C), resuspendovane hladnim 20 mM Tris puferom pH 8 (ledeno kupatilo) i sonifikovane korišćenjem ultrazvučne sonde (vreme - 10 \times 10 s, snaga -25 W, *Branson sonifier 150*, *Branson Ultrasonics*, Danburi, Konetiket,

SAD) tako da su dobijene citoplazmatska frakcija u supernatantu i inkluziona tela u talogu. Citoplazmatska frakcija je korišćena u daljem radu.

Aktivna katalaza banane je prečišćena afinitetnom hromatografijom na IDA-*Sepharose* 6B matriksu. Uzorak je dijalizovan naspram 20 mM imidazol, 50 mM Tris pufera, 150 mM NaCl pufera pH 8 i u tom puferu nanet na afinitetnu kolonu. Vezana proteinska frakcija je eluirana 0,3 M imidazolom u startnom puferu, a zatim dijalizovana naspram 20 mM Tris pufera pH 8 i dodatno prečišćena korišćenjem jonoizmenjivačke hromatografije na *Hi Trap Q FF* koloni ($V=1$ mL, *GE Healthcare*, Engleska) u linearnom gradijentu jonske sile 0-100% 1M NaCl (15 kolonskih zapremina) u startnom puferu.

20 mM Tris pufer pH 8

Tris 1,21 g
dH₂O do 500 mL i titracija sa HCl do pH 8
dH₂O do 500 mL

20 mM imidazol, 50 mM Tris, 150 mM NaCl pufer pH 8

Imidazol 0,68 g
Tris 3,03 g
NaCl 4,38 g
dH₂O do 500 mL i titracija sa HCl do pH 8
dH₂O do 500 mL

0,3 M imidazol, 50 mM Tris, 150 mM NaCl pufer pH 8

Imidazol 10,21 g
Tris 3,03 g
NaCl 4,38 g
dH₂O do 500 mL i titracija sa HCl do pH 8
dH₂O do 500 mL

1 M NaCl, 20 mM Tris pufer pH 8

Tris	1,21 g
NaCl	29,22 g
dH ₂ O do 500 mL i titracija sa HCl do pH 8	
dH ₂ O	do 500 mL

7.10 Zimogramska detekcija katalaze u gelu

Zimogramska detekcija je izvedena da bi se pokazala enzimaska aktivnost proteina u gelu. Eksperiment je izveden u 3 koraka:

1. Elektroforetsko razdvajanje proteina u nativnim uslovima

Detalji koji se odnose na elektroforetsko razdvajanje proteina u nativnim uslovima su opisani u prethodnom tekstu. Pripreman je 8%-tni poliakrilamidni gel.

2. Potapanje gela u rastvor sa supstratom (H₂O₂)

Nakon završetka elektroforetskog razdvajanja proteina u gelu, gel je ispran vodom (dH₂O) i potopljen u 0,03%-tni rastvor H₂O₂ u trajanju od 10 min.

0,03%-tni rastvor H₂O₂

3 %-tni rastvor H ₂ O ₂	200 µL
dH ₂ O	do 20 mL

3. Vizualizacija reakcije

Gel je ispran (dH₂O), i zatim je dodat rastvor FeCl₃ i K₃[Fe(CN)₆] što je dovelo do nastanka tamno zelene pozadine i nebojenih prosvetljenja na gelu gde je katalaza ispoljila svoju enzimsku aktivnost.

Rastvor za vizuelizaciju aktivnosti katalaze u gelu:

FeCl ₃	0,5 g
K ₃ [Fe(CN) ₆]	0,3 g
dH ₂ O	do 30 mL

7.11. Elektroelucija proteina iz gela

Komadi gela koji sadrže protein od interesa se nakon native elektroforeze usitnjavaju i stavljaju u specijalno predviđene tubice ili u creva za dijalizu koja omogućavaju da se kroz njih odvija protok struje, ali ne i da protein može da napusti tubicu/crevo u kojem se nalazi.

Elektroelucija se izvodi u puferu za nativnu PAGE, u aparaturi za horizontalnu elektroforezu (aparatura za DNK elektroforezu). Napon se podesi na 100 V, temperatura na 4°C, i elektroelucija se izvodi u trajanju od 2 h.

7.12. Western blot

Imunoblot je razvijen na NC membrani na koju su prethodno transferovani proteini od interesa. Potrebni rastvori:

Rastvor boje Ponceau S

Ponceau S.....	0,1 g
Sirćetna kiselina (glacijalna)	5 mL
dH ₂ O.....	do 100 mL

TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4)

Tris.....	3,02 g
NaCl.....	4,38 g
Dodati oko 450 mL dH ₂ O, rastvoriti sadržaj i dotitrovati rastvor do pH 7,4	

dH₂O do 500 mL

TTBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,4)

Tris..... 3,02 g

NaCl..... 4,38 g

Dodati oko 450 mL dH₂O, rastvoriti sadržaj i dotitrovati rastvor do pH 7,4

Tween 20..... 0,5 mL

dH₂O..... do 500 mL

Rastvor za blokiranje A (5%-tno mleko u TTBS-u)

Tris..... 0,6 g

NaCl..... 0,86 g

Dodati oko 450 mL dH₂O, rastvoriti sadržaj i dotitrovati rastvor do pH 7,4

Tween 20..... 0,1 mL

Obezmašćeno mleko u prahu..... 5 g

dH₂O..... do 100 mL

Rastvor u koji se dodaju antitela A (1%-tno mleko u TTBS-u)

Tris..... 0,6 g

NaCl..... 0,86 g

Dodati oko 450 mL dH₂O, rastvoriti sadržaj i dotitrovati rastvor do pH 7,4

Tween 20..... 0,1 mL

Obezmašćeno mleko u prahu..... 1 g

dH₂O..... do 100 mL

Rastvor za blokiranje B (3%-tni BSA u TBS-u)

Tris..... 0,6 g

NaCl..... 0,86 g

Dodati oko 450 mL dH₂O, rastvoriti sadržaj i dotitrovati rastvor do pH 7,4

Tween 20..... 0,1 mL

BSA..... 3 g

dH₂O..... do 100 mL

Rastvor u koji se dodaju antitela B (0,3%-tni BSA u TBS-u)

Tris..... 0,6 g
NaCl..... 0,86 g
Dodati oko 450 mL dH₂O, rastvoriti sadržaj i dotitrovati rastvor do pH 7,4
Tween 20..... 0,1 mL
BSA..... 0,3 g
dH₂O..... do 100 mL

Rastvor za blokiranje C (3% HSA, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4)

Komercijalno dostupni 20%-tni rastvor HSA 1,50 mL
TBS do 10 mL

Pufer za alkalnu fosfatazu (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9,5)

Tris.....2,42 g
NaCl..... 1,17 g
MgCl₂×6H₂O..... 0,2 g
Dodati oko 190 mL dH₂O, rastvoriti sadržaj i dotitrovati rastvor do pH 9,5
dH₂O..... do 200 mL

Radni rastvor NBT-a

NBT..... 3 mg
Pufer za alkalnu fosfatazu..... 5 mL

Radni rastvor BCIP-a

BCIP..... 1,5 mg
Pufer za alkalnu fosfatazu..... 5 mL

Postupak za razvijanje imunoblot-a za praćenje prečišćavanja hitinaze klase I, TLP-a i β -1,3-glukanaze iz banane:

1. Nakon transfera proteina na nitroceluloznu membranu transfer je potvrđen *Poceau S* bojenjem, a zatim je membrana obezbojavana u TTBS-u,
2. blokiranje rastvorom za blokiranje A (5%-tnim obezmašćenim mlekom), 2 puta po 45 min,
3. inkubiranje sa primarnim antitelima (zečiji anti-banana IgG na ekstrakt banane, 1:20, v/v) u trajanju od 1 h,
4. ispiranje u TTBS-u 2x u trajanju od 5 min,
5. ispiranje u TBS-u u trajanju od 5 min,
6. inkubiranje sa sekundarnim antitelima (anti-zečiji IgG-AP, *Sigma*, 1:3000, v/v) u trajanju od 1 h,
7. ispiranje u TTBS-u 2x u trajanju od 5 min,
8. ispiranje u TBS-u u trajanju od 5 min,
9. inkubiranje u rastvoru NBT-a i BCIP-a u odnosu 9:1 do pojave ljubičastih traka,
10. reakcija sa alkalnom fosfatazom je obustavljena dodatkom destilovane vode.

Postupak za razvijanje IgE imunoblota sa poliklonskim anti-humanim IgE antitelima iz koze i anti-kozjim IgG-AP antitelima iz zeca:

1. Nakon transfera proteina na nitroceluloznu membranu, transfer je potvrđen *Poceau S* bojenjem, a membrana je obezbojena u dH₂O,
2. blokiranje postignuto inkubiranjem u rastvoru C (3% HSA) tokom 6 h,
3. membrana je inkubirana sa serumima pacijenata (1:4, v/v) u trajanju od 1 h,
4. membrana je ispirana u TTBS-u 2x u trajanju od 5 min,
5. membrana je ispirana u TBS-u u trajanju od 5 min,
6. membrana je inkubirana sa sekundarnim antitelima (kozji antihumani IgE (*Sigma*, Nemačka) razblaženja 1:5000, v/v) u TBS-u u trajanju od 1 h,
7. membrana je ispirana u TTBS-u 2x u trajanju od 5 min,

8. ispiranje u TBS-u u trajanju od 5 min,
9. membrane je inkubirana sa tercijarnim antitelima (zečji antikozi IgG-AP (*Sigma*, Nemačka) razblaženja 1:30000, v/v) u TBS-u u trajanju od 1 h,
10. membrana je inkubirana u rastvoru NBT-a i BCIP-a u odnosu 9:1 do pojave ljubičastih traka,
11. reakcija sa alkalnom fosfatazom je prekinuta dodatkom destilovane vode.

7.13. Kožne probe

Kožne probe su urađene na pacijentima sa prethodno dokumentovanom kliničkom istorijom alergije na bananu. Pacijentima je dezinfikovana koža unutrašnjeg dela podlaktice i zatim naneta po kap ekstrakta banane ili pojedinačnih banana alergena. Kao pozitivna kontrola korišćen je histamin-fosfata (10 mg/mL), a kao negativna kontrola fiziološki rastvor (0,9% rastvor NaCl). Region kože na mestu nanošenja se blago zagrebe lancetom (od strane stručnog medicinskog osoblja za izvođenje ovog testa) i nakon 20 min se određuje prisustvo i prečnik nastalog crvenog otoka lenjirom. Pozitivnom reakcijom smatra se pojava otoka čiji je prečnik za više od 3 mm veći od onog koji nastaje kod negativne kontrole.

8. LITERATURA

1. Flokstra-de Blok, B.M., et al., *Development of an allergy management support system in primary care*. J Asthma Allergy, 2017. **10**: p. 57-65.
2. Ryan, D., et al., *Management of allergic problems in primary care: time for a rethink?* Prim Care Respir J, 2005. **14**(4): p. 195-203.
3. Dahdah, L., et al., *Apheresis in food allergies*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2017.
4. Tuano, K.S. and C.M. Davis, *Utility of Component-Resolved Diagnostics in Food Allergy*. Curr Allergy Asthma Rep, 2015. **15**(6): p. 32.
5. Ahn, K., *The usefulness of component-resolved diagnostics in food allergy*. Allergy Asthma Immunol Res, 2014. **6**(2): p. 103-4.
6. van Veen, L.N., et al., *The diagnostic value of component-resolved diagnostics in peanut allergy in children attending a Regional Paediatric Allergology Clinic*. BMC Pediatr, 2016. **16**: p. 74.
7. O'Keefe, A.W. and M. Ben-Shoshan, *A 4-month-old baby boy presenting with anaphylaxis to a banana: a case report*. Journal of Medical Case Reports, 2014. **8**(1): p. 62.
8. Don, M. and G. Longo, *Food protein-induced enterocolitis syndrome due to banana: an uncommon entity*. Eur Ann Allergy Clin Immunol, 2013. **45**(2): p. 61-2.
9. El-Sayed, Z.A., et al., *Evaluation of banana hypersensitivity among a group of atopic Egyptian children: relation to parental/self reports*. Allergy Asthma Immunol Res, 2013. **5**.
10. Cremer, R. and O. Mennicken, *Longitudinal study on specific IgE against natural rubber latex, banana and kiwi in patients with spina bifida*. Klin Padiatr, 2011. **223**(6): p. 352-5.
11. Asero, R., G. Mistrello, and S. Amato, *Co-sensitisation (but co-recognition also) to novel banana and tomato allergens*. Eur Ann Allergy Clin Immunol, 2010. **42**(4): p. 159-62.
12. www.allergen.org.
13. Hulme, A.C., *The biochemistry of fruits and their products*. 1970, London; New York: Academic Press.
14. Kay, A.B., *Paul Ehrlich and the Early History of Granulocytes*. Microbiol Spectr, 2016. **4**(4).
15. Johansson, S.G.O., et al., *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, 2004. **113**(5): p. 832-836.
16. Vighi, G., et al., *Allergy and the gastrointestinal system*. Clin Exp Immunol, 2008. **153 Suppl 1**: p. 3-6.
17. Strachan, D.P., *Hay fever, hygiene, and household size*. BMJ : British Medical Journal, 1989. **299**(6710): p. 1259-1260.
18. Liu, A.H., *Revisiting the hygiene hypothesis for allergy and asthma*. Journal of Allergy and Clinical Immunology. **136**(4): p. 860-865.
19. Mutius, v., #160, and Erika, *Influences in allergy: Epidemiology and the environment*. Vol. 113.

- 2004, New York, NY, ETATS-UNIS: Elsevier. 7.
20. Berin, M.C. and S. Sicherer, *Food allergy: mechanisms and therapeutics*. Current Opinion in Immunology, 2011. **23**(6): p. 794-800.
 21. Larche, M., C.A. Akdis, and R. Valenta, *Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 761-771.
 22. Aalberse, R.C., *Specific IgE and IgG responses in atopic versus nonatopic subjects*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(3 Pt 2): p. S124-7.
 23. Nauta, A.J., et al., *Mechanisms of allergy and asthma*. European Journal of Pharmacology, 2008. **585**(2-3): p. 354-360.
 24. Henderson, L.L., et al., *Evaluation of IgE tests in an allergy practice*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1971. **48**(6): p. 361-365.
 25. Stone, K.D., C. Prussin, and D.D. Metcalfe, *IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils*. The Journal of allergy and clinical immunology, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S73-S80.
 26. Tyagi, N., et al., *Comparisons of Allergenic and Metazoan Parasite Proteins: Allergy the Price of Immunity*. PLoS Comput Biol, 2015. **11**(10): p. e1004546.
 27. Riley, J.F. and G.B. West, *The presence of histamine in tissue mast cells*. The Journal of Physiology, 1953. **120**(4): p. 528-537.
 28. Hubscher, T., J.I. Watson, and L. Goodfriend, *Target cells of human ragweed-binding antibodies in monkey skin. I. Immunofluorescent localization of cellular binding*. J Immunol, 1970. **104**(5): p. 1187-95.
 29. Bach, M.K., K.J. Bloch, and K.F. Austen, *IgE and IgG_a antibody-mediated release of histamine from rat peritoneal cells. I. Optimum conditions for in vitro preparation of target cells with antibody and challenge with antigen*. J Exp Med, 1971. **133**(4): p. 752-71.
 30. Tomioka, H. and K. Ishizaka, *Mechanisms of passive sensitization. II. Presence of receptors for IgE on monkey mast cells*. J Immunol, 1971. **107**(4): p. 971-8.
 31. Miescher, S.M. and M. Vogel, *Molecular aspects of allergy*. Molecular Aspects of Medicine, 2002. **23**(6): p. 413-462.
 32. Galli, S.J. and M. Tsai, *IgE and mast cells in allergic disease*. Nat Med, 2012. **18**(5): p. 693-704.
 33. Kanowitz-Klein, S., F. Hofman, and A. Saxon, *Expression of Fc epsilon receptors and surface and cytoplasmic IgE on human fetal and adult lymphopoietic tissue*. Clin Immunol Immunopathol, 1988. **48**(2): p. 214-24.
 34. Valenta, R. *The future of antigen-specific immunotherapy of allergy*. Nature Reviews Immunology, 2002. **2**: p. 446-453
 35. Suemura, M. and T. Kishimoto, *IgE class-specific regulatory factor(s) and Fc epsilon receptors on lymphocytes*. Int Rev Immunol, 1987. **2**(1): p. 27-42.
 36. Theoharides, T.C., et al., *Mast cells and inflammation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -

- Molecular Basis of Disease, 2012. **1822**(1): p. 21-33.
37. Platts-Mills, T.A., *The role of immunoglobulin E in allergy and asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(8 Pt 2): p. S1-5.
 38. Zuercher, A.W., et al., *Food products and allergy development, prevention and treatment*. Curr Opin Biotechnol, 2006. **17**(2): p. 198-203.
 39. Radauer, C., et al., *Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(4): p. 847-52.e7.
 40. Chapman, M.D., et al., *Nomenclature and structural biology of allergens*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(2): p. 414-20.
 41. Smoldovskaya, O., et al., *Allergen extracts and recombinant proteins: comparison of efficiency of in vitro allergy diagnostics using multiplex assay on a biological microchip*. Allergy Asthma Clin Immunol, 2016. **12**: p. 9.
 42. Focke, M., et al., *Heterogeneity of commercial timothy grass pollen extracts*. Clin Exp Allergy, 2008. **38**(8): p. 1400-8.
 43. Hamilton, R.G. and J. Kleine-Tebbe, *Molecular Allergy Diagnostics: Analytical Features That Support Clinical Decisions*. Current Allergy and Asthma Reports, 2015. **15**(9): p. 57.
 44. Johnson, P. and D.G. Marsh, *'Isoallergens' from rye grass pollen*. Nature, 1965. **206**(987): p. 935-7.
 45. Radauer, C., et al., *Update of the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database based on analysis of allergen sequences*. Allergy, 2014. **69**(4): p. 413-9.
 46. www.allergome.org.
 47. www.allergenonline.com.
 48. <http://research.bmh.manchester.ac.uk/informAll>.
 49. www.meduniwien.ac.at/allfam/.
 50. Subcommittee, I.W.A.N., *Allergen nomenclature*. Bulletin of the World Health Organization, 1994. **72**(5): p. 797-806.
 51. Ivanciuc, O., et al., *Structural analysis of linear and conformational epitopes of allergens*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2009. **54**(3, Supplement): p. S11-S19.
 52. Saavedra-Delgado, A.M., *Francois Magendie on anaphylaxis (1839)*. Allergy Proc, 1991. **12**(5): p. 355-6.
 53. Sulek, K., *[Nobel prize for C. Richet in 1913 for works on anaphylaxis]*. Wiad Lek, 1967. **20**(16): p. 1581.
 54. Finkelman, F.D., M.V. Khodoun, and R. Strait, *Human IgE-independent systemic anaphylaxis*. J Allergy Clin Immunol, 2016. **137**(6): p. 1674-80.
 55. Munoz-Cano, R., et al., *Mechanisms of Anaphylaxis Beyond IgE*. J Investig Allergol Clin Immunol, 2016. **26**(2): p. 73-82; quiz 2p following 83.
 56. Wawrzyniak, P., et al., *Advances and highlights in mechanisms of allergic disease in 2015*.

- Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2016. **137**(6): p. 1681-1696.
57. Sicherer, S.H. and F.E. Simons, *Epinephrine for First-aid Management of Anaphylaxis*. Pediatrics, 2017. **139**(3).
 58. Sampson, H.A., *Food allergy: when mucosal immunity goes wrong*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(1): p. 139-41.
 59. Burks, A.W., et al., *ICON: food allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(4): p. 906-20.
 60. Bock, S.A., *Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life*. Pediatrics, 1987. **79**(5): p. 683-8.
 61. Sampson, H.A., *Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **103**(5 Pt 1): p. 717-28.
 62. Jyonouchi, H., *Non-IgE mediated food allergy*. Inflamm Allergy Drug Targets, 2008. **7**(3): p. 173-80.
 63. Ćirković Veličković, T., Gavrović-Jankulović, M., *Food Allergens: Biochemistry and Molecular Nutrition*, ed. G. Michael P. Doyle, USA. 2014: Springer
 64. Sampson, H.A., et al., *Food allergy: a practice parameter update-2014*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **134**(5): p. 1016-25.e43.
 65. Weaver, L.T., et al., *Milk feeding and changes in intestinal permeability and morphology in the newborn*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1987. **6**(3): p. 351-8.
 66. Brunner, M. and M. Walzer, *Absorption of undigested proteins in human beings: The absorption of unaltered fish proteins in adults*. Archives of Internal Medicine, 1928. **42**(2): p. 172-179.
 67. Husby, S., et al., *Passage of dietary antigens into the blood of children with coeliac disease. Quantification and size distribution of absorbed antigens*. Gut, 1987. **28**(9): p. 1062-72.
 68. Husby, S., et al., *Oral tolerance in humans. T cell but not B cell tolerance after antigen feeding*. J Immunol, 1994. **152**(9): p. 4663-70.
 69. Breiteneder, H. and C. Ebner, *Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **106**(1 Pt 1): p. 27-36.
 70. Sicherer, S.H., et al., *Genetics of peanut allergy: a twin study*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **106**(1 Pt 1): p. 53-6.
 71. Hoffmann-Sommergruber, K. and E.N. Mills, *Food allergen protein families and their structural characteristics and application in component-resolved diagnosis: new data from the EuroPrevall project*. Anal Bioanal Chem, 2009. **395**(1): p. 25-35.
 72. Vieths, S., *Allergenic cross-reactivity, food allergy and pollen*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 1997. **4**(1-2): p. 61-70.
 73. Jenkins, J.A., H. Breiteneder, and E.N. Mills, *Evolutionary distance from human homologs reflects allergenicity of animal food proteins*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(6): p. 1399-405.
 74. Breiteneder, H. and E.N.C. Mills, *Molecular properties of food allergens*. Journal of Allergy and

- Clinical Immunology, 2005. **115**(1): p. 14-23.
75. van Ree, R., *Carbohydrate epitopes and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases*. Int Arch Allergy Immunol, 2002. **129**(3): p. 189-97.
 76. Pedrosa, C., et al., *Selective neoglycosylation increases the structural stability of vicilin, the 7S storage globulin from pea seeds*. Arch Biochem Biophys, 2000. **382**(2): p. 203-10.
 77. <http://foodallergens.ifr.ac.uk/>.
 78. de Jesus, O.N., et al., *Genetic diversity and population structure of Musa accessions in ex situ conservation*. BMC Plant Biol, 2013. **13**: p. 41.
 79. Heslop-Harrison, J.S. and T. Schwarzacher, *Domestication, genomics and the future for banana*. Ann Bot, 2007. **100**(5): p. 1073-84.
 80. Hyam, R. and R.J. Pankhurst, *Plants and their names : a concise dictionary*. 1995, Oxford [England]; New York; Edinburgh [England]: Oxford University Press ; Royal Botanic Gardens.
 81. Iriarte, A., M.G. Almeida, and P. Villalobos, *Carbon footprint of premium quality export bananas: case study in Ecuador, the world's largest exporter*. Sci Total Environ, 2014. **472**: p. 1082-8.
 82. Pearson, V.A., *Bananas : cultivation, consumption and crop diseases*. 2016.
 83. Der Agopian, R.G., et al., *Identification of fructooligosaccharides in different banana cultivars*. J Agric Food Chem, 2008. **56**(9): p. 3305-10.
 84. Prasanna, V., T.N. Prabha, and R.N. Tharanathan, *Fruit ripening phenomena--an overview*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2007. **47**(1): p. 1-19.
 85. White, P.J., *Recent advances in fruit development and ripening: an overview*. J Exp Bot, 2002. **53**(377): p. 1995-2000.
 86. Kanazawa, K. and H. Sakakibara, *High content of dopamine, a strong antioxidant, in Cavendish banana*. J Agric Food Chem, 2000. **48**(3): p. 844-8.
 87. Perez-Perez, E.M., et al., *Antioxidant capacity of crude extracts from clones of banana and plane species*. J Med Food, 2006. **9**(4): p. 517-23.
 88. Shewfelt, R.L., *Sources of variation in the nutrient content of agricultural commodities from the farm to the consumer*. Journal of Food Quality, 1990. **13**(1): p. 37-54.
 89. Ling, S.S., et al., *Antioxidant efficacy of unripe banana (Musa acuminata Colla) peel extracts in sunflower oil during accelerated storage*. Acta Sci Pol Technol Aliment, 2015. **14**(4): p. 343-356.
 90. Ummarat, N., et al., *Changes in antioxidants and fruit quality in hot water-treated 'Hom Thong' banana fruit during storage*. Scientia Horticulturae, 2011. **130**(4): p. 801-807.
 91. Hauswirth, D.W. and A.W. Burks, *Banana anaphylaxis with a negative commercial skin test*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**.
 92. Saraswat, A. and B. Kumar, *Anaphylactic reaction to apple, banana and lychee: what is common between botanically disparate plant families?* Int J Dermatol, 2005. **44**(12): p. 996-8.

93. Wadee, A.A., L.A. Boting, and A.R. Rabson, *Fruit allergy: demonstration of IgE antibodies to a 30 kd protein present in several fruits*. J Allergy Clin Immunol, 1990. **85**(4): p. 801-7.
94. Anderson, L.B., Jr., et al., *Melon and banana sensitivity coincident with ragweed pollinosis*. J Allergy, 1970. **45**(5): p. 310-9.
95. M'Raihi, L., et al., *Cross-reactivity between latex and banana*. Journal of Allergy and Clinical Immunology. **87**(1): p. 129-130.
96. Sakai, Y., et al., *Specific detection of banana residue in processed foods using polymerase chain reaction*. J Agric Food Chem, 2010. **58**(14): p. 8145-51.
97. Tokuyama, K., et al., *Banana allergy in infants*. Allergy, 1997. **52**.
98. Moreno-Ancillo, A., et al., *Allergy to Banana in a 5-month-old infant*. Pediatr Allergy Immunol, 2004. **15**.
99. Ito, A., et al., *A banana-allergic infant with IgE reactivity to avocado, but not to latex*. Pediatr Int, 2006. **48**(3): p. 321-3.
100. Hauswirth, D.W. and A.W. Burks, *Banana anaphylaxis with a negative commercial skin test*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(3): p. 632-3.
101. Matheu, V., et al., *IgE-mediated reaction to a banana-flavored drug additive*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **106**(6): p. 1202-3.
102. Sowka, S., et al., *Molecular and immunologic characterization of new isoforms of the Hevea brasiliensis latex allergen hev b 7: evidence of no cross-reactivity between hev b 7 isoforms and potato patatin and proteins from avocado and banana*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **104**(6): p. 1302-10.
103. Amlot, P.L., et al., *Oral allergy syndrome (OAS): symptoms of IgE-mediated hypersensitivity to foods*. Clin Allergy, 1987. **17**(1): p. 33-42.
104. Asero, R., R. Monsalve, and D. Barber, *Profilin sensitization detected in the office by skin prick test: a study of prevalence and clinical relevance of profilin as a plant food allergen*. Clin Exp Allergy, 2008. **38**.
105. Gonzalez-Mancebo, E., et al., *Prevalence of sensitization to lipid transfer proteins and profilins in a population of 430 patients in the south of Madrid*. J Investig Allergol Clin Immunol, 2011. **21**(4): p. 278-82.
106. Mikkola, J.H., et al., *Hevein-like protein domains as a possible cause for allergen cross-reactivity between latex and banana*. J Allergy Clin Immunol, 1998. **102**(6 Pt 1): p. 1005-12.
107. Sankian, M., et al., *Sequence homology: a poor predictive value for profilins cross-reactivity*. Clin Mol Allergy, 2005. **3**: p. 13.
108. Hauser, M., et al., *Panallergens and their impact on the allergic patient*. Allergy Asthma Clin Immunol, 2010. **6**(1): p. 1.
109. Witke, W., *The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(8): p. 461-9.

110. Rodriguez-Perez, R., et al., *Peach profilin: cloning, heterologous expression and cross-reactivity with Bet v 2*. Allergy, 2003. **58**(7): p. 635-40.
111. Van Loon, L.C., *Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins*. European Journal of Plant Pathology, 1997. **103**(9): p. 753-765.
112. Ovchinnikova, T.V., et al., *Plant pathogenesis-related proteins PR-10 and PR-14 as components of innate immunity system and ubiquitous allergens*. Curr Med Chem, 2016.
113. Midoro-Horiuti, T., E.G. Brooks, and R.M. Goldblum, *Pathogenesis-related proteins of plants as allergens*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2001. **87**(4): p. 261-71.
114. Ebner, C., K. Hoffmann-Sommergruber, and H. Breiteneder, *Plant food allergens homologous to pathogenesis-related proteins*. Allergy, 2001. **56 Suppl 67**: p. 43-4.
115. Sinha, M., et al., *Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families*. ScientificWorldJournal, 2014. **2014**: p. 543195.
116. www.uniprot.org.
117. www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/.
118. http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input.
119. Grob, M., et al., *Heterogeneity of banana allergy: characterization of allergens in banana-allergic patients*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2002. **89**(5): p. 513-6.
120. Mauch, F. and L.A. Staehelin, *Functional Implications of the Subcellular Localization of Ethylene-Induced Chitinase and [beta]-1,3-Glucanase in Bean Leaves*. Plant Cell, 1989. **1**(4): p. 447-457.
121. Collinge, D.B., et al., *Plant chitinases*. Plant J, 1993. **3**(1): p. 31-40.
122. Alenius, H., et al., *Prohevein from the rubber tree (Hevea brasiliensis) is a major latex allergen*. Clin Exp Allergy, 1995. **25**(7): p. 659-65.
123. Diaz-Perales, A., et al., *Cross-reactions in the latex-fruit syndrome: A relevant role of chitinases but not of complex asparagine-linked glycans*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **104**(3 Pt 1): p. 681-7.
124. Radauer, C., et al., *Latex-allergic patients sensitized to the major allergen hevein and hevein-like domains of class I chitinases show no increased frequency of latex-associated plant food allergy*. Mol Immunol, 2011. **48**(4): p. 600-9.
125. Blanco, C., *Latex-fruit syndrome*. Curr Allergy Asthma Rep, 2003. **3**(1): p. 47-53.
126. Toledo, T.T., et al., *Proteomic analysis of banana fruit reveals proteins that are differentially accumulated during ripening*. Postharvest Biology and Technology, 2012. **70**: p. 51-58.
127. Peumans, W.J., et al., *The abundant class III chitinase homolog in young developing banana fruits behaves as a transient vegetative storage protein and most probably serves as an important supply of amino acids for the synthesis of ripening-associated proteins*. Plant Physiol, 2002. **130**(2): p. 1063-72.
128. Clendennen, S.K. and G.D. May, *Differential gene expression in ripening banana fruit*. Plant

- Physiol, 1997. **115**(2): p. 463-9.
129. <http://tools.immuneepitope.org/bcell/result/>.
130. Pascal, M., et al., *Lipid transfer protein syndrome: clinical pattern, cofactor effect and profile of molecular sensitization to plant-foods and pollens*. Clin Exp Allergy, 2012. **42**(10): p. 1529-39.
131. Gaier, S., et al., *Purification and structural stability of the peach allergens Pru p 1 and Pru p 3*. Mol Nutr Food Res, 2008. **52 Suppl 2**: p. S220-9.
132. Zilversmit, D.B., *Lipid transfer proteins*. J Lipid Res, 1984. **25**(13): p. 1563-9.
133. Kader, J.C., *Lipid-transfer proteins in plants*. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1996. **47**: p. 627-654.
134. Silverstein, K.A., et al., *Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants*. Plant J, 2007. **51**(2): p. 262-80.
135. Douliez, J.P., et al., *Mini Review: Structure, Biological and Technological Functions of Lipid Transfer Proteins and Indolines, the Major Lipid Binding Proteins from Cereal Kernels*. Journal of Cereal Science, 2000. **32**(1): p. 1-20.
136. Nieuwland, J., et al., *Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco*. Plant Cell, 2005. **17**(7): p. 2009-19.
137. Salcedo, G., et al., *Plant non-specific lipid transfer proteins: an interface between plant defence and human allergy*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1771**(6): p. 781-91.
138. Fernandez-Rivas, M. and M. Cuevas, *Peels of Rosaceae fruits have a higher allergenicity than pulps*. Clin Exp Allergy, 1999. **29**(9): p. 1239-47.
139. Asero, R., et al., *Detection of clinical markers of sensitization to profilin in patients allergic to plant-derived foods*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(2): p. 427-32.
140. www.proteinmodelportal.org/query/uniprot/Q1EPI1.
141. Ashok Kumar, H.G. and Y.P. Venkatesh, *In silico analyses of structural and allergenicity features of sapodilla (Manilkara zapota) acidic thaumatin-like protein in comparison with allergenic plant TLPs*. Mol Immunol, 2014. **57**(2): p. 119-28.
142. Fils-Lycaon, B.R., et al., *A cherry protein and its gene, abundantly expressed in ripening fruit, have been identified as thaumatin-like*. Plant Physiol, 1996. **111**(1): p. 269-73.
143. Leone, P., et al., *Resolution of the structure of the allergenic and antifungal banana fruit thaumatin-like protein at 1.7-Å*. Biochimie, 2006. **88**(1): p. 45-52.
144. Vigers, A.J., W.K. Roberts, and C.P. Selitrennikoff, *A new family of plant antifungal proteins*. Mol Plant Microbe Interact, 1991. **4**(4): p. 315-23.
145. www.ncbi.nlm.nih.gov.
146. Peumans, W.J., et al., *Purification, characterization and structural analysis of an abundant beta-1,3-glucanase from banana fruit*. Eur J Biochem, 2000. **267**(4): p. 1188-95.
147. Sudisha, J., et al., *Pathogenesis Related Proteins in Plant Defense Response*, in *Plant Defence: Biological Control*, J.M. Méridon and K.G. Ramawat, Editors. 2012, Springer Netherlands:

- Dordrecht. p. 379-403.
148. Sanchez-Monge, R., et al., *Differential allergen sensitization patterns in chestnut allergy with or without associated latex-fruit syndrome*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(3): p. 705-10.
 149. Palomares, O., et al., *1,3-beta-glucanases as candidates in latex-pollen-vegetable food cross-reactivity*. Clin Exp Allergy, 2005. **35**(3): p. 345-51.
 150. Yagami, T., et al., *Significance of Carbohydrate Epitopes in a Latex Allergen with β -1,3-Glucanase Activity*. International Archives of Allergy and Immunology, 2002. **129**(1): p. 27-37.
 151. Roy Choudhury, S., S. Roy, and D.N. Sengupta, *Characterization of cultivar differences in beta-1,3 glucanase gene expression, glucanase activity and fruit pulp softening rates during fruit ripening in three naturally occurring banana cultivars*. Plant Cell Rep, 2009. **28**(11): p. 1641-53.
 152. Barre, A., et al., *Mapping of IgE-binding epitopes on the major latex allergen Hev b 2 and the cross-reacting 1,3beta-glucanase fruit allergens as a molecular basis for the latex-fruit syndrome*. Mol Immunol, 2009. **46**(8-9): p. 1595-604.
 153. Receveur-Brechot, V., et al., *Crystal structure at 1.45-Å resolution of the major allergen endo-beta-1,3-glucanase of banana as a molecular basis for the latex-fruit syndrome*. Proteins, 2006. **63**(1): p. 235-42.
 154. Shigeoka, S., et al., *Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes*. J Exp Bot, 2002. **53**(372): p. 1305-19.
 155. Wang, M., et al., *The molecular characterization of a catalase from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis**. Int J Immunogenet, 2013. **40**(3): p. 230-40.
 156. Mittler, R., et al., *Reactive oxygen gene network of plants*. Trends in Plant Science. **9**(10): p. 490-498.
 157. Blokhina, O., E. Virolainen, and K.V. Fagerstedt, *Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review*. Ann Bot, 2003. **91 Spec No**: p. 179-94.
 158. Yang, Y., et al., *Influence of drought on oxidative stress and flavonoid production in cell suspension culture of *Glycyrrhiza inflata* Batal*. Z Naturforsch C, 2007. **62**(5-6): p. 410-6.
 159. Bairoch, A., *Prosite: a dictionary of sites and patterns in proteins*. Nucleic Acids Res, 1992. **20 Suppl**: p. 2013-8.
 160. www.uniprot.org/uniprot/Q9SWP5.fasta.
 161. Beyer, W.F., Jr. and I. Fridovich, *Effect of hydrogen peroxide on the iron-containing superoxide dismutase of *Escherichia coli**. Biochemistry, 1987. **26**(5): p. 1251-7.
 162. Beyer, W.F., Jr. and I. Fridovich, *Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions*. Anal Biochem, 1987. **161**(2): p. 559-66.
 163. Williamson, J.D. and J.G. Scandalios, *Differential response of maize catalases to abscisic acid: *Vp1* transcriptional activator is not required for abscisic acid-regulated *Cat1* expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(18): p. 8842-6.
 164. Figueroa-Yáñez, L., et al., *Phylogenetic relationships and expression in response to low*

- temperature of a catalase gene in banana (Musa acuminata cv. "Grand Nain") fruit. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2012. 109(3): p. 429-438.*
165. Benndorf, D., et al., *Identification of spore allergens from the indoor mould Aspergillus versicolor*. Allergy, 2008. **63**(4): p. 454-60.
 166. Chiu, L.L., et al., *Secretome analysis of novel IgE-binding proteins from Penicillium citrinum*. Proteomics Clin Appl, 2008. **2**(1): p. 33-45.
 167. Ward, M.D.W., et al., *Human Serum IgE Reacts with a <i>Metarhizium anisopliae</i> Fungal Catalase*. International Archives of Allergy and Immunology, 2009. **150**(4): p. 343-351.
 168. Katzenstein, A.L., S.R. Sale, and P.A. Greenberger, *Pathologic findings in allergic aspergillus sinusitis. A newly recognized form of sinusitis*. Am J Surg Pathol, 1983. **7**(5): p. 439-43.
 169. Lanza, D.C., et al., *Fungus and chronic rhinosinusitis: from bench to clinical understanding*. Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl, 2006. **196**: p. 27-34.
 170. www.uniprot.org/uniprot/E9NM57.fasta.
 171. Wuthrich, B., *History of food allergy*. Chem Immunol Allergy, 2014. **100**: p. 109-19.
 172. Hamilton, R.G., *Clinical laboratory assessment of immediate-type hypersensitivity*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S284-96.
 173. Sicherer, S.H., *Food allergy*. Lancet, 2002. **360**(9334): p. 701-10.
 174. Byrne, A.M., et al., *How do we know when peanut and tree nut allergy have resolved, and how do we keep it resolved?* Clin Exp Allergy, 2010. **40**(9): p. 1303-11.
 175. Lieberman, J.A. and S.H. Sicherer, *Diagnosis of food allergy: epicutaneous skin tests, in vitro tests, and oral food challenge*. Curr Allergy Asthma Rep, 2011. **11**(1): p. 58-64.
 176. Kattan, J.D. and S.H. Sicherer, *Optimizing the diagnosis of food allergy*. Immunol Allergy Clin North Am, 2015. **35**(1): p. 61-76.
 177. Boyce, J.A., et al., *Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: summary of the NIAID-sponsored expert panel report*. Nutr Res, 2011. **31**(1): p. 61-75.
 178. Sicherer, S.H. and R.A. Wood, *Allergy testing in childhood: using allergen-specific IgE tests*. Pediatrics, 2012. **129**(1): p. 193-7.
 179. Borres, M.P., et al., *Recent advances in component resolved diagnosis in food allergy*. Allergol Int, 2016. **65**(4): p. 378-387.
 180. Antonicelli, L., et al., *Component resolved diagnosis in real life: the risk assessment of food allergy using microarray-based immunoassay*. Eur Ann Allergy Clin Immunol, 2014. **46**(1): p. 30-4.
 181. Heaps, A., et al., *The utility of the ISAC allergen array in the investigation of idiopathic anaphylaxis*. Clin Exp Immunol, 2014. **177**(2): p. 483-90.
 182. Wood, R.A., *Advances in food allergy in 2015*. J Allergy Clin Immunol, 2016. **138**(6): p. 1541-1547.
 183. Santos, A.F. and G. Lack, *Basophil activation test: food challenge in a test tube or specialist*

- research tool? Clin Transl Allergy, 2016. **6**: p. 10.
184. Abrams, E.M. and S.H. Sicherer, *Diagnosis and management of food allergy*. Cmaj, 2016. **188**(15): p. 1087-1093.
185. Cox, L., et al., *Pearls and pitfalls of allergy diagnostic testing: report from the American College of Allergy, Asthma and Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology Specific IgE Test Task Force*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2008. **101**(6): p. 580-92.
186. Pawankar, R., et al., *Overview on the pathomechanisms of allergic rhinitis*. Asia Pac Allergy, 2011. **1**(3): p. 157-67.
187. Fleischer, D.M., et al., *Oral food challenges in children with a diagnosis of food allergy*. J Pediatr, 2011. **158**(4): p. 578-583.e1.
188. Petersen, A., et al., *Phl p 3: structural and immunological characterization of a major allergen of timothy grass pollen*. Clin Exp Allergy, 2006. **36**(6): p. 840-9.
189. Schmidt, H., et al., *Detection and structural characterization of natural Ara h 7, the third peanut allergen of the 2S albumin family*. J Proteome Res, 2010. **9**(7): p. 3701-9.
190. Yates, J.R., C.I. Ruse, and A. Nakorchevsky, *Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications*. Annu Rev Biomed Eng, 2009. **11**: p. 49-79.
191. Nony, E., et al., *Proteomics for Allergy: from Proteins to the Patients*. Curr Allergy Asthma Rep, 2016. **16**(9): p. 64.
192. Cunsolo, V., et al., *Mass spectrometry in food proteomics: a tutorial*. J Mass Spectrom, 2014. **49**(9): p. 768-84.
193. Granier, F., *Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis*. Electrophoresis, 1988. **9**(11): p. 712-8.
194. Schulten, V., et al., *Previously undescribed grass pollen antigens are the major inducers of T helper 2 cytokine-producing T cells in allergic individuals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(9): p. 3459-64.
195. Bordas-Le Floch, V., et al., *Identification of Novel Short Ragweed Pollen Allergens Using Combined Transcriptomic and Immunoproteomic Approaches*. PLoS One, 2015. **10**(8): p. e0136258.
196. Batard, T., et al., *Patterns of IgE sensitization in house dust mite-allergic patients: implications for allergen immunotherapy*. Allergy, 2016. **71**(2): p. 220-9.
197. Nakamura, R. and R. Teshima, *Proteomics-based allergen analysis in plants*. J Proteomics, 2013. **93**: p. 40-9.
198. D'Alessandro, A. and L. Zolla, *We are what we eat: food safety and proteomics*. J Proteome Res, 2012. **11**(1): p. 26-36.
199. Righetti, P.G., et al., *A sarabande of tropical fruit proteomics: Avocado, banana, and mango*. Proteomics, 2015. **15**(10): p. 1639-45.

200. Selvaraju, S. and Z. El Rassi, *Liquid-phase-based separation systems for depletion, prefractionation and enrichment of proteins in biological fluids and matrices for in-depth proteomics analysis – An update covering the period 2008–2011*. *Electrophoresis*, 2012. **33**(1): p. 74-88.
201. Xiao, W., et al., *The use of one-bead one-compound combinatorial library technology to discover high-affinity alphavbeta3 integrin and cancer targeting arginine-glycine-aspartic acid ligands with a built-in handle*. *Mol Cancer Ther*, 2010. **9**(10): p. 2714-23.
202. Gonzalez-Garcia, E., et al., *Identification of plum and peach seed proteins by nLC-MS/MS via combinatorial peptide ligand libraries*. *J Proteomics*, 2016. **148**: p. 105-12.
203. Righetti, P.G. and E. Boschetti, *Global proteome analysis in plants by means of peptide libraries and applications*. *J Proteomics*, 2016. **143**: p. 3-14.
204. Veggiani, G. and A. de Marco, *Improved quantitative and qualitative production of single-domain intrabodies mediated by the co-expression of Erv1p sulfhydryl oxidase*. *Protein Expr Purif*, 2011. **79**(1): p. 111-4.
205. Ciardiello, M.A., et al., *Influence of the natural ripening stage, cold storage, and ethylene treatment on the protein and IgE-binding profiles of green and gold kiwi fruit extracts*. *J Agric Food Chem*, 2009. **57**(4): p. 1565-71.
206. Gavrovic-Jankulovic, M., et al., *Allergenic potency of kiwi fruit during fruit development*. *Food and Agricultural Immunology*, 2005. **16**(2): p. 117-128.
207. Moller, M., et al., *Determination and characterization of cross-reacting allergens in latex, avocado, banana, and kiwi fruit*. *Allergy*, 1998. **53**(3): p. 289-96.
208. Amoako-Andoh, F.O., et al., *A systematic evaluation of protocols for a proteomics analysis of (lyophilized) fruit tissues*. *Electrophoresis*, 2014. **35**(10): p. 1395-1405.
209. Carpentier, S.C., et al., *Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis*. *Proteomics*, 2005. **5**(10): p. 2497-507.
210. Vaganan, M.M., et al., *Phenylpropanoid enzymes, phenolic polymers and metabolites as chemical defenses to infection of *Pratylenchus coffeae* in roots of resistant and susceptible bananas (*Musa spp.*)*. *Indian J Exp Biol*, 2014. **52**(3): p. 252-60.
211. Surabhi, G.K., Pattanaik, S., Mohanty, S., *A comparative method for protein extraction and proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis from banana fruit*. *Horticultural Biotechnology Research*, 2016. **2**: p. 8-13.
212. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
213. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
214. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from*

polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.

9. PRILOG

Prilog disertaciji čine biografski podaci kandidata, etička dozvola i navedene publikacije koje čine deo disertacije.

9.1 Biografski podaci kandidata

Kandidat Jasna Nikolić je rođena 16.05.1987. godine u Nišu, gde je završila osnovnu školu i Gimnaziju prirodno-matematičkog smera.

Osnovne akademske studije na studijskoj grupi Biohemija na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je 2006. godine i završila 2011. godine sa prosečnom ocenom 8,55 i ocenom 10 na završnom radu. Master studije je upisala 2011. godine i završila ih 2012. godine sa prosečnom ocenom 9,80 i ocenom 10 na master radu. Iste godine je upisala i doktorske akademske studije iz biohemije. Tokom 2013. godine boravila je na dvomesečnom usavršavanju na INRA institutu (Nant, Francuska), a tokom 2014. godine na dvomesečnom usavršavanju u Naučno-istraživačkom centru Borstel (Borstel, Nemačka).

Od 01.07.2012. godine do 31.01.2013. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik na Inovacionom centru Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Od 01.02.2013. godine do 30.06.2015. godine zaposlena je na kao istraživač pripravnik na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od 01.07.2015. godine zaposlena je kao istraživač saradnik na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

9.2 Etička dozvola

Prilažemo etičku dozvolu dobijenu od strane Etičkog komisije Univerziteta u Libeku, Nemačka, kao i mišljenje Etičke komisije Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu koji su saglasni sa ovom dozvolom.



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Frau
Prof. Dr. med. Uta Jappe
Klinische und Molekulare Allergologie
Forschungszentrum Borstel
Parkallee 35

23845 Borstel

Ethik-Kommission

Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Universität zu Lübeck
Stellv. Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. F. Gieseler
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann
Tel.: +49 451 500 4639
Fax: +49 451 500 3026

ethikkommission@uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 13-086

Datum: 29. Juli 2013

Sitzung der Ethik-Kommission am 06. Juni 2013

Antragsteller: Frau Prof. Jappe / Herr Prof. Zabel

Titel: Untersuchung der Entstehung von Allergien auf seltene Nahrungsmittelallergenquellen, ihrer klinischen Ausprägung und Signifikanz im Vergleich zu anderen allergologischen Krankheitsbildern und der verantwortlichen Einzel-Allergene

Sehr geehrte Frau Prof. Jappe,

vielen Dank für Ihr Schreiben vom 17. Juli 2013, in dem Sie unserem Wunsch nach weiteren Informationen zum Studienvorhaben nachkommen und die überarbeiteten Unterlagen vorlegen.

Die Kommission hat nunmehr keine Bedenken mehr.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden. Die ärztliche und juristische Verantwortung des Studienleiters und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß bin ich

Ihr

Prof. Dr. med. Frank Gieseler
Stellv. Vorsitzender



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 16
11000 БЕОГРАД
Република СРБИЈА
Тел: +381 11 2186 635
Факс: +381 11 2638 500
Е-пошта: dekanat@bio.bg.ac.rs

ЕТИЧКА КОМИСИЈА
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ


Решење бр. ЕК-БФ- 2016/04

МИШЉЕЊЕ ЕТИЧКЕ КОМИСИЈЕ О ИЗДАТОЈ ДОЗВОЛИ ЗА РАД СА
ЖИВОТИЊАМА, ЖИВОТИЊСКИМ ОРГАНИМА И ТКВИМА У ИНОСТРАНСТВУ

Поводом захтева **Јасне Николић**, студента докторских студија, за издавање дозволе за рад од стране Етичке комисије у сврхе истраживања за израду докторске дисертације, Етичка комисија Биолошког факултета је након детаљног разматрања захтева и провере документације извела закључак да је дозвола Етичке комисије коју поседује институција где је урађен експериментални део дисертације валидан и да је мишљење чланова да кандидат поседује важећу дозволу за рад издату од стране надлежне институције.

У прилогу је документација која доказује поседовање дозволе бр. 13-086 издата 29.07.2013. године Либек Универзитет.

У Београду,
31.03.2016. године


Др вет. мед. Јовановић Милош
Председник Етичке комисије
Биолошки факултет

9.3 Publikacije koje čine deo disertacije

1. Nikolic J., Nesic A., Kull S., Schocker F., Jappe U., Gavrovic-Jankulovic M. Employment of combinatorial peptide ligand libraries for the identification of catalase as novel allergen from banana fruit. *Manuscript in preparation*;
2. Nikolic, J., Popovic, M., Gavrovic-Jankulovic, M. Bananas: Cultivation, Consumption and Crop Diseases (2016) Banana as a Food Allergen Source, Nova Science publishing, Chapter 5 pp. 107-126, ISBN 978-1-63485-429-0;
3. Jappe U., Nikolic J., Opitz A., Homann A., Zabel P., Gavrovic-Jankulovic M. Apparent IgE negative anaphylactic reaction to banana combined with kiwi allergy – complementary diagnostic value of purified single banana allergens. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* (2015) 30:1220-2;
4. Nikolic J., Mrkic I., Grozdanovic M., Popovic M., Petersen A., Jappe U., Gavrovic-Jankulovic M. Protocol for simultaneous isolation of three important banana allergens. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* (2014) 962:30-6;
5. Klein H., Nikolic J., Gavrovic-Jankulovic M., Jappe U. Anaphylactic reaction to banana:genuine class I food allergy–pollen-food or latex-fruit syndrome? *Allergologie* (2013) 36 :384-91.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Јасна Николетић

број уписа Д507/2012

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

"УНАПРЕЂЕЊЕ ДИЈАГНОСТИЧКИХ РЕАГЕНАСА ЗА АЛЕРГИЈУ
НА БАНАНУ"

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

Потпис докторанда

У Београду, 11.09.2017. ГОДИНЕ

Јасна Николетић

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Јасна Николит

Број уписа Д507/2012

Студијски програм Биохемија

Наслов рада Унапређење дијагностичких реагенаса за алергију на банану

Ментор Проф. др Марија Гавровић-Јанкуловић

Потписани М. Гавровић-Јанкуловић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 11.09.2017. године

Јасна Николит

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„УНАПРЕЂЕЊЕ ДИЈАГНОСТИЧКИХ РЕАГЕНСА ЗА АЛЕРГИЈУ НА БАНАНУ“

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 11.09.2017. ГОДИНЕ

Јасна Николит