



UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET

Tatjana N. Đurašinović

**Ispitivanje alergenosti prirodne i
rekombinantno proizvedene S-adenozil-L-
homocistein hidrolaze iz banane (*Musa
acuminata* Colla)**

Doktorska disertacija

Beograd, 2024



UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY

Tatjana N. Đurašinović

**Testing of allergenicity of natural and
recombinantly produced S-adenosyl-L-
homocysteine hydrolase from banana (*Musa
acuminata* Colla)**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

Mentor:

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

Članovi komisije:

dr Zoran Vujčić
redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

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

dr Radivoje Prodanović
redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Zahvaljujem se najpre i najviše svom mentoru, dr Mariji Gavrović-Jankulović, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu što me je podržala u nameri da se upustim u doktorske studije i primila u svoju laboratoriju gde sam tokom ovih dugih godina savladala nove veštine, stekla nova saznanja i proširila vidike. Takođe se zahvaljujem na pruženoj pomoći tokom izrade ove disertacije, na sugestijama, usmeravanjima, strpljenju i razumevanju.

Zahvaljujem se dr Zoranu Vujčiću, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, dr Lidiji Burazer, višem naučnom saradniku iz Instituta za virusologiju, vakcine i serume "Torlak" kao i dr Radivoju Prodanoviću, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na veoma korisnim savetima i sugestijama koje sam dobila tokom izrade disertacije. Velika mi je čast što su prihvatili uloge članova Komisije za ocenu i odbranu ove disertacije.

Zahvaljujem se posebno dr Andrijani Nešić, dr Jovani Trbojević-Ivić, dr Isidori Protić-Rosić i dr Zorani Lopandić na saradnji, pomoći i podršci. Davale su nadu i optimizam u ključnim momentima i ostavile beskrajni osećaj topline i pozitivne energije. Želim im svu sreću na privatnom i profesionalnom planu.

Zahvaljujem se na saradnji i pomoći svim ostalim kolegama iz laboratorije 429, kolegama iz Instituta za virusologiju, vakcine i serume "Torlak", kolegama iz Istraživačkog centra u Borstelu kao i kolegama iz Odseka za biohemiju i molekularnu biologiju Univerziteta Južne Danske iz Odense.

Zahvaljujem se kolegama iz Instituta za medicinsku biohemiju VMA, Beograd, na moralnoj podršci, doniranju banana, na korisnim savetima i slušanju jadikovki i problematike koja im nije prioritet.

Zahvaljujem se svojoj porodici na ljubavi, razumevanju, strpljenju i podršci svih ovih godina. Bez njih sve ovo, kao ni život, ne bi imao smisla.

Svima će život biti lepši i lakši kad se stavi tačka na ovaj rad.

Naslov doktorske disertacije: Ispitivanje alergnosti prirodne i rekombinantno proizvedene S-adenozil-L-homocistein hidrolaze iz banane**IZVOD**

Banana je namirnica koja se zbog svog nutritivnog sastava i blagog ukusa veoma rano uvodi u ishranu odojčadi. Uprkos brojnim prednostima, primećeni su slučajevi pojave alergijskih reakcija. Uglavnom su registrovani blaži simptomi, ali su zabeleženi i slučajevi anafilaksije.

Trenutno se za dijagnostiku alergija na bananu koriste reagensi koji nisu pouzdani. Sa ciljem unapređenja dijagnostike alergije na hranu, preporučuje se upotreba pojedinačnih prečišćenih prirodnih ili rekombinantno dobijenih alergena u okviru "component-resolved allergy diagnosis". Do sada je registrovano šest alergena iz banane, ali je pokazano da postoji još IgE reaktivnih proteina (WHO/IUIS baza podataka) koji do sada nisu opisani kao alergeni. Među ovim proteinima je i S-adenozil-L-homocistein hidrolaza koja je izolovana iz banane i proizvedena rekombinantnom DNK tehnologijom kako bi se ispitaio njen alergeni potencijal. IgE reaktivnost nSAHH i rSAHH je pokazana u imunoblotu sa pulom seruma, kao i sa pojedinačnim serumima pacijenata alergičnih na bananu. Na osnovu naših istraživanja i literaturnih podataka pretpostavljeno je da SAHH učestvuje u ukrštenoj reaktivnosti. BLAST pretragom NCBI baze podataka nađeni su homolozi SAHH u tri poznata alergena izvora: ljulj (*Lolium perenne*), kivi (*Actinidia chinensis*) i lateks (*Hevea brasiliensis*). Merenjem enzimske aktivnosti pokazano je prisustvo SAHH u proteinskom ekstraktu ljulja, kivija i lateksa, a imunoblot analizom je pokazana IgE reaktivnost na SAHH iz banane kod pacijenata alergičnih na ljulj, kivi i lateks.

In silico analizom je pronađeno pet visokokonzerviranih linearnih B-ćelijskih epitopa, što potvrđuje hipotezu o učešću SAHH u ukrštenoj reaktivnosti, a utvrđeni su i T-ćelijski epitopi, bitni kod CRD dijagnostike. Oni pružaju uvid u obrasce ukrštene reaktivnosti, mogu poboljšati preciznost dijagnostike alergija i mogu predstavljati potencijalne kandidate za imunoterapiju (AIT).

Visoka homologija u aminokiselinskoj sekvenciji SAHH kod više alergeni izvora ukazuje na potrebu za sveobuhvatnom dijagnostikom i terapijskim pristupom koji uzima u obzir i mehanizme ukrštene reaktivnosti posredovane IgE antitelima i T-ćelijama.

Ključne reči: Alergija na hranu, banana, S-adenozil-L-homocistein hidrolaza (SAHH), panalergen, ukrštena reaktivnost

Naučna oblast: Prirodno-matematičke nauke

Uža naučna oblast: Biohemija

Title of Doctoral Dissertation: Testing of allergenicity of natural and recombinantly produced S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from banana**ABSTRACT**

Banana is a food that, due to its nutritional composition and mild taste, is introduced very early into the diet of infants. Despite the numerous benefits of bananas, cases of allergic reactions have been observed. Milder symptoms were mostly registered, but cases of anaphylaxis were recorded as well.

The reagents in use for the diagnosis of banana allergies are not reliable. In order to improve the diagnosis of food allergy, the use of individual purified natural or recombinantly obtained allergens in "component-resolved allergy diagnosis" is recommended. There are six banana allergens registered so far, but it has been shown that there are more IgE reactive proteins (WHO/IUIS database) that have not been described as allergens yet. Among these proteins is S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, which was isolated from banana and produced by recombinant DNA technology to investigate its allergenic potential. IgE reactivity to nSAHH and rSAHH was demonstrated in an immunoblot with pooled serum, as well as with individual sera from banana-allergic patients. Based on our research and literature data, it was hypothesized that SAHH participates in cross-reactivity. A BLAST search of the NCBI database showed that SAHH homologs can be found in three known allergen sources: ryegrass (*Lolium perenne*), kiwifruit (*Actinidia chinensis*) and latex (*Hevea brasiliensis*). Measuring the enzyme activity showed that SAHH is present in the protein extract of ryegrass, kiwifruit and latex, and immunoblot analysis showed IgE reactivity to SAHH from banana in patients allergic to ryegrass, kiwifruit and latex.

Five highly conserved linear B-cell epitopes were found by *in silico* analysis, which confirms the hypothesis that SAHH participates in cross-reactivity, and T-cell epitopes were also identified, which is significant in CRD diagnostics because it provides insight into cross-reactivity patterns and can improve the accuracy of allergy diagnostics, and also shared T-cell epitopes may represent potential candidates for immunotherapy (AIT).

The high homology in the amino acid sequence of SAHH among multiple allergen sources indicates the need for a comprehensive diagnostic and therapeutic approach that takes into account the mechanisms of cross-reactivity mediated by IgE antibodies and T-cells.

Key words: Food allergy, banana, S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase (SAHH), panallergen, cross-reactivity

Scientific field: Life sciences

Scientific subfield: Biochemistry

SPISAK SKRAĆENICA

ASIT - alergen-specifična imunoterapija

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

BSA - goveđi serum albumin

CBB - eng. *Coomassie brilliant blue*

CD - cirkularni dihiroizam

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

DTNB - 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoata

EDTA – etilendiamin tetrasirćetna kiselina

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

FcεRI - visokoafinitetni receptor za IgE

GIT - gastrointestinalni trakt

IEF - izoelektrofokusingiranje

IgE - imunoglobulin E

IMAC - imobilizovana metal-afinitetna hromatografija (*Immobilized metal affinity chromatography*)

ImmunoCAP - eng. *Immuno Solid-phase Allergy Chip*

IPTG - izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid

MHC – glavni kompleks tkivne podudarnosti

MS - masena spektrometrija

NBT- 4-nitroblue tetrazolium

NC – nitroceluloza

PCR – lančana reakcija polimeraze

SAHH - S-adenozil-*L*-homocistein-hidrolaza

nSAHH - prirodna SAHH

rSAHH - rekombinantna SAHH

SDS-PAGE - eng. *Sodium Dodecylsulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*

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

TBS - TRIS-om puferisan fiziološki rastvor

TCA - trihlorsirćetna kiselina TEMED - N,N,N',N'-tetrametiletildiamin

Th 1 – pomoćničke T ćelije tipa 1

Th 2 – pomoćničke T ćelije tipa 2

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

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPŠTI DEO.....	2
2.1 Alergija.....	2
2.1.1 Imunoglobulin E (IgE) i alergijske reakcije posredovane IgE antitelima	2
2.1.2 Alergeni.....	3
2.1.3 Nutritivne alergije	5
2.1.4 Nastanak nutritivnih alergija posredovanih IgE antitelima.....	7
2.1.5 Nutritivni alergeni	8
2.1.6 B ćelijski epitopi i T ćelijski epitopi alergena.....	11
2.1.7 Ukrštena reaktivnost alergernih proteina.....	12
2.2 Banana (<i>Musa acuminata</i>)	13
2.2.1 Alergeni iz banane	14
2.2.2 S-adenozil- <i>L</i> -homocistein-hidrolaza iz banane.....	15
2.3 Dijagnostika nutritivnih alergija i potencijali unapređenja dijagnostičkih reagenasa za alergije	16
2.3.1 Alergeni proizvedeni rekombinantnom DNK tehnologijom.....	17
2.3.2 Dijagnostika razdvojena na komponente (<i>Component resolved diagnostic - CRD</i>).....	18
3. CILJ RADA.....	19
4. REZULTATI.....	20
4.1 Priprema proteinskog ekstrakta banane	20
4.2 Izolovanje i prečišćavanje nSAHH iz banane.....	20
4.3 Masena spektroskopija prirodne SAHH	23
4.4 Analiza zastupljenosti SAHH u pulpi banana različitih stadijuma zrelosti	24
4.5 Rekombinantna S-adenozil- <i>L</i> -homocistein-hidrolaza.....	25
4.6 Dizajn pET-23b-SAHH plazmida	26
4.7 Proizvodnja rekombinantne SAHH u <i>E. coli</i>	28
4.8 Optimizacija ekspresije rekombinante SAHH	29
4.8.1 Selekcija ekspresionog sistema.....	29
4.8.2 Praćenje proizvodnje rSAHH u različitim sojevima <i>E. coli</i>	30
4.8.3 Optimizacija temperature, koncentracije IPTG i vremena ekspresije.....	31
4.9 Prečišćavanje rekombinantne SAHH metal-afinitetnom hromatografijom	32
4.10 Karakterizacija rekombinantne S-adenozil- <i>L</i> -homocistein-hidrolaze.....	32
4.10.1 Određivanje molekulske mase i <i>pI</i> vrednosti rSAHH.....	32
4.10.2 Imunodetekcija 6His rSAHH	33

4.10.3	Određivanje enzimske aktivnosti SAHH	34
4.10.4	Određivanje temperaturnog i pH optimuma enzimske aktivnosti rekombinantne SAHH..	34
4.10.5	Određivanje kinetičkih parametara SAHH	35
4.11	Masena spektrometrija rekombinantne SAHH iz banane	36
4.12	CD karakterizacija i 3D modelovanje	36
4.13	Ispitivanje IgE reaktivnosti rSAHH i nSAHH.....	38
4.14	Molekulske osnove ukrštene reaktivnosti SAHH i B ćelijski epitopi.....	40
4.15	Profilisanje B i T ćelijskih epitopa.....	43
4.15.1	Bioinformatička analiza aminokiselinske sekvence SAHH za kivi (<i>Actinidia chinensis</i>), ljulj (<i>Lolium perenne</i>) i lateks (<i>Hevea brasiliensis</i>).....	43
4.15.2	Profilisanje T ćelijskih epitopa.....	45
4.16	Ispitivanje prisustva SAHH aktivnosti u alergenicim ekstraktima	48
4.17	Detekcija SAHH-specifičnog IgE kod osoba alergičnih na ljulj, lateks i kivi	49
5.	DISKUSIJA	50
6.	ZAKLJUČAK	54
7.	MATERIJAL I METODE.....	55
7.1	Priprema alergenicih ekstrakta.....	55
7.1.1	Priprema ekstrakta banane	55
7.1.2	Priprema ekstrakta kivija	55
7.1.3	Priprema ekstrakta polena ljulja.....	55
7.1.4	Rastvor lateksa	56
7.2	Koncentrovanje proteina	56
7.2.1	Koncentrovanje proteina precipitacijom amonijum-sulfatom.....	56
7.2.2	Koncentrovanje proteina liofilizacijom.....	57
7.3	Prečišćavanje prirodnog SAHH.....	57
7.3.1	Jonoizmenjivačka hromatografija na Hi Trap SP FF koloni	58
7.3.2	Jonoizmenjivačka hromatografija na Hi Trap QFF koloni.....	58
7.4	Određivanje koncentracije proteina	59
7.4.1	Određivanje koncentracije proteina <i>Bradford</i> -ovim reagensom	59
7.4.2	Određivanje koncentracije proteina spektrofotometrijski merenjem A _{280nm}	62
7.4.3	Određivanje koncentracije proteina korišćenjem eseja sa bicinoninskom kiselinom (BCA) ..	62
7.5	Elektroforetske tehnike	62
7.5.1	Agarozna elektroforeza	62
7.5.2	Natrijum dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS PAGE)	63
7.6	Izoelektrofokusanje i 2D elektroforeza prečišćenih proteina	66

7.7	Određivanje pI rekombinantne SAHH.....	68
7.8	Gel filtracija	69
7.9	Masena spektrometrija SAHH	70
7.9.1	Priprema SAHH uzoraka za analizu masenom spektrometrijom: tripsinska digestija proteina	70
7.9.2	Masena spektrometrija	70
7.10	CD (circular dichroism) analiza rSAHH.....	70
7.11	Imunohemijske tehnike- Imunoblot	71
7.11.1	Detekcija proteina u imunoblotu (opšti protokol).....	71
7.11.1	Detekcija IgE reaktivnosti prirodnog i rekombinantnog SAHH proteina u imunoblotu	73
7.11.2	Dot blot	73
7.12	Proizvodnja i prečišćavanje rekombinantnog SAHH	73
7.12.1	Priprema čvrstih i tečnih podloga i antibiotika	73
7.12.2	Rastvori antibiotika.....	74
7.12.3	Priprema kompetentnih ćelija	75
7.12.4	Transformacija kompetentnih ćelija.....	75
7.12.5	Izolovanje pUC57-SAHH i pET-23b vektora iz DH5 α ćelija.....	76
7.12.6	Digestija izolovanih pUC57-SAHH i pET-23b vektora.....	76
7.12.7	Ligacija gena za SAHH u pET-23b vektor.....	77
7.12.8	Amplifikacija gena za SAHH reakcijom lančanog umnožavanja (colony PCR).....	77
7.13	Liziranje ćelija	77
7.13.1	Liziranje ćelija ultrazvukom	77
7.13.2	Liziranje ćelija lizozimom	77
7.14	Optimizacija ekspresije rekombinantne SAHH	77
7.15	Metal-afinitetna hromatografija (Imobilized-metal affinity chromatography) (IMAC)	78
7.16	Određivanje enzimske aktivnosti SAHH Ellman-ovim reagensom.....	78
7.17	Bioinformatička analiza, 3D modelovanje i <i>in silico</i> mapiranje T ćelijskih epitopa	79
7.18	Serumi pacijenata.....	80
8.	LITERATURA	81

1. UVOD

Alergije predstavljaju prekomerni odgovor organizma na inače bezopasne supstancije iz naše okoline. Trenutno su jedno od najčešćih hroničnih oboljenja u svetu. Osobe sa porodičnom istorijom imaju povećan rizik ka razvijanju alergija. Između 20 i 30% svetske populacije pati od nekog oblika alergije (1). Na globalnom nivou, prevalenca oboljevanja od alergija je u porastu kako u razvijenim, tako i u nerazvijenim zemljama. Ovaj porast je posebno dramatičan kod dece.

Između 200 i 250 miliona ljudi na planeti (2) pati od alergija na hranu. Najčešće namirnice koje izazivaju alergijske reakcije su jaja, mleko, kikiriki, morski plodovi, koštunjavo voće i riba. Simptomi alergijskih reakcija mogu varirati od blagih kao što su crvenilo i koprivnjača, pa sve do životno ugrožavajućih - kao što je anafilaksija.

Banana (*Musa acuminata*) je namirnica koja se zbog svog nutritivnog sastava, blagog ukusa i niskog alergenog potencijala veoma rano uvodi u ishranu odojčadi (3). Međutim, primećeni su slučajevi alergijskih reakcija na bananu i kod beba starosti 5 - 7 meseci. Uglavnom su registrovani blaži simptomi ali su zabeleženi i slučajevi anafilaksije. Do sada je registrovano 6 alergena iz banane. Smatra se da alergenih proteina u banani ima znatno više, ali ih je zbog kompleksnosti matriksa teže izolovati i strukturno i imunološki okarakterisati (4,5).

Sa ciljem da se unapredi dijagnostika alergije na hranu, umesto alergenskih ekstrakata u kojima postoji varijacija u sastavu i koncentraciji alergena, preporučuje se upotreba pojedinačnih prečišćenih prirodnih ili rekombinantno dobijenih alergena što je označeno kao „component-resolved allergy diagnosis“ (6).

2. OPŠTI DEO

2.1 Alergija

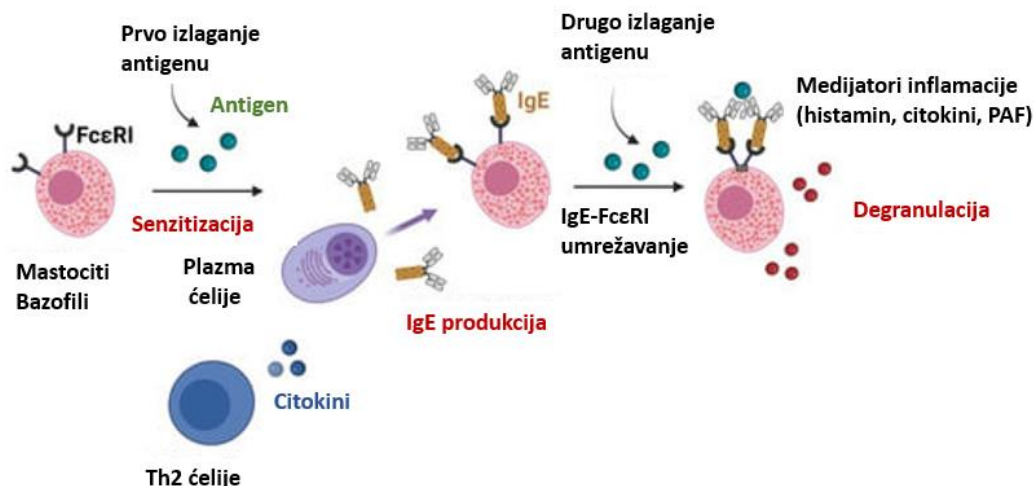
Termin alergija prvobitno je definisan od strane svetski priznatog pedijatra austrijskog porekla, Klemens fon Pirke (Clemens Von Pirqete, 1874 - 1929) koji je ovim nazivom opisao promene u reaktivnosti organizma nakon kontakta imunskog sistema sa stranim antigenima koje je nazvao alergeni (7, 8). Opisujući „serumsku bolest“ kod dece kojima je dat životinjski serum primetio je da se reakcija razvija u dva pravca: dolazi do razvoja zaštite od infekcije, ali istovremeno dolazi i do senzitivacije koja može imati fatalan ishod. Prepoznao je i da senzitivacija alergenom dovodi do ubrzanog odgovora nakon ponovljenog kontakta. Prvobitna definicija alergija predložena 1906. godine se odnosila uopšteno na kvalitativne i kvantitativne promene u reakciji organizma, u smislu i hiper- i hipo- reaktivnosti izazvane stranom supstancijom koju je nazvao alergen. Danas je definicija alergija izmenjena (9) i odnosi se na specifične hipersenzitivne reakcije organizma na strane antigene koji su u principu bezopasni.

2.1.1 Imunoglobulin E (IgE) i alergijske reakcije posredovane IgE antitelima

Definicijom reakcija preosetljivosti koju su 1963. god predložili Gel i Kumbs- (Gell i Coombs) a kasnije dopunio Rajan (Rajan) (10) preosetljivosti se dele na četiri tipa: brze reakcije preosetljivosti posredovane IgE antitelima uz aktivaciju Th2 ćelija – tip I, tip II – citotoksična reakcija posredovana antitelima, tip III – reakcija gde dolazi do stvaranja imunskih kompleksa, uključena su IgG i IgM antitela i tip IV – reakcija posredovana T ćelijama ili odložena reakcija. Kada se govori o alergijama, obično se misli na reakcije preosetljivosti tipa I koje su posredovane IgE antitelima. IgE ima molekulska masu oko 190 kDa i u odnosu na ostale klase antitela, najmanje je zastupljen u organizmu. Kod atopičnih osoba nivo IgE antitela može biti višestruko povećan, što predstavlja predispoziciju za pojavu imunskog odgovora na različite alergene. Mehanizam nastanka alergijske reakcije obuhvata dve faze. Prva je označena kao senzitivacija i u toj fazi dolazi do prvog kontakta alergena sa organizmom. U ovoj fazi alergen biva prepoznat od strane ćelija imunskog sistema, i kao krajnji rezultat stimuliše se sinteza specifičnih IgE antitela koja se vezuju za visokoafinitetne receptore na površini mastocita i bazofila. U drugoj fazi koja je označena kao reaktivna faza, pri ponovnom kontaktu sa alergenom ova specifična IgE antitela prepoznaju alergen, vezuju ga i dolazi do pokretanja mehanizma kojim se oslobađaju medijatori iz ćelija a zatim i do alergijske reakcije (11, 12).

Prepoznavanje alergena od strane IgE antitela koja se nalaze na površini mastocita vezana za visokoafinitetne receptore (FcεRI) dovodi do aktiviranja tirozin-aktivirajućih motiva (ITAM) koji aktiviraju MAP kinaznu kaskadu i fosfatidilinozitol specifičnu fosfolipazu C koja katalizuje oslobađanje inozitol trifosfata (IP3) i diacilglicerola (DAG) sa membranskog fosfatidil inozitola 2 (PIP2). Inozitol trifosfat (IP3) izaziva oslobađanje unutarćelijskog kalcijuma iz endoplazmatičnog retikuluma što dovodi do degranulacije mastocita i oslobađanja medijatora. MAP kinaza i kalcijum aktiviraju citosolni enzim fosfolipazu A2 koja stimuliše sintezu lipidnih medijatora prostaglandina i leukotrtijena. Ras/MAP kinaza u prisustvu kalcijuma i PKC stimuliše ekspresiju gena za citokine, dovodi do oslobađanja TNF i citokina, između ostalih IL-4, IL-5, IL-6, IL-13.

Lipidni medijatori, citokini i histamin dovode do inflamatornog odgovora praćenog kliničkim simptomima alergije (13 - 16).



Slika 1. Put IgE posredovane reakcije na alergen (17).

Medijatori oslobođeni iz ćelija utiču na različita tkiva i organe, dovode do kontrakcije glatke muskulature uključujući bronhije i creva, kao i do dilatacije kapilara, čime se povećava njihova propustljivost i može doći do otoka (18).

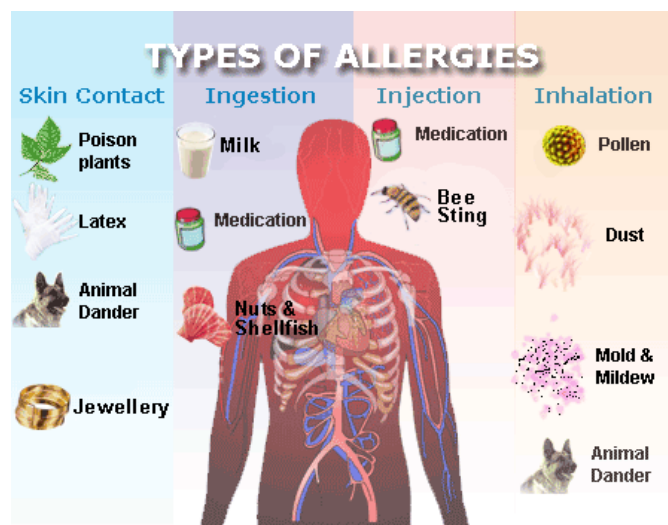
2.1.2 Alergeni

Alergeni predstavljaju supstance koje su inače bezopasne koje kod pojedinih osoba (atopičari) mogu izazvati alergijsku reakciju. Mogu se klasifikovati na više načina: na osnovu prirode alergena, porekla i načina na koji dolaze u kontakt sa organizmom (19).

Alergeni prema načinu unošenja u organizam mogu biti

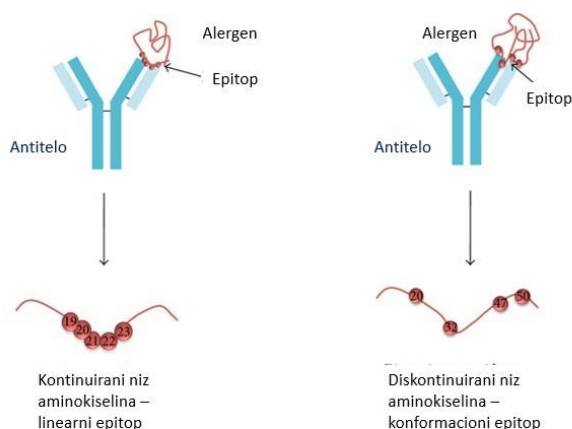
1. inhalatorni (polen drveća, trava, korova, spore plesni, unose se udisanjem)
2. nutritivni (alergeni iz različitih vrsta hranljivih namirnica, unose se ishranom)
3. venomi (otrovi insekata, penicilini, unose se injektovanjem)
4. kontaktne alergeni (otrovne biljke, lateks, nakit, životinjska dlaka, unose se kontaktom)

U početku alergeni su opisivani korišćenjem generičkih imena kao što su Antigen E, Rye 1, Cat 1 i dešavalo se da se koriste različita imena za isti alergen. Na međunarodnom simpozijumu alergologa održanom 1980. godine, ustanovljena je nomenklatura i kriterijumi koji su se odnosili na biohemijske osobine i važnost koji bi kvalifikovali alergene u novi sistem. Nomenklatura je prihvaćena 1986, a zatim revidirana 1994 godine. Alergeni se imenuju korišćenjem prva tri slova roda, zatim jedno slovo (sa razmakom) koje označava vrstu i na kraju je broj koji predstavlja hronološki redosled kojim je alergen izolovan i prečišćen (npr. glavni alergen mačke koji je prethodno označen kao Cat-1 je postao *Felis domesticus* Allergen 1 ili Fel d 1) (19).



Slika 2. Tipovi alergija (<https://jivahealth.com/what-is-allergy/>).

Specifična IgE antitela prepoznaju određene strukture na alergenima za koje se vezuju, označene kao epitopi (20). Epitopi mogu biti linearni ili konformacioni. Linearni epitopi su kratke sekvencije od nekoliko uzastopnih aminokiselina koju prepoznaju antitela. Konformacione epitope formiraju sekvenciono udaljene, ali prostorno bliske, aminokiseline koje formiraju trodimenzionu strukturu koju prepoznaju specifična antitela (21).



Slika 3. Linearni i konformacioni epitopi (22).

Početkom 21-og veka formirana je Strukturna baza alergernih proteina (Structural Database of Allergenic Proteins – SDAP), kompjuterska baza podataka i prvi vebsajt koji omogućava brzu pretragu struktura i sekvenci alergernih proteina, omogućava identifikaciju sekvencije i funkcionalne sličnosti među ovim proteinima (23 - 24) i predviđa potencijalnu alergenost novih proteina (25).

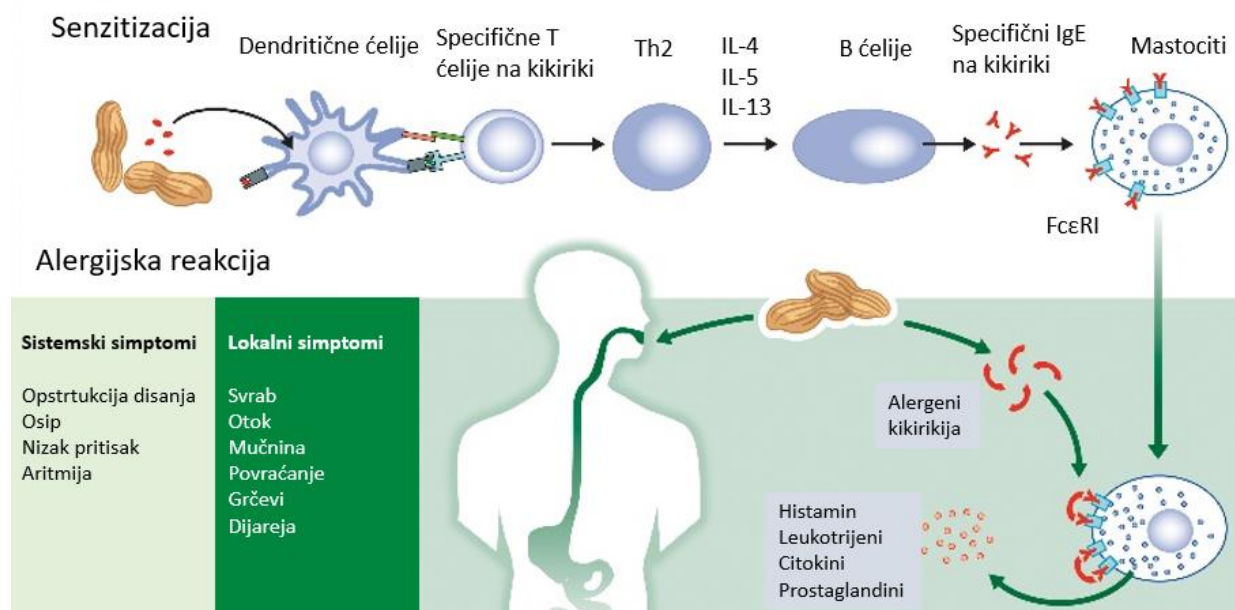
2.1.3 Nutritivne alergije

Evidentan je porast oboljevanja od alergija u poslednjih nekoliko decenija, što se dovodi u vezu sa uslovima života, zloupotrebom hemikalija, razvojem industrije, više vremena provedenog u zatvorenom prostoru. Primećen je znatan porast oboljevanja od inhalatornih alergija od 60-tih godina prošlog veka dok je oko 1990. ovaj trend poprimio epidemijski oblik (26) posebno u industrijski razvijenim zemljama. Od 1990 primećen je značajan porast oboljevanja od nutritivnih alergija. U svetu je oko 8% dece i 10% odraslih pogođeno alergijama na hranu (27- 29). Alergije na hranu su poseban problem u pedijatrijskoj populaciji. Razvijaju se u prve dve godine života, u periodu koji je ključan za rast i razvoj. Iako bilo koja namirnica može dovesti do alergijske reakcije, nekoliko namirnica se izdvajaju kao najčešći uzročnici. Oko 85% svih nutritivnih alergija izazivaju kikiriki, mleko, jaja, pšenica, riba, orašasti plodovi, školjke, i soja (30). Alergije na hranu su povezane sa brojnim jasno opisanim simptomima i mogu obuhvatiti više sistema kao što su koža, gastrointestinalni i respiratorni trakt i kardiovaskularni sistem. Reakcije na koži su najčešća klinička manifestacija alergijskih reakcija na hranu i obuhvataju akutnu urtikariju, angioedem i crvenilo (31). Tipični simptomi vezani za respiratorni trakt su edem larinksa, rinoreja i bronhospazam (32). Simptomi koji se javljaju u gastrointestinalnom traktu su mučnina, povraćanje, bol u trbuhu, dijareja (33). Reakcije se mogu pojaviti veoma brzo, nekoliko minuta nakon kontakta sa određenom namirnicom, a ređe do pojave simptoma može doći i nakon nekoliko sati. Simptomi mogu biti u rasponu od blagih (svrab, pojava crvenila) do teških (oticanje usana i jezika, otežano disanje, učestalo povraćanje i dijareja) koje mogu biti i životno ugrožavajuće (anafilaksija). Anafilaksija je najozbiljnija reakcija koja se razvija u rasponu od 2 minuta do 2 sata nakon uzimanja hrane (34). U SAD se registruje oko 200 smrtnih slučajeva godišnje zbog alergije na hranu (35 - 37). Postoje brojni simptomi i znaci anafilaksije i ove rane znake ne treba ignorisati. Iako su kikiriki, koštunjavo voće i školjke najodgovorniji za razvoj anafilaksije, mogu je pokrenuti i drugi alergeni hrane (35).



Slika 4. Alergeni hrane.

Kod alergija na hranu dve glavne strategije tretmana su izbegavanje unosa namirnica koje izazivaju alergiju (38) i lečenje akutnih simptoma medikamentima (39 - 40). Isključivanje namirnica iz ishrane ima uticaja na kvalitet života, a može nastati deficit određenih nutrijenata sa posledicama po zdravlje. Ishrana dece sa alergijama na hranu zahteva praćenje, kako bi se izbegla alergijska reakcija, a u isto vreme potrebno je obezbediti sve potrebne makro (ugljeni hidrati, proteini i masti) i mikronutrijente (vitamini, minerali, elementi u tragovima). U tom smislu, potrebno je uvesti alternativne namirnice koje mogu adekvatno zameniti one koje su izbačene iz ishrane. Količina nutrijenata potrebna za normalan rast i razvoj zavisi od godina, pola, prisustva nekih bolesti (41). Novija istraživanja pokazuju da ranije uvođenje jaja, mleka i kikirikija u ishranu dece može sprečiti razvoj alergija na ove namirnice (31, 42).



Slika 5. Nastanak i tok alergijske reakcije na alergene hrane (43).

Kada se pominju alergije, na prvom mestu se misli na imunološke reakcije posredovane IgE antitelima. Pored ovakvog odgovora koji izaziva oralni alergijski sindrom i deluje na gastrointestinalni trakt (GIT), postoji i imunološka reakcija na hranu koja nije posredovana IgE antitelima i kombinovana reakcija gde su udruženi IgE posredovani i IgE neposredovani, odnosno ćelijski odgovor. Reakcija koja nije posredovana IgE antitelima obuhvata enteropatiju, enterokolitis i proktokolitis. Uglavnom se javljaju abdominalni simptomi kao što su grčevi, povraćanje, krvarenje ili dijareja. Ova stanja se najčešće javljaju u ranom detinjstvu, obično ga izazivaju proteini kravljeg mleka (65 - 80%), i nestaju tokom prve godine života (41).

Treći oblik reakcije na hranu obuhvata udruženu IgE-posredovanu i IgE-neposredovanu reakciju. Ovaj kombinovani odgovor dovodi do eozinofilne gastroenteropatije koju karakteriše inflamacija u kojoj dominiraju eozinofili (44).



Slika 6. Bolesti povezane sa alergijama na hranu (35).

Pored alergija na hranu postoje i neželjene reakcije na hranu koje nisu posredovane imunskim odgovorom. Ove reakcije su označene kao netolerancija na hranu koja nastaje zbog metaboličkih poremećaja (intolerancija na laktozu) ili kao reakcija na toksične ili farmakološki aktivne sastojke hrane (35).

Mnoge alergije na hranu, naročito alergija na mleko, jaja, soju i pšenicu mogu biti prevaziđene u prvih 10 godina života (45). Nasuprot tome, alergije na kikiriki, orašaste plodove, ribu, školjke su uglavnom doživotne. Kikiriki i orašasti plodovi su odgovorni za mnoge teške alergijske reakcije i vrlo često se završavaju smrtnim ishodom (46).

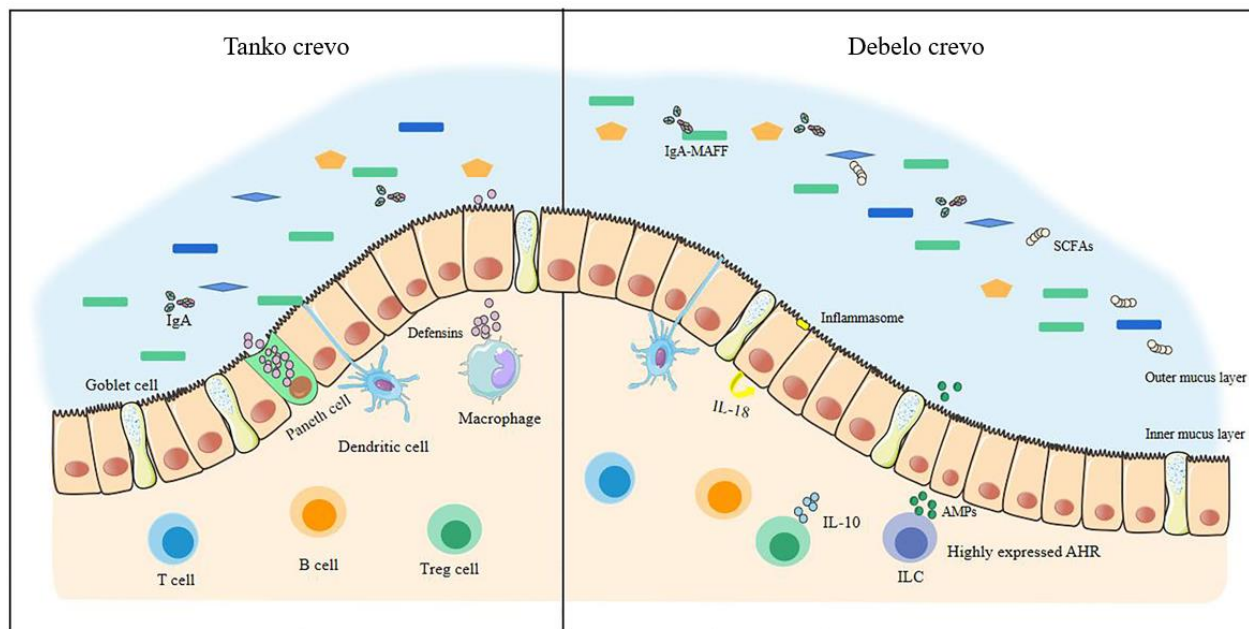
2.1.4 Nastanak nutritivnih alergija posredovanih IgE antitelima

Gastrointestinalni trakt je složeni organ koji učestvuje u digestiji hrane i apsorpciji hranljivih materija, predstavlja barijeru i pruža odbranu od patogena. Mukozni imunski sistem GIT-a se svakodnevno susreće sa velikim brojem antigena i smatra se najvećim imunološkim tkivom u organizmu. Kolonizovan je sa preko 1000 mikrobnih vrsta sa 10^{12} ćelija po gramu intestinalnog sadržaja samo u tankom crevu koje simbiotski utiču na svarljivost i apsorpciju hrane (47), i udruženo se opiru invaziji patogena i održavaju homeostazu (48, 49).

Gastrointestinalna mukoza zajedno sa proteolitičkim enzimima, niskom pH i komponentama urođenog i adaptivnog imunskog sistema predstavlja aktivnu fizičku i imunološku barijeru za odbranu od bakterija, virusa i stranih antigena. Uprkos složenosti i funkcionalnosti ove barijere oko 2% unešenih antigena iz hrane prolazi kroz GIT u imunološki nepromenjenoj formi. Ovi antigeni retko izazivaju alergijsku reakciju, jer velika većina populacije razvija toleranciju (50, 51).

Kod alergija na hranu senzitivizacija se može desiti unutar GIT-a ili može nastati kao posledica prethodne senzitivizacije na inhalatorne alergene (52, 53). Osobe koje imaju genetsku predispoziciju su u većem riziku od razvijanja alergijskih reakcija (54). Studije su pokazale da pozitivna porodična istorija predstavlja značajan faktor rizika za razvoj alergija na hranu (55). Deca čiji su roditelji alergični na kikiriki imaju 7 puta veći rizik od razvijanja alergije na kikiriki (56, 57). Prevalenca za razvoj alergija na hranu je niža u zemljama u razvoju. Migranati iz ovih

zemalja razvijaju alergije na hranu nakon preseljenja u razvijene zemlje (58), što pokazuje da i uslovi sredine i moderan način života doprinose razvoju alergija.



Slika 7. Stabilna intestinalna barijera kod zdravog tankog creva i kolona (48).

2.1.5 Nutritivni alergeni

Uprkos velikom broju nutrijenata koji su prisutni u svakodnevnoj ishrani i njihovoj raznolikosti, glavni uzročnici koji dovode do nastanka alergija su proteini i glikoproteini. Pored njih i razni aditivi, pojačivači ukusa, pesticidi, konzervansi koji se dodaju u hranu mogu izazvati alergijsku reakciju (59, 60).

Krajem osamdesetih godina prošlog veka prvi put su alergeni proučavani na molekularskom nivou. Od tada je identifikovano nekoliko stotina alergena iz različitih izvora i ustanovljene su baze alergena koje ih klasifikuju uglavnom po izvoru iz kojeg potiču¹. Na osnovu homologije u aminokiselinskoj sekvenci ili po sličnosti u strukturi i funkciji izvršena je klasifikacija alergena u proteinske familije (61), a slične familije u superfamilije. Ovakvom klasifikacijom jasno se uočava da se alergeni svrstavaju u nekoliko proteinskih familija (60). Poređenjem homologije sekvenci utvrđeno je da 60% svih nutritivnih alergena biljnog porekla pripada jednoj od četiri proteinske superfamilije (prolamini, kupini, Bet v 1 i profilini) (62). Slično je sa polenima i nutritivnim alergenima životinjskog porekla. Nutritivni alergeni životinjskog porekla su klasifikovani u tri

¹ *International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Subcommittee* (<http://www.allergen.org>), *the Allergome* (<http://www.allergome.org>), *the Food Allergy Research and Resource Program Allergen Database* (<http://www.allergenonline.com>), *InFormAll Database* (<http://foodallergens.ifr.ac.uk/>) <https://doi.org/10.1016/j.allerg.2008.02.001> (61).

superfamilije (tropomiozini, parvalbumini i kazeini) (63) a alergeni polena u 29 od 7868 proteinskih familija (64). Ovi podaci ukazuju na to da određene strukture proteina imaju veći alergeni potencijal. Klasifikacija alergena u proteinske familije može pomoći u predviđanju ukrštene reaktivnosti i može olakšati utvrđivanje alergnosti novootkrivenih alergena.

Tabela 1. Prikaz najvažnijih proteinskih familija namirnica biljnog i životinjskog porekla (65)

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, koštunjavo voće, senf
	Nespecifični LTP	Odbrambena, transport lipida	7 – 9	Sva biljna hrana, lateks
	Bifunkcionalni α -amilazni/proteazni inhibitori	Proteazni inhibitori	15 – 16	Žitarice
Kupinska superfamilija	7/8 S globulini	Rezervni proteini semenki	150 – 190	Leguminoze, semenke, koštunjavo voće
	11S globulini	Rezervni proteini semenki	60	Kikiriki, koštunjavo 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, koštunjavo 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	Prenos hidrofobnih molekula	14	Kravlje mleko, kokošije jaje	
Serin-proteazni inhibitori/Serpini	Proteazni inhibitori	28-44	Kokošije jaje	
Transferini	Transport gvožđa	67 – 69	Kravlje mleko, kokošije jaje	

Stabilnost proteina u digestivnom traktu je jedna od bitnih svojstava koje utiču na alergnost pojedinih namirnica (66). Alergeni iz namirnica su uglavnom visoko zastupljeni proteini, stabilni na termičku obradu hrane i stabilni u digestivnom traktu (67, 68). Protein koji je stabilan u proteolitičkim uslovima i kiseloj sredini u digestivnom traktu ima veće šanse da stigne do intestinalne mukoze gde se odvija resorpcija. Rađeno je istraživanje gde su proteini iz određenih namirnica inkubirani u uslovima simulirane gastrične tečnosti. Nađeno je da su jaki alergeni stabilni i do 60 min u hidrolitičkim uslovima bez pojave fragmenata. Proteini biljnog porekla koji nisu alergeni bili su digestovani već nakon 15 sekundi (69). Obrada hrane utiče na strukturu i stabilnost proteina, a posledično i na njihovu alergnost (70), tako što se menjaju stabilnost i aktivnost alergena hemijskim modifikacijama, izmenom strukture proteina i/ili agregacijom sa komponentama hrane (71) (Besler et al.,2001). Članovi PR-10 Bet v 1 proteinske familije gube alergnost nakon zagrevanja zbog denaturacije i izmene 3D strukture (72). U svetlu uticaja termičke obrade, sastav hrane, a posebno sadržaj lipida i ugljenih hidrata su od velikog značaja. Maillard-ovom reakcijom na temperaturi 140 - 165°C, dolazi do kovalentnog vezivanja šećera za proteine preko slobodnih amino grupa najčešće lizina i arginina i karbonilne grupe redukujućih šećera, što može dovesti do promena alergnosti proteina (73). Nekoliko studija je pokazalo da se pečenjem kikirikija povećava njegov IgE vezujući kapacitet kao posledica Maillard-ove reakcije (74).

Prema otpornosti na temperaturu i digestiju alergeni hrane se mogu podeliti u dve grupe. Prvu grupu čine mali glikoproteini (10 - 70 kDa), prisutni u većim količinama, rastvorljivi u vodi, otporni na digestiju i povišene temperature, što im omogućava da izazovu senzitivaciju domaćina u gastrointestinalnom traktu (75). Primeri ovakvih glikoproteina su kazein iz mleka, ovomukoid iz jaja. Na povećanu otpornost i stabilnost utiče i prisustvo disulfidnih veza (76). Prisustvo ugljenohidratne komponente takođe stabilizuje protein i čini ga otpornim na denaturaciju (77). U drugoj grupi su biljni proteini osetljivi na toplotu i podložni enzimskoj digestiji, pa se brzo razgrađuju i slabiji su alergeni (75).

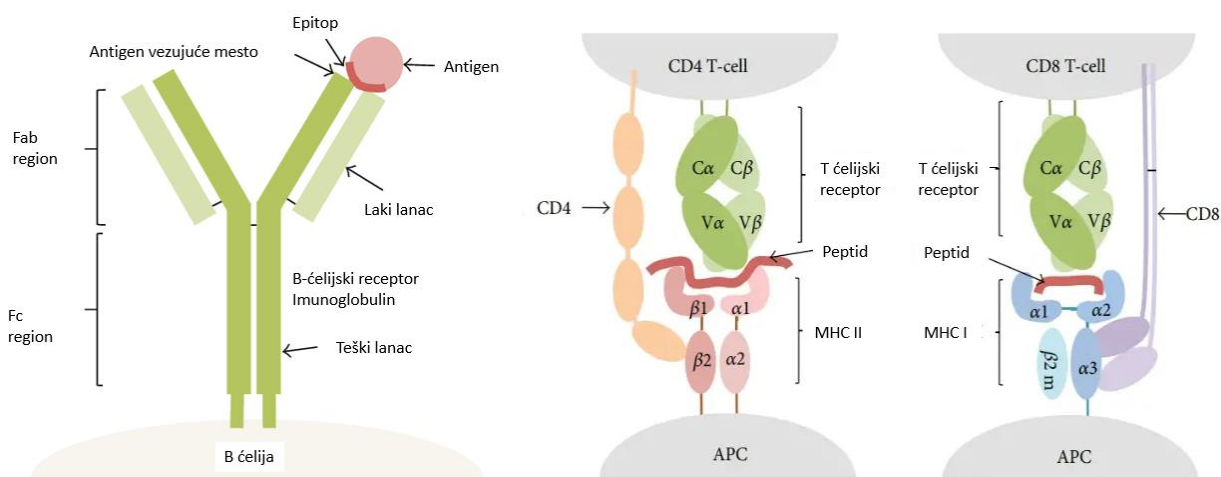
Alergene komponente se mogu klasifikovati prema proteinskim familijama na osnovu strukture i funkcije i prema ovim klasifikacijama može se predvideti ozbiljnost reakcije koju mogu izazvati.

Neke alergene komponente su specifične za vrstu dok su druge označene kao markeri za ukrštenu reaktivnost zahvaljujući sličnim strukturama i sličnim IgE vezujućim epitopima kod različitih vrsta (78). Kod ukrštene reaktivnosti razvija se senzitivacija i alergijska reakcija alergenom iz jednog alergenog izvora, a pri susretu sa homologim alergenom (ukršteno-reaktivnim) iz drugog izvora se takođe razvija alergijska reakcija iako taj alergen nije učestvovao u senzitivaciji. Uočena je ukrštena reaktivnost alergija na hranu sa alergijama na polen. Ova pojava je poznata kao sindrom polen-hrana, posredovana je IgE antitelima, a zasniva se na ukrštenoj reaktivnosti između proteina polena i određenih proteina iz biljaka. Uglavnom su u pitanju profilini, ali i drugi proteini mogu dovesti do ukrštene reakcije (79 - 81). Obično je u pitanju alergijska reakcija na voće ili povrće sa pojavom svraba usana, grla, ušiju, rinokonjuktivitisa ili angioedema.

2.1.6 B ćelijski epitopi i T ćelijski epitopi alergena

Imunski sistem se sastoji od urođene i adaptivne imunosti. Urođena imunost obuhvata nespecifične odbrambene mehanizme koji deluju odmah, odnosno nekoliko časova nakon pojave mikroba u organizmu. Svi višćelijski organizmi poseduju urođeni imunitet. Za razliku od njega, adaptivni imunitet je prisutan samo kod kičmenjaka i veoma je specifičan. Ima sposobnost da pamti patogene protiv kojih se bori, obezbeđujući dugotrajnu memoriju koja omogućava jači odgovor pri svakom sledećem kontaktu. Urođeni i adaptivni imuni odgovor funkcionišu zajedno a nastanak adaptivnog odgovora zavisi od prethodne aktivacije urođenog imunog odgovora (82). Adaptivni imunitet reaguje preko limfocita, B i T ćelija koje su odgovorne za humoralni imunitet i imunitet posredovan ćelijama. B i T ćelije prepoznaju molekulske komponente patogena koje su poznate kao antigeni, preko specifičnih receptora prisutnih na površini B i T ćelija.

B limfociti ekspimiraju membranska IgM i IgD antitela koja funkcionišu kao visokoafinitetni receptori za antigene koji su nekovalentno povezani sa dva proteina, Iga i Igβ sa kojima zajedno čine B-ćelijski receptorski kompleks. Ovi proteini u citoplazmatskom domenu sadrže konzervirane motive (ITAM, imunoreceptorski tirozinski aktivacioni motiv) koji preko niza signalnih molekula učestvuju u prenosu signala i aktivaciji gena čiji produkti utiču na proliferaciju i diferencijaciju B-ćelija. Vezivanjem antigena za membranski imunoglobulin dolazi do endocitoze antigena i prezentacije njegovih peptida u okviru MHC molekula klase II na površini B-ćelija. Ovako prezentovane peptide prepoznaju pomoćničke T-ćelije. B i T ćelije prepoznaju različite epitope istog proteinskog antigena.



Slika 8. Prikaz B i T ćelijskih receptora (22).

T pomoćnički limfociti koji su prepoznali antigen prezentovan na površini B ćelije, aktiviraju ove B-ćelije (stimulišu proliferaciju i sekreciju antitela) vezivanjem ekspimiranog CD40 liganda na površini pomoćničkih T-ćelija za CD40 receptor na površini B limfocita. Istovremeno, citokini koje luče pomoćničke T-ćelije se vezuju za receptore na površini B-ćelija i pojačavaju odgovor (83). Bez T pomoćničkih ćelija proteinski antigeni pokreću slab ili nikakav humoralni odgovor. Da bi došlo do pokretanja odgovora potrebno je da dođe do unakrsnog povezivanja receptora vezivanjem dva ili više antigenih molekula ili ponovljenih epitopa na

jednom antigenom molekulu za međusobno bliske membranske imunoglobulinske receptore. B-ćelijski epitopi su delovi antigena za koje se vezuju imunoglobulini, i uglavnom su iskazani na površini proteina, a mogu biti linearni ili konformacioni.

T-ćelijski epitopi su peptidi dužine 8 - 17 aminokiselina. T ćelije ih prepoznaju preko receptora koji se nalaze na površini antigen-prikazujućih ćelija kada su prikazani u okviru MHC molekula. Postoje dve klase MHC molekula: MHC I, koja se nalazi na površini svih ćelija sa nukleusom, i MHC II koji se nalazi na površini specijalizovanih antigen-prikazujućih ćelija (APC) (83). Aktivacija T ćelija nastaje prepoznavanjem između T-ćelijskih receptora (TcR) i odgovarajućih antigenih epitopa prezentovanih u okviru MHC kompleksa. T-ćelijski receptori (TcR) CD8+ T ćelija prepoznaju epitope prikazane u okviru MHC I molekula, a nakon aktivacije CD8+ T ćelije postaju citotoksični T limfociti. CD4 T+ ćelije preko TcR prepoznaju epitope u okviru MHC II molekula, a nakon aktivacije postaju T helper (Th) ili T regulatorne ćelije (Treg). Th ćelije amplifikuju imuni odgovor. Postoje tri glavne podklase Th ćelija: Th1 (učestvuju u ćelijski posredovanom imunitetu protiv intracelularnih patogena), Th2 (imaju ulogu u imunitetu koji je posredovan antitelima) i Th17 (učestvuje u inflamatornom odgovoru i odbrani protiv ekstracelularnih patogena) (22).

Predviđanje T ćelijskih epitopa ima za cilj da identifikuje najkraće antigene peptide koji su imunogeni, tj. sposobni da aktiviraju CD4+ ili CD8+ T-ćelije (22). Razvijeni su brojni kompjuterski programi koji omogućavaju uspešno predviđanje i detekciju epitopa. Identifikacija epitopa ima brojne praktične primene uključujući razumevanje etiologije bolesti, praćenje imunskog odgovora, razvoj dijagnostičkih esejaja, dizajniranje vakcina koje je zasnovano na T-ćelijskim epitopima i antikancer imunoterapija (22, 84, 85).

2.1.7 Ukrštena reaktivnost alergernih proteina

Ukrštena reaktivnost između alergena iz različitih alergernih izvora je posledica sličnosti trodimenzionalne strukture epitopa, koju prepoznaje paratop na specifičnim IgE antitelima. Smatra se da kada homologija proteinske sekvence dostigne 70%, raste mogućnost ukrštenih reakcija (86, 87).

Ukrštena reaktivnost je karakteristika alergena hrane koji pripadaju istoj proteinskoj porodici koja je prisutna u alergenima trave, korova ili polenu drveća. Primećeno je da proteini sa sličnom 3D strukturom, označeni kao panalergeni, mogu izazvati ukrštenu reaktivnost između nesrodnih vrsta biljaka ili životinja. Najznačajniji panalergeni su profilini, transportni proteini lipida (eng. Lipid transfer protein, LTP), proteini povezani sa patogenezom (PR)-10 porodica, tropomiozini, 2S albumini, 7S globulini, parvalbumin, polkalcin i serumski albumini (88).

Veza između alergija na hranu (banana, avokado, kivi, krompir) i lateksa se naziva sindrom voće-lateks, a molekulske osnove ove ukrštene reaktivnosti su u vezi sa strukturno sličnim epitopima na različitim proteinima koji su filogenetski blisko povezani. Primeri su klasa I hitinaze prisutna u lateksu (Hev b 11), banani (Mus a 2), kiviju (Act d hitinaza); beta-1,3-glukanaza prisutna u lateksu (Hev b 2) i banani (Mus a 5); profilin prisutan u banani (Mus a 1), kiviju (Act d 9), lateksu (Hev b8); i nsLTP identifikovan u banani (Mus a3), kiviju (Act d 10) i lateksu (Hev b 12) (89 - 94).

Alergoloziji se u praksi veoma često sreću sa posledicama ukrštene reaktivnosti alergena hrane kod većine pacijenta sa utvrđenom alergijom na hranu. Brojna su pitanja i nedoumice o vrsti namirnica koje bi trebalo izbegavati zavisno od one na koju je pacijent primarno alergičan. Molekularna dijagnostika (CRD) je doprinela unapređenju dijagnostikovanja i razumevanja molekularnih osnova ukrštene reaktivnosti (95).

2.2 Banana (*Musa acuminata*)

Pre 7000 godina banane su se razlikovale od banana koje su danas dostupne. Imale su crne semenke unutar ploda i bile skoro nejedne. Jeli su se uglavnom cvetovi banane i gomolji koji rastu ispod zemlje. Banana se koristila i u druge svrhe, korišćeno je lišće za pravljenje zaklona, i vlakna za proizvodnju odeće i užadi (96). U odnosu na prvobitne banane, današnje su izgubile seme, mesnatije su i slađe. Ne zna se tačno kada i kako su se desile ove promene. Najveći deo banana koje su danas u upotrebi su dobijene ukrštanjem podvrsta *M. acuminata* i *M. balbisana* (97). Gajeni hibridi su uglavnom triploidni, ređe diploidni i tetraploidni (98). Danas postoji više od 1000 vrsta banana. Proizvode se u zemljama tropskog i subtropskog pojasa (99), i predstavljaju peti najpopularniji usev u svetu u smislu trgovine, iza kafe, žitarica, šećera i kakaoa (100). Veći deo proizvedenih banana (85%) se koristi lokalno, a ostatak (15%) se izvozi (99). Sa proizvodnjom većom od 100 miliona tona godišnje, banana je jedan od najbitnijih useva, i glavni izvozni proizvod zemalja širom Azije, Afrike i tropske oblasti Amerike sa velikim značajem za ekonomiju ovih zemalja. Po podacima iz 2021. godine, izvoz banana je na globalnom nivou povećan za 7% (101) u odnosu na 2019. godinu.

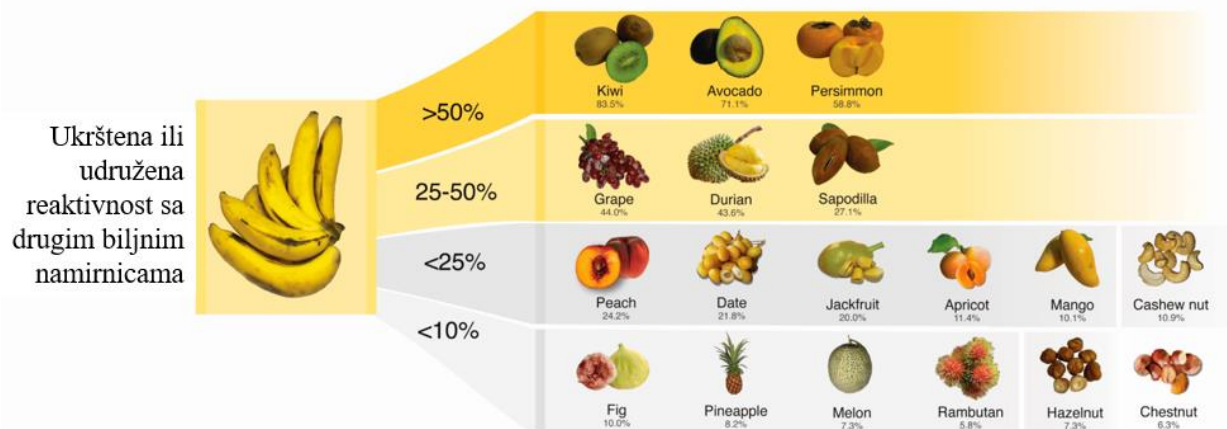
Pored dezertnih banana koje se konzumiraju sirove, u upotrebi su i plantani, banane koje se moraju termički obraditi pre upotrebe. Dezertne banane, posebno vrsta *Cavendish* su u širokoj upotrebi, prijatnog su ukusa i obiluju korisnim sastojcima. Banana je niskokalorijsko voće koje u 100 grama sadrži 89 kalorija. U sastavu ima 75% vode, 23% ugljenih hidrata i 1% proteina. Pulpa banane sadrži brojna bioaktivna jedinjenja, vlakna, prirodne šećere, minerale, vitamine, antioksidante koji su važni za pravilno funkcionisanje imunskog sistema i imaju antiproliferativnu i protektivnu ulogu kod kancera i povoljno utiču na kardiovaskularna oboljenja (102 - 104).

Zrenje voća je kompleksan proces tokom kojeg se dešavaju promene u boji, mirisu, sastavu i količini određenih nutrijenata (105). Etilen je glavni biljni hormon koji utiče na ove promene. Pored etilena bitni faktori zrenja su i temperatura, svetlo, vlažnost vazduha (106). Etilen indirektno utiče na ukus tako što stimuliše stvaranje amilaze, enzima koji razgrađuje skrob do oligosaharida. Zelene banane sadrže veći udeo skroba (12 - 35%, zavisno od vrste), dok kod zrelih banana on može biti i manji od 1% (107). Banana ima i antioksidativni kapacitet koji zavisi od vrste banane i stadijuma zrelosti. Pokazano je da se tokom zrenja antioksidativni kapacitet povećava i može se uporediti sa dejstvom vitamina E i melatonina (108).

2.2.1 Alergeni iz banane

Uprkos brojnim korisnim jedinjenjima i značaju za zdravlje, voće je prepoznato i kao bitan izazivač alergija kod 0,6% celokupne populacije (104, 109). Zbog visoke nutritivne vrednosti, lake svarljivosti i prijatnog ukusa banana se rano uvodi u ishranu dece (110). Alergija na bananu je zabeležena 1990. god. (81). Registrovani su slučajevi alergijskih reakcija kod dece mlađe od godinu dana. Uglavnom su zabeleženi blaži oblici reakcije, gde je došlo do razvoja crvenila i koprivnjače (110 - 113), a zabeležena je i pojava anafilaksije (80, 110, 111, 114). U studiji sprovedenoj na 250 pacijenata prosečne starosti 10,2 godine, koji su imali anafilaksiju izazvanu voćem, kod 10,8% ispitanika reakcija je bila izazvana konzumacijom banane (79, 110, 115).

Kod pacijenata sa respiratornom alergijom, zbog postojanja ukrštene reaktivnosti između aeroalergena i nutritivnih alergena može se razviti i alergija na hranu (116). Primarna senzitivizacija na polen je često okidač za razvoj alergija na voće i povrće (116). Anderson i saradnici (117) su još 1970. opisali povezanost alergije na ambroziju i alergije na pojedine namirnice (dinje i banane). Osobe alergične na bananu često pokazuju alergijsku reakciju i na neke druge namirnice kao što su kivi, avokado, kesten, orasi, dinja, pomorandža, paradajz i krastavac (118). Opisana je i ukrštena reakcija lateks – banana (118 - 120). Opisan je slučaj anafilaktičke reakcije izazvane ukrštenom reaktivnoću koja je pripisana prisustvu proteina od 30 kDa iz voća na koje je pacijent imao razvijena specifična IgE antitela (81). Za pojavu ukrštene reaktivnosti između različitih namirnica koje pripadaju istoj ili evolutivno udaljenoj familiji odgovorni su proteini koji su strukturno konzervirani i imaju visok stepen homologije (80). Ova očuvanost strukture i visok stepen homologije se odnosi na sekvencijske epitope (121).



Slika 9. Ukrštena reaktivnost banane i drugih namirnica biljnog porekla (118).

Pored senzitivizacije nastale konzumacijom namirnica postoji još nekoliko puteva kojim se senzitivizacija može dogoditi. Opisan je slučaj petomesečne bebe koja je doživela generalizovanu urtikariju 20 minuta nakon unosa kaše od banane, jabuke i pomorandže. Testiranjem alergije na bananu u kožnim probama zabeleženi su pozitivni rezultati. Majka je konzumirala banane u većim količinama tokom trudnoće i laktacije i pretpostavlja se da je do senzitivizacije bebe došlo preko placente i majčinog mleka (112), što je u suprotnosti sa tezom da je manje alergija ako se namirnica ranije uvede u ishranu (31, 42).

Molekulske osnove alergija izazvanih konzumiranjem banane mogu se pripisati prisustvu šest IgE reaktivnih proteina koji su do sada identifikovani i opisani ([104](#), [119](#), [122](#), [123](#)), i prikazani su u tabeli 2.2.

Tabela 2. Identifikovani alergeni iz banane ([123](#))

Alergen	Molekulska masa (kDa)	Biohemijski naziv	Pristupni broj proteina u UniProt bazi podataka
Mus a 1	15	Profilin	Q94JN3
Mus a 2	33	Hitinaza klase I	Q8VXF1
Mus a 3	9	LTP	P86333
Mus a 4	20	TLP	022322
Mus a 5	33	β 1,3 glukanaza	022317
Mus a 6	27	Askorbat peroksidaza	

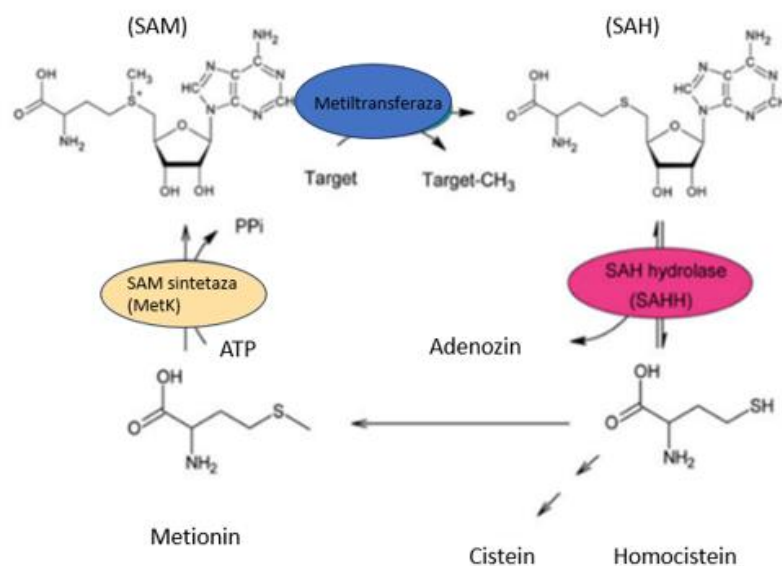
Pored pomenutih šest alergena, utvrđeno je da je katalaza iz banane takođe IgE reaktivan protein ([119](#)). Povećana učestalost anafilaksije u pedijatrijskoj populaciji privukla je pažnju zbog pretpostavke da postoji široki spektar još uvek neidentifikovanih IgE reaktivnih proteina banane ([110](#), [114](#), [115](#), [122](#)).

2.2.2 S-adenozil-*L*-homocistein-hidrolaza iz banane

S-adenozil-*L*-homocistein-hidrolaza (SAHH, EC 3.3.1.1) je enzim koji katalizuje reverzibilnu hidrolizu S-adenozil-*L*-homocisteina (SAH) do adenzina (ADO) i *L*-homocisteina (HCY). Dalje se HCY konvertuje do S-adenozil-metionina (SAM) koji je bitan donor metil grupa u procesima kovalentne modifikacije različitih biomolekula kao što su proteini, nukleinske kiseline, fosfolipidi ([124](#)). Inhibicijom SAHH, SAH se akumulira u citoplazmi i blokira dalju metilaciju malih molekula i biomakromolekula putem „feedback“ inhibicije SAM-zavisne metiltransferaze, što ukazuje na to da je aktivnost SAHH važna za održavanje ukupnog metilacionog kapaciteta ćelije. Kod viših biljaka SAHH ima ključnu ulogu u odgovoru biljke na biotski i abiotski stres. Učešćem u metilacionim reakcijama u ćelijama, SAHH utiče na ključne metaboličke procese: replikacija i popravka DNK, metabolizam metionina, sinteza poliamina i biosinteza fosfolipida ([125](#)). Iz ovoga proizilazi da je SAHH jedan od najkonzervativnijih enzima u svim živim organizmima ([126](#), [127](#)).

SAHH poreklom iz biljnih izvora je bila van fokusa istraživača sve dok nije identifikovana kao alergen u nekoliko biljnih vrsta (<https://www.allergen.org/viewallergen.php?aid=1114>, ([130](#),[131](#)). Prirodni SAHH prečišćen iz *Platanus acerifolia*, registrovan kao respiratorni alergen Pla a 5 pokazao je IgE reaktivnost u imunoblotu kod 57% testiranih pacijenata iz Kine

(<https://www.allergen.org/viewallergen.php?aid=1114>). U grupi od 26 pacijenata iz Austrije koji su pokazali pozitivan SPT i ImmunoCAP na *Plantago lanceolata*, 23.1% je pokazalo IgE reaktivnost na SAHH iz ove biljke (130).



Slika 10. Metabolički put koji katalizuje SAHH (128).

Koncept panalergena obuhvata familije srodnih proteina koje su uključene u vitalne procese u ćeliji i široko su rasprostranjene u prirodi. Biljni panalergeni dele visoko konzervirane delove sekvence, strukture i funkciju. Odgovorni su za mnoge ukrštene reakcije posredovane IgE antitelima između nesrodnih polena i nutritivnih alergena iz biljnih izvora (87). Iako su u pitanju minorni alergeni, senzitivizacija na panalergen može biti problematična, jer nosi rizik od multiple senzitivizacije na različite izvore alergena. Panalergeni su klasifikovani u nekoliko proteinskih familija. Najučestalije familije panalergena biljnog porekla su profilini, polkalcini, nespecifični lipid-transfer proteini, proteini povezani sa patogenezom i familija proteina životinjskog porekla – tropomiozini (131). Dalja istraživanja panalergena, njihova identifikacija i karakterizacija vodi unapređenju dijagnostičkih testova i efikasnosti imunoterapije (132).

2.3 Dijagnostika nutritivnih alergija i potencijali unapređenja dijagnostičkih reagenasa za alergije

Ekstrakti namirnica koji se koriste u dijagnostici alergija su kompleksne smeše biomakromolekula, od kojih su samo neki alergeni, što čini komplikovanom standardizaciju ovakvih ekstrakata namenjenih za *in vitro* dijagnostiku. Ekstrakti biljnih alergena su podložni varijacijama pošto je ekspresija proteina regulisana raznim biotičkim i abiotičkim faktorima, stepenom zrelosti, načinom transporta i uslovima skladištenja. Studija je pokazala da alergeni potencijal kivija jako zavisi od stepena zrelosti i vremena branja (133). Promene u pulpi banane

tokom transporta, čuvanja i zrenja kao i niska zastupljenost SAHH u biljnim tkivima otežavaju strukturalna i funkcionalna istraživanja (122,126,130). Kroz dva prikaza slučaja pokazana je značajna razlika između dijagnostičkog testiranja sa komercijalnim ekstraktom banane i individualnim alergenima banane: 7-mesečni dečak je imao negativan kožni test (skin prick test SPT) sa komercijalnim ekstraktom banane, nakon što je doživeo anafilaksiju nakon konzumiranja iste, i osoba koja je nakon anafilaksije imala negativan IgE na komercijalno dostupan ekstrakt banane rađen na automatizovanom ELISA aparatu, je pokazala IgE reaktivnost u imunoblotu sa individualnim alergenima banane (114, 134). Ovi rezultati ukazuju na to da su neki relevantni alergeni nedovoljno zastupljeni u komercijalno dostupnim ekstraktima alergena, i naglašavaju važnost dijagnostike sa pojedinačnim alergenima (CRD - *Component Resolved Diagnostics*) u molekularnoj alergologiji (6). Pored toga, neki fiziološki uslovi u biljkama dodatno utiču na ekspresiju proteina, na primer ekspresija SAHH u duvanu zavisi od citokinina (135), a ekspresija i aktivnost SAHH u paradajzu je povezana sa biotskim stresom usled suše (136), što utiče na funkcionalnost enzima i otežava prečišćavanje. Brojni problemi povezani sa proizvodnjom, reproduktivnošću i standardizacijom prirodnih alergena za primenu u dijagnozi i terapiji alergija mogu se prevazići korišćenjem rekombinantnih alergena (119).

2.3.1 Alergeni proizvedeni rekombinantnom DNK tehnologijom

Korišćenje tehnologije rekombinantne DNK je otvorilo novo polje u istraživanju i primeni rekombinantno dobijenih proteina u dijagnostici i lečenju alergija. Jedna od prednosti rekombinantnih proteina je mogućnost kompletne fizičko-hemijske, strukturalne i imunološke karakterizacije. Alergeni proizvedeni na ovaj način mogu biti ekvivalentni prirodnim ili se mogu modifikovati tako da imaju smanjenu IgE reaktivnost, zavisno da li se proizvode u dijagnostičke ili terapijske svrhe. Do sada je nekoliko stotina alergena proizvedeno rekombinantnom tehnologijom što je omogućilo detaljniju dijagnostiku alergija a rekombinantne hipoalergene varijante alergena se razvijaju za sublingvalnu i subkutanu terapiju alergija (137). Izolovanje alergena iz prirodnih proizvoda zahteva mnogo više vremena, retko se dobija potpuno prečišćen alergen i u manjem prinosu u odnosu na rekombinantni koji se može proizvoditi u neograničenim količinama i sa znatno većim stepenom čistoće. Postoji velika baza podataka rekombinantnih alergena koji se koriste za dijagnostiku razdvojenu na komponente (*Component Resolved Diagnostics* – CRD) (138).

Prva cDNK koja kodira alergen je izolovana i sekvencirana pre 25 godina (139), a nakon toga se razgranala primena rekombinantnih alergena za *in vitro* IgE dijagnostiku alergija (140), za proučavanje T-ćelijskih epitopa (141), proizvode se rekombinantni hipoalergeni polena lešnika Cor a I sa smanjenom alergenošću (142), napravljena je trodimenziona struktura rekombinantnog Bet v 1 (143). Rekombinantni alergeni su našli primenu u *in vivo* kožnim testiranjima (144) i *in vitro* proučavanjima (145), i alergen-specifičnoj imunoterapiji (ASIT) (146).

Rekombinantna DNK tehnologija ima veliki potencijal u različitim aspektima istraživanja, kao i u kliničkoj primeni. Mnogobrojni wild-type ili imunološki modifikovani alergeni ili delovi alergena su proizvedeni u različitim ekspresionim sistemima za upotrebu u istraživačke svrhe kao što je molekularna karakterizacija alergena (trodimenziona struktura ili mapiranje epitopa), standardizacija alergena, ili za kliničku primenu u izradi vakcina, Component-resolved

dijagnostici, alergen-specifičnoj imunoterapiji (ASIT). Proizvodnja rekombinantnih alergena je razvijena u nekoliko pravaca: produkcija wild type alergena koji zadržavaju sve osobine odgovarajućeg prirodnog alergena, sinteza peptida koji sadrže T-ćelijske epitope alergena bez IgE reaktivnosti, sinteza hipoalergena koji imaju znatno snižen IgE vezujući kapacitet i alergenost, a u isto vreme zadržavaju alergen-specifične T-ćelijske epitope ili B-ćelijske epitope (147).

Izbor ekspresionog sistema je od velike važnosti, a zavisi od karakteristika samog proteina i namene za koju se proizvodi. Prvi izbor za produkciju prokariotskih i veliki broj eukariotskih proteina koji imaju mali broj disulfidnih veza i ne zahtevaju posttranslacione modifikacije je *E. coli* (148). Kvasci (*P. pastoris*, *S. cerevisiae*), ćelije insekata ili sisarske ćelije se mogu koristiti za proizvodnju složenijih rekombinantnih proteina, jer obezbeđuju pravilno uvijanje proteina i posttranslacione modifikacije (149).

2.3.2 Dijagnostika razdvojena na komponente (*Component resolved diagnostic* - CRD)

„Component Resolved Diagnostics“ odnosno dijagnostika razdvojena na komponente je novi pristup dijagnostike alergija koji se zasniva na korišćenju prečišćenih prirodnih ili rekombinantnih proteina (150) za detekciju specifičnog IgE na individualne alergene kako bi se napravila razlika između stvarne i ukrštene reakcije (6). Značaj CRD je u porastu u kliničkim ispitivanjima IgE posredovanih alergija kao i kod personalizovane alergen-specifične imunoterapije (ASIT) (151 - 153). Kod ukrštenih reakcija, CRD ima važnu ulogu u razlikovanju značajnih i irelevantnih sIgE rezultata i doprinosi razjašnjavanju puteva senzitivacije. CRD može smanjiti upotrebu provokacionih testiranja i može poboljšati specifičnost alergen-specifične imunoterapije (138). Takođe, omogućava predviđanje razvoja alergija i rizika od nastanka ozbiljnih simptoma (154).

3. CILJ RADA

Zbog porasta alergija na bananu i detektovanih slučajeva ukrštene alergijske reakcije banane i polena, banane i lateksa i banane i drugih namirnica, cilj rada je bio da se izoluje i detaljnije biohemijski okarakteriše *S*-adenozil-*L*-homocistein hidrolaza kao mogući novi alergen banane, i da se ispita njegov eventualni doprinos ukrštenoj reaktivnosti između alergena iz polena biljaka, voća i lateksa.

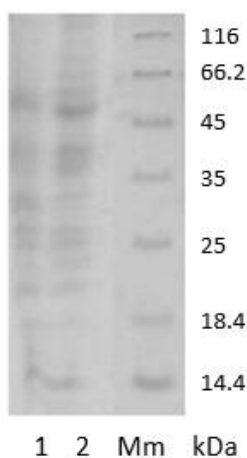
Ciljevi rada su:

1. izolovanje i prečišćavanje prirodne *S*-adenozil-*L*-homocistein hidrolaze (nSAHH) iz banane
2. optimizacija uslova za proizvodnju rekombinantne *S*-adenozil-*L*-homocistein hidrolaze (rSAHH) u ćelijama *E. Coli*
3. izolovanje i prečišćavanje rSAHH
4. karakterizacija rSAHH
5. ispitivanje alergenosti prirodne i rekombinantne *S*-adenozil-*L*-homocistein hidrolaze sa serumima pacijenata alergičnih na bananu i
6. potvrda hipoteze da je *S*-adenozil-*L*-homocistein hidrolaza panalergen, analizom B i T ćelijskih epitopa i poređenjem sa *S*-adenozil-*L*-homocistein hidrolazom iz ljulja, kivija i lateksa

4. REZULTATI

4.1 Priprema proteinskog ekstrakta banane

Zrele banane (*Musa acuminata*) korišćene za rad kupljene su u lokalnoj prodavnici. Blenderom je homogenizovana pulpa (300g) u 600 mL pufera (50mM NH_4HCO_3 , 1% polivinilpolipirrolidon (PVPP), 0,01% CaCl_2 , 5mM askorbinska kiselina, pH 8,5) i ekstrahovana mešanjem na magnetnoj mešalici tokom 3 h na 4°C. Nakon centrifugiranja, izdvojeno je 610 mL sirovog proteinskog ekstrakta. Korišćenjem Bradford-ovog reagensa, određena je ukupna koncentracija proteina u ekstraktu banane (1,06 mg/mL). Kako bi se koncentrovao ekstrakt, rađena je precipitacija pomoću amonijum-sulfata (zasićenje 20-70%). Precipitat dobijen nakon centrifugiranja je rastvoren u 20 mM NH_4HCO_3 puferu, pH 8,5. Centrifugiran supernatant je rasoljen na koloni HiTrap Desalting G25 na HPLC (Akta purifier).



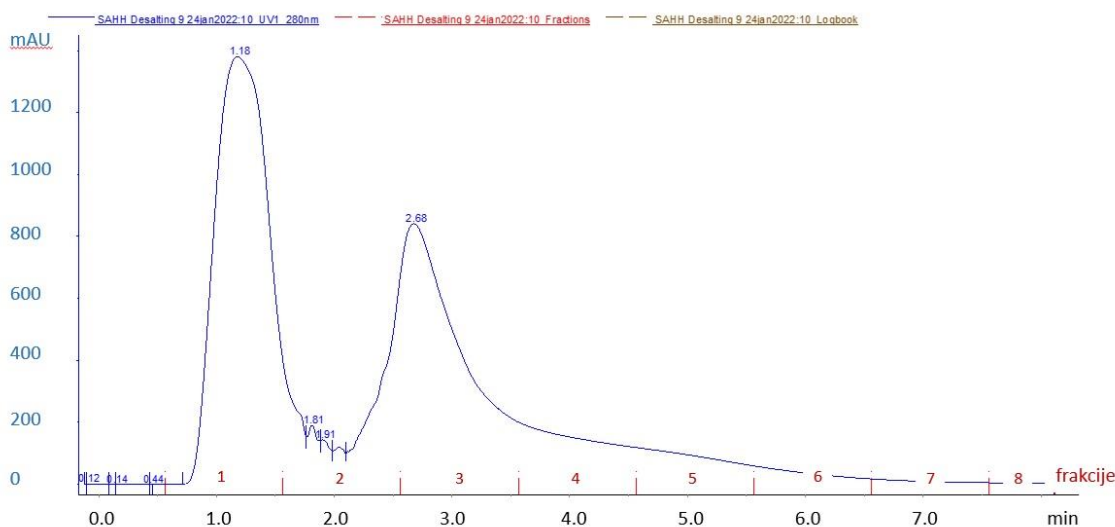
Slika 11. Elektroforeza banana ekstrakta nakon precipitacije amonijum-sulfatom (1- ekstrakt banane pre precipitacije, 2- Rastvoreni talog nakon precipitacije, Mm- Molekulski markeri).

4.2 Izolovanje i prečišćavanje nSAHH iz banane

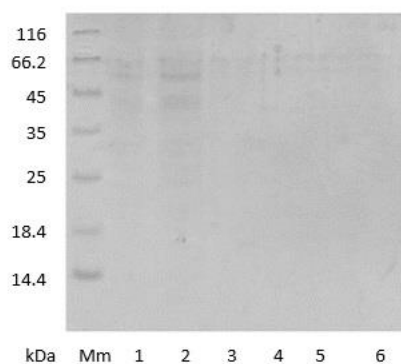
Naš cilj je bio da razvijemo jednostavan postupak za dobijanje nSAHH proteina iz banane zadovoljavajuće čistoće i da se biohemijski okarakteriše i ispita IgE reaktivnost imunohemijskim metodama.

Nakon rasoljavanja frakcije su analizirane SDS elektroforezom. U frakcijama 1 i 2 je prisutna traka koja odgovara nSAHH pa su ove dve frakcije prvo koncentrovane liofilizacijom a zatim je nastavljeno prečišćavanje prvo katjonskom pa anjonskom jonoizmenjivačkom hromatografijom.

Liofilizovane frakcije su rastvorene u 0,1 M CH₃COONa pH 5,0 puferu. Nakon nanošenja uzorka na kolonu nSAHH je eluiran pomoću 0,1 M CH₃COONa sa 1 M NaCl, pH 5,0. Katjonskom jonoizmenjivačkom hromatografijom proteini sa ukupnim negativnim površinskim naelektrisanjem su eluirani u frakciji sa nevezanim proteinima, dok je nSAHH eluiran gradijentom pufera B.

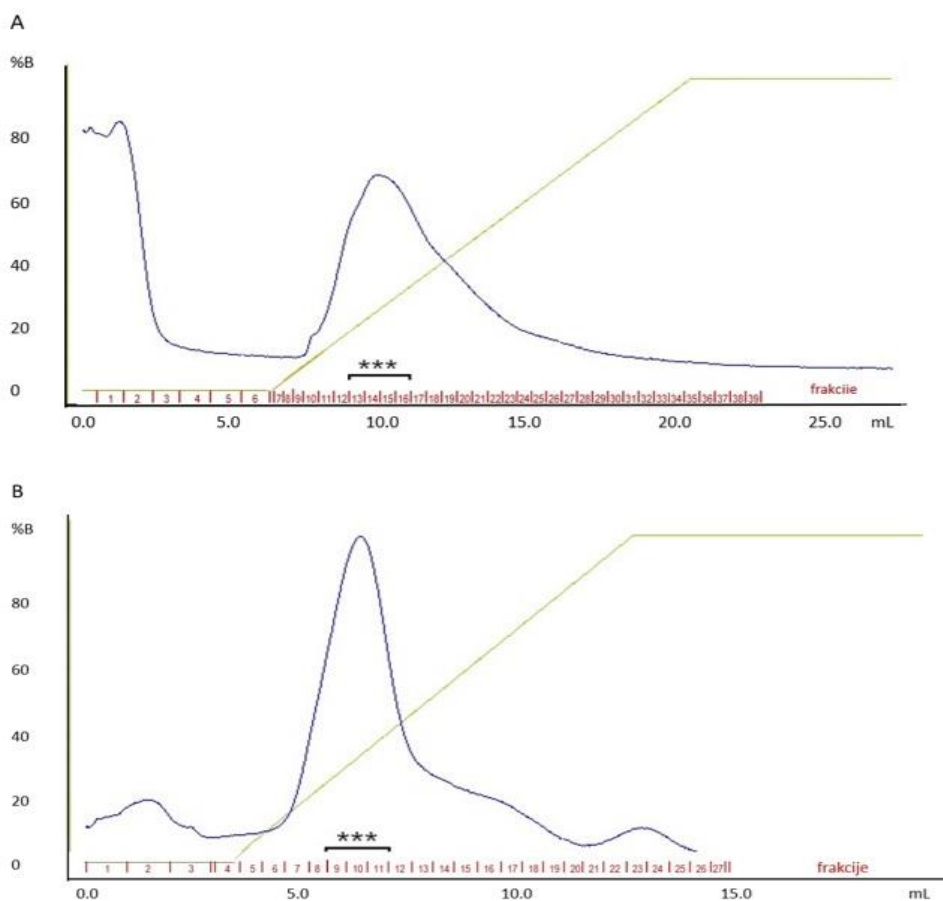


Slika 12. Rasoljavanje proteina banana dobijenih frakcionisanjem amonijum-sulfatom (20 - 70 %) na HiTrap Desalting koloni.

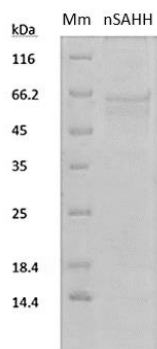


Slika 13. SDS elektroforeza proteinskih frakcija nakon rasoljavanja (Mm - molekularni markeri, 1-6 frakcije nakon rasoljavanja).

Sakupljene frakcije su analizirane SDS PAGE na 12% gelu i merena je aktivnost nSAHH. Frakcije koje su pokazale aktivnost su spojene i dijalizovane preko noći naspram 20 mM TRIS pufera pH 7,5 nakon čega je urađena anjonska jonoizmenjivačka hromatografija na HiTrap QFF koloni. Frakcije u kojima je detektovana enzimaska aktivnost su spojene, određena je koncentracija proteina Bradford-ovom metodom i izmerena je aktivnost nSAHH. Dobijeno je oko 7 µg SAHH po g banane. Molekulska težina nSAHH u denaturišućim uslovima je određena SDS PAGE elektroforezom. Rezultati su prikazani na slici 15.



Slika 14. Izolovanje nSAHH iz proteinskog ekstrakta banane: A - katjonska jonoizmenjivačka hromatografija na HiTrap SP FF; B - anjonska jonoizmenjivačka hromatografija na HiTrap QFF koloni. Frakcije koje pokazuju SAHH aktivnost označene su zvezdicom.



Slika 15. SDS PAGE nSAHH nakon anjonske hromatografije.

SDS-PAGE nakon prečišćavanja nSAHH je pokazala prisustvo dodatnih traka na 55 kDa i 60 kDa pored trake na 53 kDa koja potiče od nSAHH (slika 15).

4.3 Masena spektroskopija prirodne SAHH

Masenom spektrometrijom prirodnog uzorka je potvrđeno da traka od 60 kDa odgovara D-glukozidazi (UniProtKBA0A804KJZ1), dok traka od 55 kDa potiče od UTP-glukozo-1-fosfat uridiltransferaze (UniProtKB A0A804KN77) i serin proteaze EDA2 (UniProtKB A0A804IW09).

Tabela 3. Lista nSAHH peptida detektovanih pomoću „otiska prsta“ (mass fingerprint)

Peptide	Missed cleavage	Position	m/z (Da)	Mr (expt)	Mr (calc)	Score
K.VKDLSQADFGR.L	1	16-26	618.32	1234.63	1234.63	70
K.DLSQADFGR.L	0	18-26	504.74	1007.47	1007.47	54
R.AEFGPAKPFAGAR.I	0	44-56	440.24	1317.69	1317.68	59
R.AEFGPAKPFAGAR.I	0	44-56	659.85	1317.69	1317.68	45
R.DSAAVFAWK.G	0	102-110	497.75	993.49	993.49	51
K.GETLAEYWWCTER.C	0	111-123	850.87	1699.73	1699.73	52
K.GETLAEYWWCTER.C	0	111-123	850.87	1699.73	1699.73	69
K.GETLAEYWWCTER.C + Carbamidomethyl (N-term)	0	111-123	879.39	1756.76	1756.75	54
K.TGKLDPASTDNAEFQIVLGIIR.D	1	160-182	819.11	2454.32	2454.31	58
K.LPDPASTDNAEFQIVLGIIR.D	0	163-182	1085.08	2168.15	2168.15	34
R.LVGVSEETTTGVK.R	0	199-211	660.36	1318.70	1318.70	115
R.LVGVSEETTTGVK.R.L	1	199-212	492.61	1474.80	1474.80	67
R.LVGVSEETTTGVK.R.L	1	199-212	738.41	1474.80	1474.80	92
R.LYQMQASGALLFPAINVNDSVTK.S + Oxidation (M)	0	213-235	832.77	2495.28	2495.27	42
R.LYQMQASGALLFPAINVNDSVTK.S + Oxidation (M)	0	213-235	832.77	2495.28	2495.27	63
R.LYQMQASGALLFPAINVNDSVTK.S + Oxidation (M)	0	213-235	1248.65	2495.28	2495.27	68
R.ATDVMIAGK.V + Oxidation (M)	0	255-263	461.24	920.47	920.46	60
K.RITIKPQTDR.W	1	368-377	409.91	1226.71	1226.71	66
K.TGIIVLAEGR.L	0	385-394	514.81	1027.60	1027.60	68
K.TGIIVLAEGR.L + Carbamidomethyl (N-term)	0	385-394	543.32	1084.63	1084.62	60
K.VYVLPK.H	0	436-441	359.73	717.44	717.44	35
K.VAALHLGK.L	0	447-454	404.76	807.50	807.50	35
K.LTPSQADYISVPIEGPYKPAHYR.Y	0	462-484	868.12	2601.33	2601.32	57
K.LTPSQADYISVPIEGPYKPAHYR.Y	0	462-484	651.34	2601.33	2601.32	53
K.LTPSQADYISVPIEGPYKPAHYR.Y + Carbamidomethyl (N-term)	0	462-484	887.12	2658.35	2658.34	54

Da: dalton; Mr: molekulska masa, expt: eksperimentalno dobijena masa peptida; calc: masa izračunata iz peptidnih sekvenci

S obzirom da ova dva proteina imaju slične molekulske mase (55,72 kDa i 51,34 kDa, redom) i pI vrednosti (6,50 i 5,57, redom) kao i nSAHH (53,06 kDa i pI 5,95), nije bilo moguće

potpuno prečistiti i izdvojiti nSAHH od ovih proteina koristeći opisani protokol. Dodatna otežavajuća okolnost koja je onemogućila dalje prečišćavanje je nizak prinos nSAHH (7µg po g pulpe banane). Ovi rezultati su u saglasnosti sa inducibilnom ekspresijom SAHH kao odgovor na biotičke uslove (zrenje) i stres vezan za okruženje (skladištenje, transport) ([126,130](#)).

```

MALLVEKTST GREYKVKDLS QADFGRLEIE LAEVEMPGLM ACRAAEFGPAK
PFAGARISGS LHMTIQTAVL IETLTALGAE VRWCSCNIFS TQDHAAAAIA
RDSAAAVFAWK GETLAEYWWC TERCLDWGPN GGPDLIVDDG GDATLLIHEG
VKAEEEEYEK GKLPDPASTD NAEFQIVLGI IRDGLKVDPK KYRKMKERLV
GVSEETTTGV KRLYQMQASG ALLFPAINVN DSVTKSKFDN LYGCRHSLPD
GLMRATDVMI AGKVAVVCGY GDVVGKCAAA LKQAGARVIV TEIDPICALQ
ALMEGLPVLT LEDVVSEADI FVTTTGNKDI IMVDHMKMKM NNAIVCNIGH
FDNEIDMHGL ETYPGVKRIT IKPQTDRWVF PETKTGIIVL AEGRLMNLGC
ATGHPSFVMS CSFTNQVIAQ LELWKEKTTG KYEKKVYVLP KHLDEKVAAL
HLGKLGAKLT KLTPSQADYI SVPIEGPYKP AHYRY

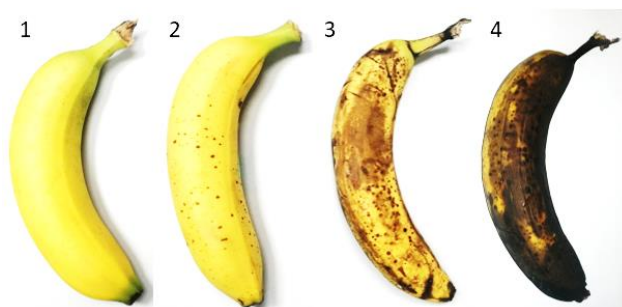
```

Slika 16. Pokrivenost sekvence nSAHH u MS (potvrđena aminokiselinska sekvenca SAHH je prikazana crvenim slovima)

4.4 Analiza zastupljenosti SAHH u pulpi banana različitih stadijuma zrelosti

Idealno vreme za branje banana je u početnom stadijumu zrenja dok voće još uvek ima zeleno obojenih delova ([155](#)). Prvi vidljivi znak zrenja je promena boje od zelene u žutu, što je objašnjeno Von Loesecke klasifikacijom koja opisuje sedam stadijuma zrelosti ([156-157](#)). U ranom stadijumu zrenja, banana sintetizuje alkaloidne i tanine koji imaju ulogu u odbrani od infekcija i daju nezrelim bananama gorak i opor ukus. Sazrevanjem, ćelije skladište vodu, šećere, škrob, organske kiseline i vitamine. Kako kora menja boju u žutu i postepeno dobija braon tačke raste udeo šećera, alkaloidi i tanini nestaju, pojačava se miris, menja se sastav proteina i tekstura postaje mekša ([158-160](#)).

Za poređenje aktivnosti nSAHH, korišćene su četiri zrele banane različitog stepena zrelosti (slika 17). Iz dobijenih proteinskih ekstrakata merena je koncentracija proteina Bratford-ovom metodom i određivana je hidrolitička aktivnost SAHH. Za analizu je korišćena ista količina početnog materijala, banane su tretirane istovremeno i istovetno, a dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 4.



Slika 17. Banane različitih stadijuma zrelosti

Tabela 4. Usporedne vrednosti dobijenih količina sirovog ekstrakta, ukupna koncentracija proteina u sirovom ekstraktu i aktivnost SAHH

Banana	Zapremina sirovog ekstrakta (mL)	Koncentracija proteina (mg/mL)	Hidrolitička aktivnost SAHH (U/mgP)
1	180	0.846	1.64
2	180	1.024	3.06
3	190	0.871	2.43
4	200	1.010	1.01

Količina (mL) dobijenog sirovog ekstrakta blago raste sa stepenom zrelosti banana što je u skladu sa procesom zrenja, promenom teksture, omekšavanjem pulpe i povećanjem sadržaja vode. Koncentracija ukupnih proteina se ne razlikuju značajno dok je najveća aktivnosti SAHH izmerena u uzorku 2, što je u skladu sa podacima iz literature o dinamičnim promenama u strukturi i sastavu sa pojavom braon tački na kori (158), pa su ovakve banane korišćene u radu za izolovanje i prečišćavanje nSAHH.

4.5 Rekombinantna S-adenozil-*L*-homocistein-hidrolaza

EnsemblPlants *Musa acuminata* (primary_assembly CAJGYN010000006) pretraga, dala je jedan transkript (ID Ma06_t08140.1) od 1867 bp, koji kodira banana SAHH (XP_009415939.1) protein od 485 aminokiselina u okviru gena Gene: Ma06_g08140 (161). Gen sadrži 3 egzona, 2 introna i 5' i 3' neprevedene regione (UTP).

Nukleotidna sekvenca S-adenozil-*L*-homocistein-hidrolaze (1720 bp) (NCBI XM_009417664) je preuzeta sa GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/XM_009417664.2?report=fasta) i sintetisana u Synbio Technologies (New Jersey, USA). Na slici 18 prikazana je aminokiselinska sekvenca enzima.

ORIGIN

```

1 mallvektst greykvkdlS qadfgrleie laevempglm acraefgpak pfagarisgs
61 lhmtiqtavI ietltalgae vrwscsnifs tqdhaaaia rdsaavfawk getlaeywvc
121 tercldwgpn ggpdlivddg gdatlliheg vkaeeeyekt gklpdpastd naefqivlgi
181 irdglkvdpk kyrkmkerlv gvseettgv krlyqmqasg allfpainvn dsvtkskfdn
241 lygcrhslpd glmratdvmi agkvavvcgy gdvgkgcaaa lkqagarviv teidpicalq
301 almeglpvlt ledvvseadi fvtttgnkdi imvdhmkkmk nnaivcnigh fdneidmhgl
361 etypgvkrit ikpqtDrwvf petktgiivl aegrImnlgc atghpsfvms csftnqviaq
421 lelWkekttg kyekkvvylp khldekvaal hlgklgaklt kltpsqadyi svpiegpykp
481 ahyry

```

Slika 18. Aminokiselinska sekvenca prirodnog banana SAHH (XP_009415939.1) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>.

Rekombinantna S-adenozil-*L*-homocistein-hidrolaza sa 6 x His tagom ima 1732 bp, na osnovu koje je izvedena proteinska sekvenca od 493 ak. Teorijska molekulska masa iznosi 54124.42 Da a *pI*: 6,12.

Upotrebom bioinformatičkog programa (<http://web.expasy.org/protparam/>), na osnovu prikazane proteinske sekvence, izračunate su osnovne osobine rekombinantnog SAHH.

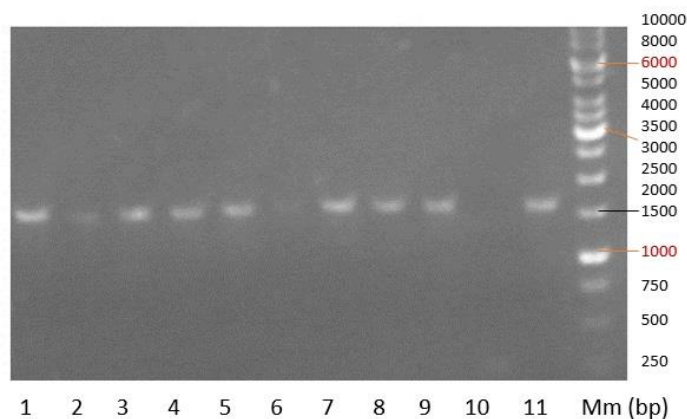
Tabela 5. Osnovne osobine rSAHH

Molekulska masa (Da)	Broj aminokiselina	<i>pI</i> vrednost	Alifatični indeks	Ekstinkcioni koeficijent
54124	493	6,12	89.84	60110 M ⁻¹ cm ⁻¹ za oksidovan cistein (-S-S-) 59360 M ⁻¹ cm ⁻¹ za redukovani cistein (-SH)

4.6 Dizajn pET-23b-SAHH plazmida

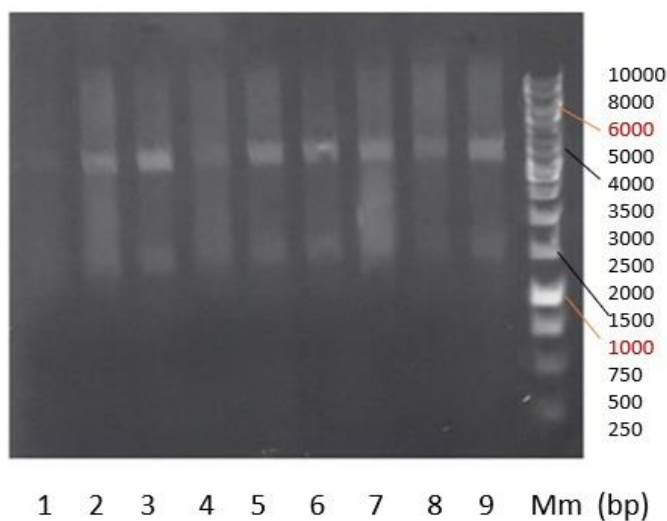
Za dobijanje rekombinantne SAHH primenjena je strategija zasnovana na kloniranju gena za SAHH u pET-23b vektor pri čemu se rekombinantnom proteinu dodaje His tag na C terminalnom kraju. Prvo je umnožen gen za SAHH i pET-23b vektor, tako što su ćelije *E.coli* DH5α transformisane ovim vektorima, zasejane na čvrstu LB podlogu sa ampicilinom i ostavljene preko noći na 37°C. Iz prekonocnih kultura zasejanih transformisanim ćelijama izolovano je po 50μL plazmida pUC57-SAHH i pET-23b.

Ligacija SAHH gena u pET-23b vektor je izvedena u molarnom odnosu 3 : 1 (SAHH gen : pET-23b-vektor) po protokolu opisanom u eksperimentalnom delu. Nakon toga je urađena transformacija kompetentnih *E.coli* DH5α ćelija ligacionom smešom, transformisane ćelije su zasejane na čvrstu podlogu sa ampicilinom i ostavljene preko noći na 37°C. Sve izrasle kolonije (ukupno 11) su umnožene pomoću colony PCR nakon čega je urađena agarozna elektroforeza kako bi se proverilo prisustvo gena za SAHH (Slika 19).



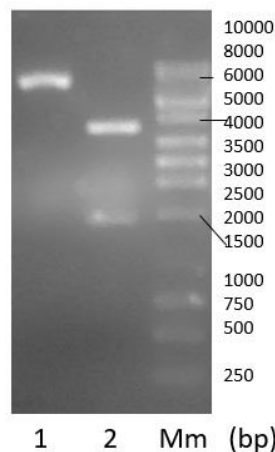
Slika 19. Agarozna elektroforeza nakon colony PCR. 1-11 kolonije nakon transformacije pET-23b-SAHH vektorom, 12 - DNK markeri.

Ligacija je bila uspešna kao i transformacija ligacionom smešom za 9 od 11 izraslih kolonija. Iz svih pozitivnih kolonija su izolovani plazmidi i provereno je prisustvo gena dvostrukom digestijom i agaroznom elektroforezom. Gen za rSAHH koji sadrži 1732 bp se nakon digestije nalazi na odgovarajućoj masi.



Slika 20. Agarozna elektroforeza nakon dvostruke digestije izolovanih plazmida iz ćelija transformisanih pET-23b-SAHH vektorom.

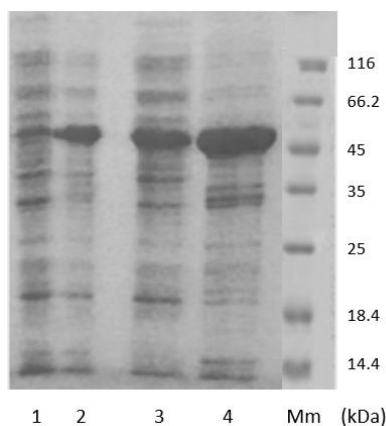
U uzorku digestovanim samo jednim restrikcionim enzimom se uočava traka na oko 5500 bp. U uzorku nakon dvostruke digestije se uočavaju dve trake. Traka više molekulska mase odgovara praznom pET-23b vektoru (3665 baznih parova). Druga traka odgovara genskom insertu za SAHH (Slika 21).



Slika 21. Agarozna gel elektroforeza pET-23b-SAHH (Pozicija 1 - pET-23b-SAHH digestovan restrikcijom enzimom XhoI; pozicija 2 - pET-23b-SAHH digestovan sa restrikcijom enzimima NdeI i XhoI; Mm - DNK markeri (O Gene Ruler 1kb DNA Ladder)).

4.7 Proizvodnja rekombinantne SAHH u *E. coli*

Transformisane su *E.coli* BL21 ćelije pET-23b-SAHH vektorom i zasejane na čvrstu podlogu sa antibiotikom ampilicinom (Amp). Nakon inkubacije 16 h na 37°C, jedna kolonija je prenetu u LB medijum i ostavljena preko noći na 37°C. Sveži LB medijum je inokulisan prekonoćnom kulturom do OD₆₀₀=0,6 pa je indukovana ekspresija sa 1 mM IPTG-om. Ekspresija je rađena preko noći na sobnoj temperaturi (22°C, 250 rpm).



Slika 22. SDS PAGE rSAHH (1 - kontrola ekspresije, 2 - ekspresija, 3 - supernatant nakon liziranja ćelija, 4 - talog nakon liziranja, Mm - molekularni markeri).

Uzorci pre dodatka IPTG i nakon završetka ekspresije su elektroforetski analizirani pomoću SDS PAGE (Slika 22).

4.8 Optimizacija ekspresije rekombinante SAHH

4.8.1 Selekcija ekspresionog sistema

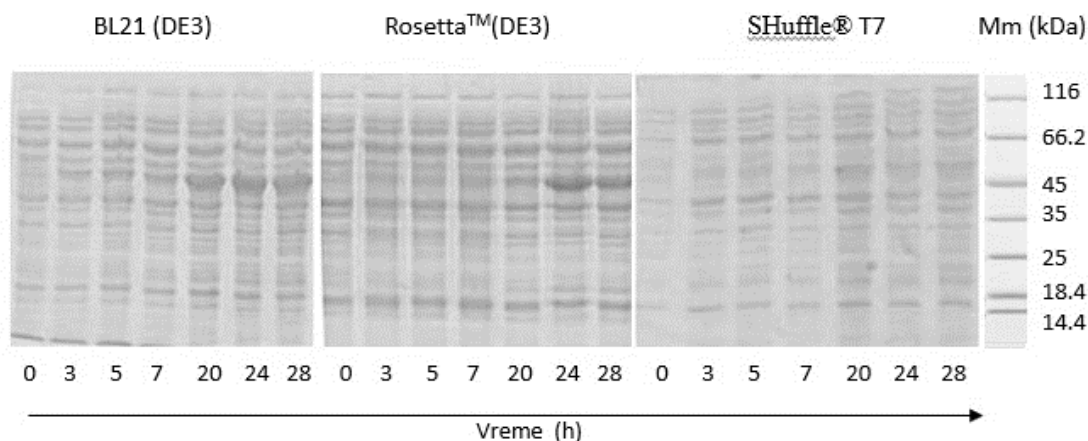
Nakon uspešnog umnožavanja i izolovanja pET-23b-SAHH plazmida optimizovali smo ekspresiju sa ciljem dobijanja što većeg prinosa rSAHH. Za ekspresiju SAHH odabrana je *E. coli* zbog svojih jedinstvenih svojstava. *E. coli* ima metilacioni sistem koji se značajno razlikuje od drugih Archebacteria, Eubacteria i Eucariota jer njegov metilacioni sistem ne sadrži gen za *sahh*, što je za naše potrebe važno, jer omogućava dobijanje željenog enzima u visokom prinosu.

Za ekspresiju rekombinantne SAHH iz parazita, patogenih bakterija i nekih biotehnoški relevantnih ekstremofila i drugi istraživači su koristili *E. coli* ([125,162–168](#)).

Za odabir najpogodnijeg ekspresionog sistema testirana su tri različita soja *E. coli*: BL21(DE3), RosettaTM(DE3) i SHuffle®T7. BL21(DE3) je osnovni IPTG-inducibilni soj, koji ima λ DE3 lizogen sa genom za T7 RNA polimerazu pod kontrolom LacUV5 promotora. Ima deficit lon i ompT proteaze i pogodan je za ekspresiju proteina. RosettaTM(DE3) je nadograđen BL21 derivat, dizajniran za ekspresiju različitih eukariotskih proteina koji sadrže kodone koji se retko koriste u *E. coli*. SHuffle®T7 je relativno novi *E. coli* ekspresioni soj koji omogućava pravilno uvijanja proteina sa disulfidnim vezama ([169](#)).

Ekspresija je rađena po opisanom protokolu uz korišćenje odgovarajućih antibiotika: ampicilina za BL21(DE3), ampicilina i hloramfenikola za RosettaTM(DE3) i spektinomocina, streptomocina i ampicilina za SHuffle®T7 ćelije. Ekspresija je indukovana sa 0,5 mM IPTG i ćelije su rasle tokom 28 h na 20°C, uz konstantno mešanje na 250 rpm.

U sva tri testirana soja *E. coli* indukovana je produkcija rSAHH što se na gelu nakon urađene SDS PAGE vidi kao karakteristična traka na poziciji koja odgovara Mm 55 kDa. Intenzitet trake dostiže maksimum između 20 i 24 h od početka indukcije - zavisno od soja (slika 23).



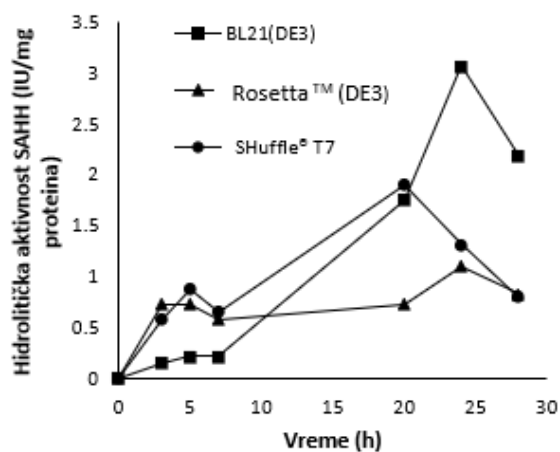
Slika 23. SDS PAGE profil ekspresije rSAHH u tri soja *E. coli*.

4.8.2 Praćenje proizvodnje rSAHH u različitim sojevima *E.coli*

Proizvodnja rSAHH je praćena u *E.coli* BL21(DE3), Rosetta™(DE3) i SHuffle® T7 sojevima zavisno od vremena indukcije. Prekonoćna kultura je zasejana u sveže pripremljenom LB medijumu. Alikvoti ćelijskih kultura (1 mL) su uzimani pre indukcije sa 0,5 mM IPTG, kao i 3, 5, 7, 20, 24 i 28 časova nakon indukcije. Nakon liziranja ćelija proteinski ekstrakt je izdvojen i čuvan na -20°C do izrade enzimskog eseja. Vremenska zavisnost ekspresije rSAHH u različitim ekspresionim sistemima je prikazana na u tabeli 6.

Tabela 6. Hidrolitička aktivnost SAHH u sojevima *E.coli*

Vreme (h)	Hidrolitička aktivnost SAHH (IU/mg protein)		
	BL21(DE3)	Rosetta™(DE3)	SHuffle® T7
0	0	0	0
3	0.146	0.730	0.584
5	0.219	0.730	0.876
7	0.219	0.584	0.657
20	1.752	0.735	1.898
24	3.066	1.095	1.314
28	2.191	0.834	0.803

Slika 24. Aktivnost rSAHH u tri soja *E.coli*: BL21(DE3) (■), Rosetta™(DE3) (▲), i SHuffle® T7 (●).

Za sva tri testirana soja, kinetika ekspresije daje zvonastu krivu sa jasno izraženim maksimumom enzimske aktivnosti (slika 24) što se poklapa sa intenzitetom trake iz alikvotiranih uzoraka u navedenim vremenskim intervalima na SDS PAGE (slika 23).

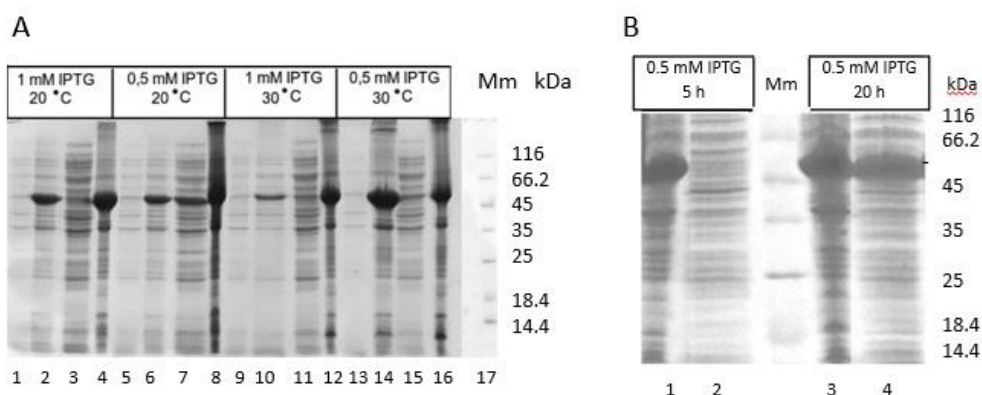
Profil enzimske aktivnosti pokazuje da rSAHH proizvedena u BL21(DE3) ćelijama pokazuje značajno višu hidrolitičku aktivnost u poređenju sa rSAHH proizvedenu u druga dva soja, pa su ove ćelije izabrane za ekspresioni sistem za dalju produkciju rSAHH.

4.8.3 Optimizacija temperature, koncentracije IPTG i vremena ekspresije

Kako bi se u potpunosti iskoristio potencijal BL21(DE3) ćelija u proizvodnji rSAHH, detaljnije smo ispitivali uticaj temperature, koncentracije dodatog IPTG i vremena trajanja ekspresije. Ćelije *E.coli* BL21(DE3) su transformisane konstruktom pET-23b-SAHH, po gore opisanom postupku, a zatim je urađena indukcija pomoću 1 mM i 0,5 mM IPTG. Nakon indukcije, ekspresija je nastavljena na 20°C i 30°C, uz mešanje tokom 5 h i 20 h. Uzorci su elektroforetski analizirani na 12% SDS-PAGE.

Najbolji odnos čistoće i prinosa rSAHH je dobijen kada je ekspresija indukovana sa 0,5 mM IPTG na 20°C. Pri ovim uslovima rSAHH se dobija u većoj količini u solubilnoj formi. Duže vreme ekspresije takođe pozitivno deluje na produkciju rSAHH. Ovi rezultati su u korelaciji sa kinetikom ekspresije i u saglasnosti sa literaturnim podacima o optimalnim uslovima za naš ekspresioni sistem (166, 169, 170). Treba pomenuti da je modulacija uslova ekspresije rezultirala dupliranjem prinosa, tako da je u optimalnim uslovima dobijeno 10 mg proteina iz 1L ćelijske kulture.

Primećeno je da se sa porastom temperature na kojoj je rađena ekspresija povećava koncentracija proteina u inkluzionim telima. Sa porastom koncentracija IPTG, koncentracija proteina je takođe bila veća u inkluzionim telima. Na nižim temperaturama i sa nižom koncentracijom IPTG povećava se koncentracija proteina u solubilnoj frakciji.



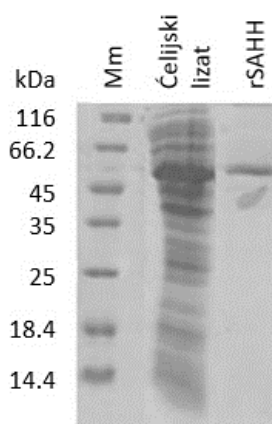
Slika 25. Uticaj temperature, koncentracije IPTG, i vremena ekspresije na prinos rSAHH u BL21(DE3). **A** - Uticaj temperature i koncentracije dodatog IPTG (pozicije 1, 5, 9, 13 - alikvoti pre indukcije ekspresije; pozicije 2, 6, 10, 14 - alikvoti nakon 20 h ekspresije; pozicije 3, 7, 11, 15 - solubilna frakcija nakon liziranja ćelija; pozicije 4, 8, 12, 16 - talog sa inkluzionim telima nakon liziranja ćelija; pozicija 17 - molekularni markeri); **B** - Uticaj vremena inkubacije. Ekspresija rSAHH je indukovana 0,5 mM IPTG a ekspresija je trajala 5 h i 20 h na 20°C (pozicije 1 i 3 - inkluzionih tela nakon 5 h i 20 h ekspresije; pozicije 2 i 4 - solubilna frakcija ćelijskog lizata nakon 5 h i 20 h ekspresije; Mm - molekularni markeri).

4.9 Prečišćavanje rekombinantne SAHH metal-afinitetnom hromatografijom

Za afinitetnu hromatografiju korišćena je Hi TrapIMAC kolona zapremine 1 mL. Metalni jon korišćen za afinitetno vezivanje rekombinantnog proteina sa His tagom je Co^{2+} .

Hromatografija je urađena u nativnim uslovima. Za ekvibraciju kolone je korišćen 50 mM TRIS, 0,15 M NaCl, 10 mM imidazol, pH 7,4, a za eluiranje vezanih proteina 50 mM TRIS, 0,15 M NaCl, 0,3 M imidazol, pH 7,4. Vezane frakcije su eluirane puferom za eluciju.

Nakon prečišćavanja metal afinitetnom hromatografijom, na SDS PAGE je vidljiva jedna traka na poziciji oko 55 kDa koja potiče od rSAHH (Slika 26).



Slika 26. SDS elektroforeza ćeljskog lizata i SAHH nakon prečišćavanja afinitetnom hromatografijom.

4.10 Karakterizacija rekombinantne S-adenozil-*L*-homocistein-hidrolaze

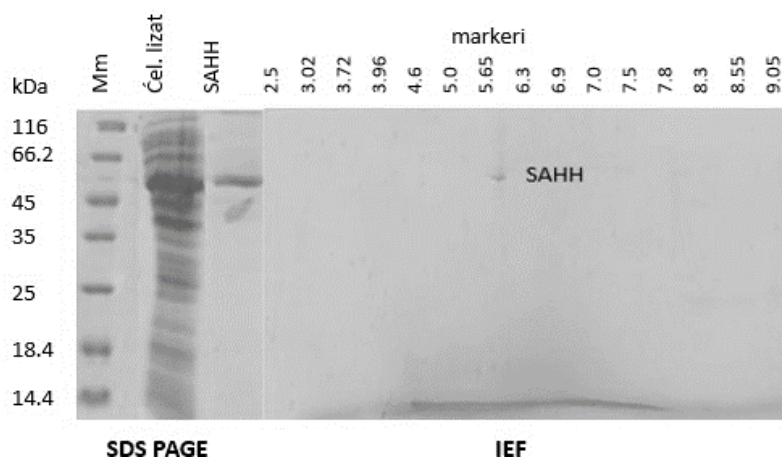
U cilju karakterizacije prečišćenog rekombinantnog SAHH određena je molekulska masa SDS PAGE elektroforezom i gel filtracijom. Izoelektrična tačka je određena izoelektričnim fokusiranjem (IEF), imunodetekcijom je provereno prisustvo His taga u rSAHH, proverena je aktivnost enzima, urađeni su pH i temperaturni optimum, i masena spektrometrija (MS).

4.10.1 Određivanje molekulske mase i *pI* vrednosti rSAHH

Molekulska masa monomera SAHH je određena pomoću SDS-PAGE na 12% akrilamidnom gelu poređenjem traka sa molekulskim markerima koji su bili u opsegu od 14.4 do 116 kDa.

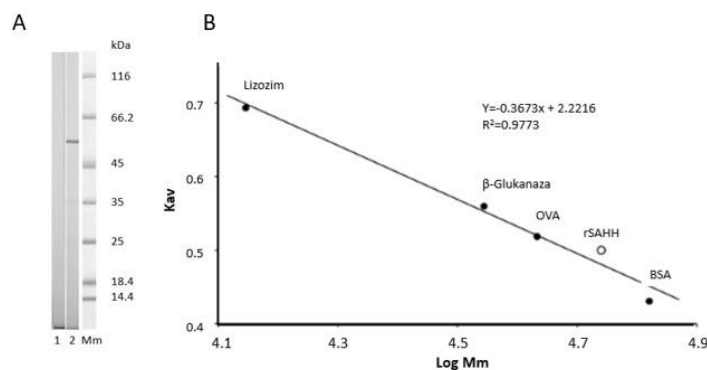
IEF razdvajanje je pokazalo prisustvo jedne homogene trake sa *pI* 5.83 i molekulskom masom od 55 kDa (Slika 27). Ovi eksperimentalno dobijeni podaci su skoro identični sa teorijskom

molekulskom masom od 54.124 kDa i pI 6.12 izračunatom na osnovu aminokiselinske sekvence. Ova razlika u pI i molekularnoj masi se pripisuje prisustvu C terminalnog 6His taga u rekombinantnoj SAHH.



Slika 27. Određivanje molekulske mase i pI rekombinantne SAHH.

Molekulska masa nativne rekombinantne SAHH je određena gel filtracionom hromatografijom na Superdex 75 PC 3.2/30 koloni, korišćenjem markera koji su bili u opsegu 14.3 do 290 kDa. Dobijena molekulska masa na oba opisana načina je odgovarala masi od 55 kDa.



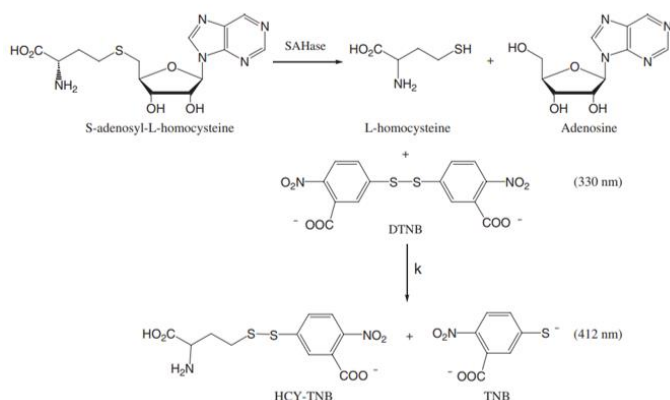
Slika 28. A – Imunodetekcija 6His rSAHH (pozicija 1 – kontrola sekundarnih antitela, pozicija 2 – His tag rSAHH, Mm – molekularni marker); B – Određivanje molekulske mase rSAHH gel filtracijom.

4.10.2 Imunodetekcija 6His rSAHH

Imunodetekcija 6His rSAHH je rađena po protokolu opisanom u eksperimentalnom delu. Kao primarna, korišćena su mišja monoklonska anti-His antitela, a kao sekundarna, anti-mišja IgG antitela obeležena alkalnom fosfatizom. Western blot na slici 28 potvrđuje prisustvo 6His taga.

4.10.3 Određivanje enzimske aktivnosti SAHH

Enzimski esej za praćenje aktivnosti SAHH se zasniva na hidrolizi S-adenozil homocisteina (SAH) pomoću SAHH pri čemu nastaje L-homocistein koji reaguje sa Ellman-ovim reagensom (DTNB) i nastaje obojeno jedinjenje TNB koje se detektuje spektrofotometrijski na 405nm (Slika 29).



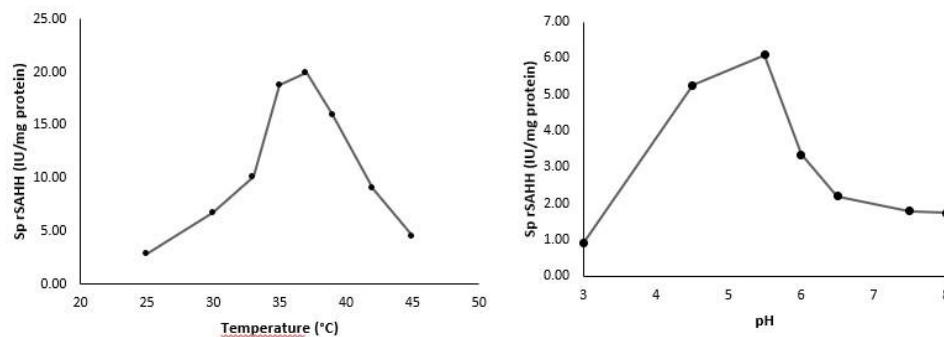
Slika 29. Šematski prikaz reakcije hidrolize S-adenozil homocisteina pomoću SAHH i nastanak obojenih proizvoda koji se detektuju spektrofotometrijski (166).

Hidrolitička aktivnost SAHH je određivana na 37°C, pH 5.5 mešanjem supstrata (50 μM SAH, 250 μM Ellman-ov reagensa) sa SAHH enzimom. Apsorbanca na 405 nm je merena u nultom minutu, neposredno nakon dodatka enzima u supstrat i nakon inkubacije od 20 minuta. Hidrolitička aktivnost SAHH je računata pomoću molarnog apsorpcionog koeficijenta redukovanog Ellman-ovog reagensa od 13 600 L/mol cm. Jedna jedinica hidrolitičke aktivnosti SAHH (IU) je definisana kao količina enzima koja produkuje 1 μmol L-homocisteina (Hcy) po minuti.

4.10.4 Određivanje temperaturnog i pH optimuma enzimske aktivnosti rekombinantne SAHH

Za određivanje pH optimuma, SAHH je inkubiran sa supstratom u 50 mM Na-fosfatnom puferu čiji je pH bio u opsegu od 3.5 do 8.5. Utvrđeno je da je optimalna vrednost pH 5.5.

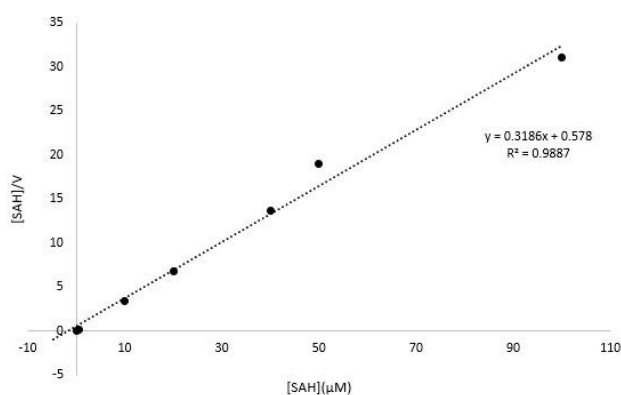
Temperaturni optimum je određen na optimalnom pH inkubiranjem SAHH sa supstratom na temperaturama koje su bile u opsegu 20°- 50°C. Utvrđeno je da je optimalna temperatura 37°C.



Slika 30. Temperaturni i pH optimum rSAHH: zvonasta kriva na grafiku levo ukazuje da je temperaturni optimum na 37°C, a na grafiku desno da je optimalna pH 5.5.

4.10.5 Određivanje kinetičkih parametara SAHH

Kinetički parametri SAHH su rađeni u hidrolitičkom smeru koji je dominantan u fiziološkim uslovima. Kinetički parametri SAHH u hidrolizi SAH su računati iz Hanes-Woolf-ove krive: $S/v = S/v_{max} + K_m/v_{max}$. Izračunati su K_m 1,81 μM , v_{max} 3,14 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ i K_{cat} 1.11 s^{-1} . Prema literaturnim podacima, kinetički parametri SAHH variraju značajno zavisno od izvora SAHH. K_m varira od 1,0 μM SAH za SAHH iz jetre hrčka (171) do 84 μM SAH za SAHH iz *A. Calcoaceticus* (172). Literaturni podaci za V_{max} uključuju vrednosti od 0,163 $\mu\text{mol/min mg}$ za SAHH iz *S. Solfataricus* (173) do čak 610 $\mu\text{mol/min mg}$ za SAHH iz *C. Efficiens* (174). Sve izračunate vrednosti za SAHH se uklapaju u opsege nađene u literaturi. Velika variranja primećena u kinetičkim parametrima između različitih SAHH enzima su verovatno posledica u varijacijama između kvaternerne strukture enzima kao i sadržaja NAD^+ .



Slika 31. Kinetički parametri rSAHH pri hidrolizi SAH: Hanes-Woolf-ova linearizacija.

4.11 Masena spektrometrija rekombinantne SAHH iz banane

Analiza rSAHH peptida pomoću Mascot Server™ servera je potvrdila 98% poklapanja u proteinskoj sekvenci (Slika 32), odnosno od 493 aminokiseline, 484 je identifikovano MS/MS analizom.

```
MALLVEKTSTGREYKVKDLSQADFGRLEIELAEVEMPGLMACRAEFGPAKPFAGA
RISGSLHMTIQTAVLIETLTALGAEVRWCSCNIFSTQDHAAAAIARDSAAVFAWK
GETLAEYWWCTERCLDWGPNGGPDLIVDDGGDATLLIHEGVKAE EYEKTKGLPD
PASTDNAEFQIVLGIIRDGLKVDPKKYRKMKERLVGVSEETTGVKRLYQMQASG
ALLFPAINVND SVTKSKFDNLYGCRHSLPDGLMRATDVMIAGKVAVVCGYGDVKG
GCAAALKQAGARVIVTEIDPICALQALMEGLPVLTLLEDVVSEADIFVTTTGNKDI
IMVDHMKMKNNNAIVCNIGHFDNEIDMHGLETYPGVKRITIKPQTDRWVFPETKT
GIIVLAEGRLMNLGCATGHPSFVMSCSFTNQVIAQLELWKEKTTGKYEKKVYVLP
KHLDEKVAALHLGKLGAKLTKLTPSQADYISVPIEGPYKPAHYRYLEHHHHHH
```

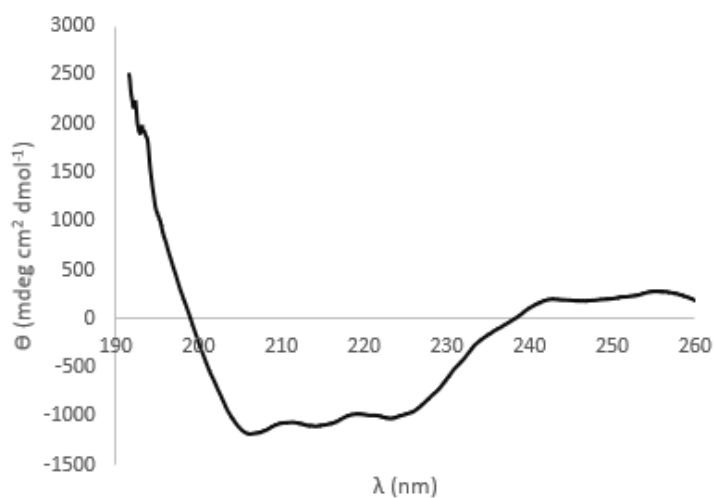
Slika 32. Masena spektrometrija rSAHH, potvrđeni peptidi su označeni plavom bojom.

4.12 CD karakterizacija i 3D modelovanje

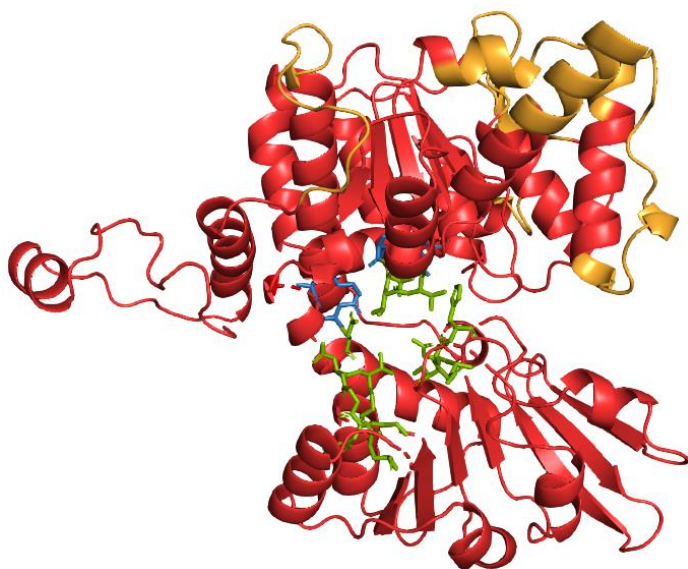
Cirkularni dihiroizam (CD) je spektroskopijska tehnika koja se pored proučavanja protein-protein interakcija sve više koristi i kao metoda za određivanje sekundarne strukture proteina u rastvoru (175). CD meri razliku u apsorpciji levo i desno cirkularno polarizovane svetlosti. CD spektar proteina je podeljen u tri oblasti: daleki UV region (178 - 260 nm) gde je dominantan doprinos peptida i ova oblast je bitna za određivanje sekundarnih struktura, bliska UV oblast (350 - 260 nm) gde apsorbuju bočni aromatični ostaci, i bliska UV-vidljiva oblasti (300 - 700 nm) gde apsorbuju spoljašnje hromofore (176). Može se meriti unutrašnji i spoljašnji CD proteina. Unutrašnji CD proteina je spektar koji potiče od amidne osnove i osetljiv je na sekundarnu strukturu proteina. Amidna veza apsorbuje u dalekoj UV oblasti. Porast negativnog elipticiteta između 222 i 208 nm i pozitivni elipicitet oko 193 nm obično ukazuje na povećan sadržaj α -heliksa (177), dok porast pojedinačne negativne trake oko 218 nm i pozitivna traka na 295 nm ukazuje na postojanje β -strukture (178). Veliki broj različitih proteina koji imaju primenu između ostalog u dijagnostici i terapiji se dobijaju rekombinantnom tehnologijom. Kako bi se proverilo pravilno uvijanje proteina od čega zavisi njihova stabilnost i funkcija sprovodi se niz strukturnih analiza a CD je prepoznata kao nedestruktivna metoda koja se relativno lako izvodi, zahteva malu količinu uzorka i obezbeđuje brze i pouzdane rezultate (179).

Snimanjem CD spektra rSAHH u dalekoj UV oblasti uočen je minimum na oko 206 nm i maksimum oko 192 nm što potvrđuje da protein ima uglavnom strukturu α -heliksa što je u skladu sa literaturnim podacima (177).

Predviđanje trodimenzionalne strukture proteina samo na osnovu aminokiselinske sekvence je bio veliki problem koji je u dobroj meri prevaziđen razvojem kompjuterskih programa. AlfaFold2 je najnovija verzija programa koja može predvideti strukturu proteina na osnovu sekvence veoma pouzdano čak i kada nisu poznate druge slične strukture (180). Korišćenjem kompjuterskih programa proces predviđanja 3D strukture je znatno skraćen, a tačnost kompjuterskih rešenja se poklapa sa eksperimentalno dobijenim strukturama (181).



Slika 33. CD spektar rSAHH.



Slika 34. Pretpostavljena 3D struktura nSAHH iz banane pomoću programa Alfa fold. Kofaktor-vezujuće mesto je prikazano zelenom bojom, supstrat-vezujuće mesto plavom, a predviđeni B ćelijski epitopi žutom bojom.

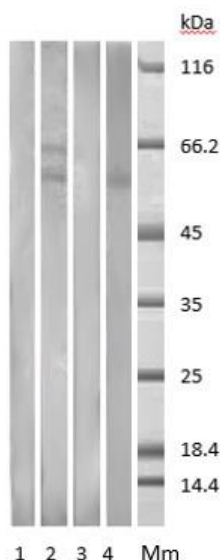
Korišćenjem AlfaFold2 programa predviđena je 3D struktura SAHH. Enzim se sastoji uglavnom od α -heliksa, koji formiraju tri konzervirana domena: N-terminalni koji je supstrat vezujući (katalitički domen), NADH/NAD⁺- kofaktor vezujući domen i C- terminalni domen. Arhitektura enzima je slična kao i kod drugih NAD/NADP-zavisnih enzima, gde katalitički i kofaktor vezujući domen sadrže modifikovanu Rossmann-ovu strukturu ([182](#)). Supstrat vezujući i

kofaktor vezujući domen formiraju duboki rasep povezan kratkim zglobnim delom. U centralnom delu enzima nalazi se region bogat glicinom koji je uključen u vezivanje NAD^+ kofaktora što je na slici modela prikazano zelenom bojom. Supstrat vezujuće mesto na površini enzima označeno je plavom bojom (slika 34).

4.13 Ispitivanje IgE reaktivnosti rSAHH i nSAHH

Do sada SAHH iz banane nije bio prepoznat kao alergen. Naš cilj je bio da proverimo alergeni potencijal ovog proteina. Zbog dugotrajnog postupka izolovanja i prečišćavanja kojim se dobija mala količina proteina, koja je nedovoljna za detaljniju karakterizaciju nSAHH, proizveden je homolog protein prirodne SAHH rekombinantnom DNK tehnologijom u prinosu koji je omogućio biohemijsku i imunohemijsku karakterizaciju rSAHH. IgE reaktivnost nSAHH i rSAHH je pokazana u imunoblotu, tako što su nSAHH i rSAHH prvo elektroforetski razdvojeni u redukujućim uslovima na 12% gelu, a zatim je rađen polusubi transfer na NC membranu. Zatim je rađen imunoblot sa pulom seruma pacijenata alergičnih na bananu (tabela 7). Serumi su dobijeni od Univerzitetske klinike u Libeku, Nemačka. Kod pacijenata su se nakon upotrebe banane pojavili simptomi alergijske reakcije.

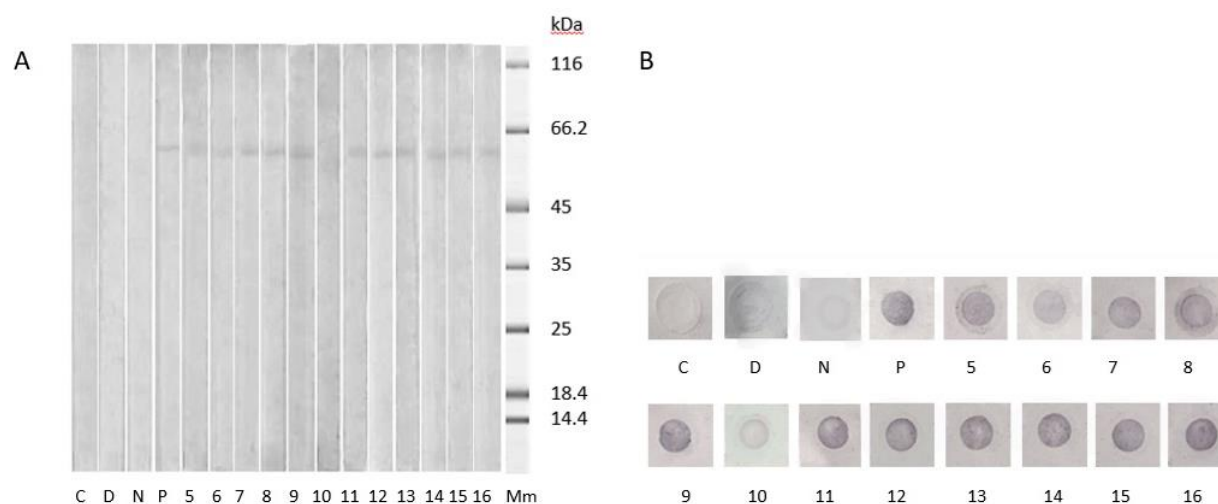
Imunoreaktivnost rSAHH je potvrđena imunoblot analizom sa pulom seruma uz pojavu trake na 53 kDa. U imunoblot i dot blot analizi sa pojedinačnim serumima, deset od dvanaest pacijenata (83.3%) je pokazalo IgE reaktivnost na rSAHH.



Slika 35. Ispitivanje IgE reaktivnosti prirodnog i rekombinantnog SAHH sa pulom seruma pacijenata alergičnih na bananu 1- Kontrola nSAHH, 2 - n SAHH, 3 - Kontrola rSAHH, 4 - rSAHH; Mm - molekularni markeri.

Tabela 7. Demografski i klinički podaci o pacijentima uključenim u studiju

	Godine/ pol	Istorija alergije na bananu	Ukupni IgE (IU/mL)	sIgE _{Banana} (KU/L)	SPT _{Banana}	Simptomi alergije na bananu	Alergija na druge namirnice	Inhalator na alergija
1	57/Ž	+	15	-	n.d.	OAS	Lešnik, šargarepa, kruška, jabuka, breskva, kupus	Da
2	32/Ž	+	291	0,12	n.d.	OAS	Jabuka, soja, višnja, kruška, dinja, šargarepa, jagoda, paradajz, šljiva, breskva	Da
3	70/Ž	+	54	-	n.d.	S	Breskva, kivi, kruška, orašasti plodovi	Da
4	42/Ž	+	176	0	+	S	Ne	Da
5	48/Ž	+	93,6	0,4	n.d.	OAS	Ne	Da
6	47/Ž	+	31,8	0	-	OAS	Kivi, orasi	Da
7	30/Ž	+	16,3	0	+	L&S	Kivi	Ne
8	49/Ž	+	2496	1,77	+	L&S	Orašasti plodovi, jabuke, šargarepa, kivi, kari	Da
9	65/Ž	+	48,1	0,52	+	S	Ne	Da
10	36/Ž	+	836	12,3	n.d.	OAS	Jabuka, breskva, višnja, kivi, šargarepa, orašasti plodovi	Da
11	26/Ž	+	41	0,02	n.d.	OAS	Višnja, kruška, koštunjavo voće, orasi	Da
12	24/Ž	+	292,8	0	+	L&S	Kivi	Da
	36/ M	-	364,6	0	n.d.	AS	Ne	Da
	25/Ž	-	18,2	n.d.	Nema alergijskih simptoma	AS	Ne	Ne



Slika 36. Imunološka karakterizacija rSAHH: A - Immunoblot sa pojedinačnim serumima pacijenata. B - Dot blot sa pojedinačnim serumima pacijenata, (C - kontrola sekundarnih antitela; D - kontrola sa serumom pacijenta alergičnim na grinje; N - kontrola sa serumom pacijenta koji nema alergije; P - pul seruma pacijenata alergičnih na bananu; 1-12 - serumi pacijenata alergičnih na bananu; Mm - molekulske markeri).

4.14 Molekulske osnove ukrštene reaktivnosti SAHH i B ćelijski epitopi

Nakon rezultata dobijenih imunoblot i dot blot analizom kao i uvidom u podatke o pacijentima (Tabela 7) iz kojih se zapaža da je 4 od 11 pacijenata imalo pozitivan IgE na polen platana, moguće je da prethodno primećena ukrštena reaktivnost između banane i polena platana (120) potiče od SAHH. Sa ciljem potvrđivanja ove hipoteze prvo je ispitana homologija između banana SAHH i biljnih SAHH sa potvrđenom IgE reaktivnošću (krompir (*Solanum tuberosum*, UniProt KB M0ZZV7) i platan (*Platanus acerifolia*, GenBank: UYQ90945.1)).

U studiji Ansari i Mu, imunoblot i LC-MS/MS analizom, SAHH je identifikovan kao biomarker alergije na krompir na mišjem modelu (130).

Prečišćeni prirodni SAHH iz platana (*Platanus acerifolia*) je registrovan kao respiratorni alergen Pla 5 na osnovu rezultata dobijenih u imunoblotu sa serumima alergičnih osoba (<https://www.allergen.org/viewallergen.php?aid=1114>).

Iako njegov alergeni potencijal još uvek nije potvrđen, SAHH iz žute lupine (*Lupinus luteus*, UniProt KB Q9SP37) je takođe uključen u uporednu analizu aminokiselinskih sekvenci. SAHH iz žute lupine predstavlja strukturni prototip biljne SAHH (126) sa potencijalnim značajem za bezbednost hrane. Povećano je interesovanje za sirovo seme *Lupinus albus*, *Lupinus luteus* i *Lupinus angustifolius* kao alternativni izvor proteina u Evropi, SAD, Australiji i Novom Zelandu kao zamena u ishrani kod pacijenata sa alergijom na pšenične proteine i celijakijom s obzirom na

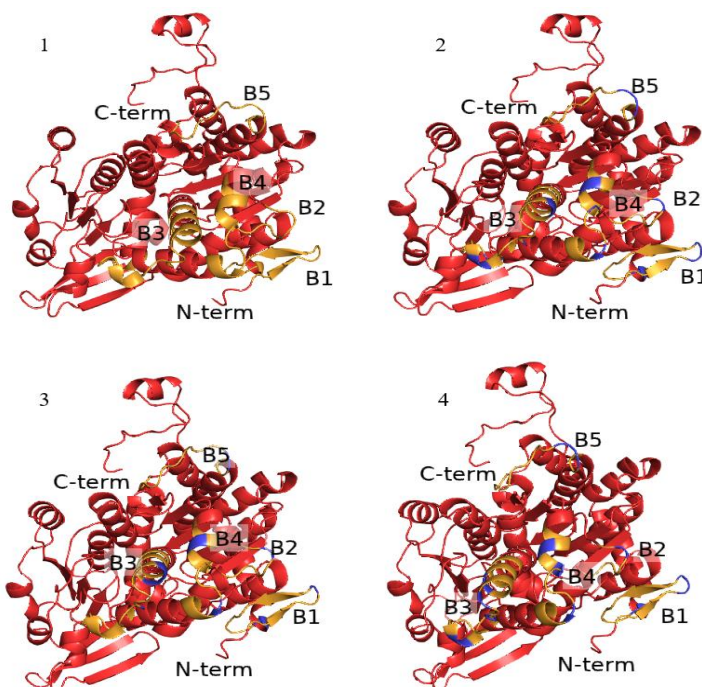
to da lupina ne sadrži gluten. Uprkos ovim značajnim nutritivnim pogodnostima, lupina je nadolazeći alergen hrane sa mogućim ozbiljnim kliničkim manifestacijama (183, 184).

Poređenje sekvenci navedenih biljnih SAHH je pokazalo visok stepen homologije (>90%), što je saglasno sa visoko konzerviranom strukturom ovog enzima (126). SAHH iz banane ima 92,58%, 90,52% i 90,31% identične sekvence sa SAHH iz platana (*Platanus acerifolia*), krompira (*Solanum tuberosum*) i žute lupine (*Lupinus luteus*), redom.

Proteini SAHH iz krompira (*Solanum tuberosum*) (130), bokvice (*Plantago lanceolata*) (129) i platana (*Platanus acerifolia*), (www.allergen.org) su prepoznati kao IgE reaktivni proteini. Poređenjem sekvenci SAHH iz banane (A0A804KET5), krompira (M0ZZV7) i platana (UYQ90945.1) nađena je podudarnost od 90,52% između banane i krompira i 92,58% između banane i platana. Takođe je rađena BLAST pretraga kojom su poređene sekvence SAHH iz banane sa sekvencama SAHH proteina iz drugih izvora kako bi se uporedile aminokiseline koje čine supstrat vezujuće mesto (T64, D139, E205, K235 i D239) i kofaktor vezujuće mesto (TTT (206-208), N240, GYGDVG (269-274), E292, N327, IGH (348-350) i N397, <https://www.uniprot.org/>). S obzirom na to da su aminokiseline uključene u ova dva vezujuća mesta evoluciono jako konzervirane, pretpostavlja se da je mehanizam vezivanja SAHH iz banane isti kao i kod SAHH iz drugih izvora.

Zbog značaja primene B-ćelijskih epitopa u dizajnu vakcina (185), imunodijagnostičkim testiranjima i proizvodnji antitela (186), njihova detekcija i identifikacija je od vitalnog značaja. Eksperimentalne metode koje se koriste za identifikaciju B-ćelijskih epitopa: rendgenska kristalografija, krioelektron mikroskopija, NMR, vodonik-deuterijum izmena kuplovana sa masenom spektroskopijom su skupe i dugotrajne i ne mogu odgovoriti zahtevima i potrebama identifikacije B-ćelijskih epitopa (187). Takođe, prethodnih godina je znatno uvećana baza bioloških podataka što predstavlja dodatno opterećenje za rad eksperimentalnim metodama. Kao rezultat, razvijeni su kompjuterski programi koji znatno brže i efikasnije mogu pretraživati baze podataka i detektovati ćelijske epitope (187). Sofisticiran biološki mehanizam koji je u osnovi vezivanja antigena i antitela predstavlja veliki izazov u kompjuterskim i eksperimentalnim metodama za predviđanje B-ćelijskih epitopa (186). B-ćelijski epitopi se mogu identifikovati na nekoliko načina: modelovanjem 3D strukture antigen-antitelo kompleksa, pretragom peptidnih biblioteka za vezivanje antigena ili sprovođenjem funkcionalnih testova sa mutiranim antigenom (188, 189). Sa razvojem kompjuterskih tehnologija i novih programa dobijene su nove predikcione metode (187).

Za pretragu potencijalnih B-ćelijskih epitopa iz SAHH iz banane korišćeni su programi BEPITOP i BepiPred 2.0. Na osnovu osobina aminokiselinske sekvence, pomoću BEPITOP programa predviđeni regioni za SAHH iz banane su: 2-19, 122-136, 132-144, 146-176, 184-197, 199-213, 228-240, 317-331, 332-344 i 420-437. Korišćenjem BepiPred 2.0 servera predviđeni rezultati su: 5-13, 90-93, 111-117, 126-131, 151-173, 184-196, 233-235, 295-309, 329-334, 353-358, 360, 364-366, 369-375, 377-386, 426-442 i 459-481. Dalje, potencijalni B ćelijski epitopi za SAHH iz banane su selektovani na osnovi rezultata ova dva servera. Predviđeni peptidi su poređeni, i konačni rezultati ova dva programa su predvideli 5 peptida koji su identifikovani kao B-ćelijski epitopi SAHH: B1 (5-19), B2 (126-131), B3(151-173), B4(184-196 i B5(426-437). Svi epitopi su izloženi na površini SAHH (Slika 37), što je osobina imunodominantnih epitopa i iz drugih alergena hrane (183, 190- 192).



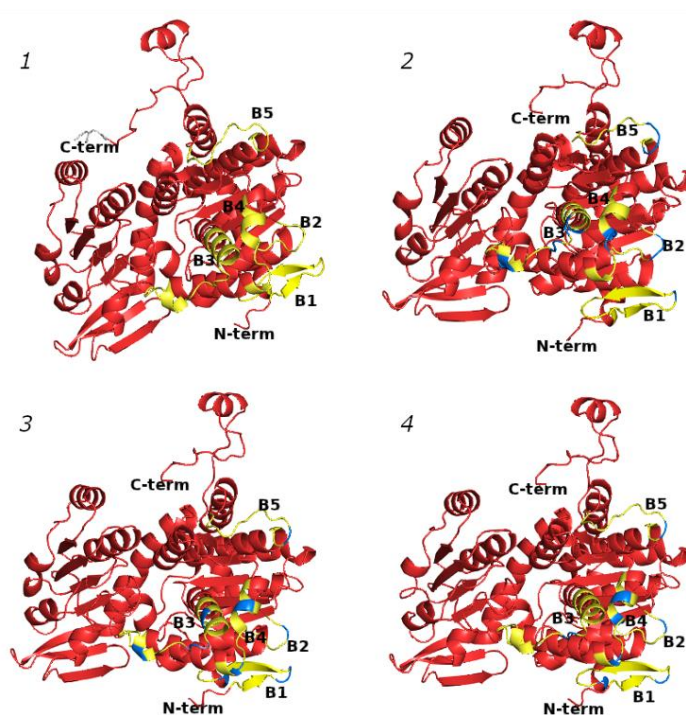
Slika 38. *In silico* predviđanje i mapiranje B ćelijskih epitopa u 3D strukturi SAHH. 1) banana, 2) krompir, 3) platan, 4) žuta lupina.

4.15 Profilisanje B i T ćelijskih epitopa

4.15.1 Bioinformatička analiza aminokiselinske sekvence SAHH za kivi (*Actinidia chinensis*), ljulj (*Lolium perenne*) i lateks (*Hevea brasiliensis*)

Na osnovu dobijenih rezultata za visoku homologiju aminokiselinske sekvence za SAHH iz banane, krompira, platana i lupine hteli smo da proverimo da li se u NCBI bazi podataka nalaze sekvence za SAHH enzim iz nekih poznatih alergeni izvora kao što su kivi, lateks i polen trave, s obzirom da se usled sličnosti u strukturi javlja ukrštena reaktivnost između proteina iz pobrojanih alergeni izvora. Za proveru sličnosti sekvence iz drugih alergeni izvora, pored aminokiselinske sekvence za SAHH banane (XP_009415939.1) preuzeta je aminokiselinska sekvence i za kivi (*Actinidia chinensis*) (PSS23942.1), ljulj (*Lolium perenne*) (XP_051195844.1) i lateks (*Hevea brasiliensis*) (XP_021689860.1). Svi odabrani proteini SAHH imaju 485 ak, a teorijske molekulske mase su 53059,30 Da za bananu, 53312,29 Da za kivi, 53256,23 Da za ljulj i 53271,29 Da za lateks. Proverom homologije između ovih aminokiselinskih sekvenci utvrđeno je preko 92% poklapanja (slika 39).

Pomoću Bepitope i BepiPred2.0 programa potvrđeni B-ćelijski epitopi za panel analiziranih proteina identični su kao i kod prethodne analize za SAHH iz krompira (*Solanum tuberosum*), platana (*Platanus acerifolia*) i žute lupine (*Lupinus luteus*).



Slika 40. *In silico* predviđanje B-ćelijskih epitopa u 3D strukturi SAHH 1) banane, 2) ljulja, 3) lateksa, 4) kivija. B - ćelijski epitopi su obeleženi žuto, a razlike u aminokiselinskoj sekvenci plavo.

4.15.2 Profilisanje T ćelijskih epitopa

T-ćelije prepoznaju i proveravaju peptide prikazane u okviru MHC molekula na površini antigen prezentujućih ćelija na osnovu čega prave razliku između sopstvenih peptida i peptida poreklom iz patogena ili mutiranih proteina. Zbog sposobnosti razlikovanja sopstvenog i štetnog, T-ćelije imaju presudnu ulogu u kontroli i toku imunog odgovora (83). Postoji veliko interesovanje za identifikaciju epitopa u antigenima iz praktičnih razloga kao što su razumevanje etiologije bolesti, praćenje imuniteta, razvoj dijagnostičkih eseja, razvoj vakcina na osnovu utvrđenih epitopa (22), u razumevanju molekularnih osnova alergija, razvoju alergen-specifične imunoterapije (193).

Predviđanje T-ćelijskih epitopa ima za cilj da identifikuje najkraće peptide u okviru antigena koji mogu da stimulišu CD4 ili CD8 T-ćelije (194). Ovaj kapacitet stimulacije T-ćelija je označen kao imunogenost i čine ga tri osnovna koraka: obrada antigena, vezivanje peptida za MHC molekule i prepoznavanje od strane T-ćelijskih receptora. Od ova tri koraka vezivanje peptida za MHC molekule je najselektivniji za određivanje T-ćelijskih epitopa (22). MHC I i MHC II molekuli imaju sličnu 3D strukturu sa vezanim peptidima, ali postoje i razlike bitne za predviđanje vezivanja peptida. Šupljina za vezivanje peptida u MHC I molekulu je zatvorena i kao rezultat ovi molekuli mogu vezati samo kratke peptide od 9 - 11 amino kiselina čiji N- i C- terminalni krajevi ostaju povezani za konzervirane ostatke MHC I molekula vodoničnim vezama. Peptid-vezujući deo na MHC II molekulu je otvoren i dozvoljava N- i C- terminalnim krajevima da se produže van

vezujućeg regiona (195, 196) što diversifikuje dužinu vezujućeg peptida (9 - 22 aminokiseline). U fazi senzitivizacije kod Tipa I preosetljivosti, profesionalne antigen-prikazujuće ćelije (dendritične ćelije, B ćelije i makrofagi) su specijalizovane da prikažu antigeni peptid CD4+T-ćelijama u sastavu MHC molekula klase II (peptid-MHC klasa II kompleks). Vezujući peptidni fragmenti obično sadrže 13 - 17 aminokiselina i vezani su za molekule MHC klase II, koji su izloženi na površini ćelija. Polimorfizam MHC molekula je glavni izazov u predviđanju T-ćelijskih epitopa. Razvijeni su programi koji rešavaju dva bitna problema: da razlikuju peptide koji imaju mogućnost da se vežu od onih koji nemaju ovu mogućnost, i drugo, da procenjuju afinitet vezivanja (197). ProPred je server koji potvrđuje sve HLA-DR alele nezavisno a rezultati se prikazuju na jednom ekranu što omogućava brzu vizuelizaciju potencijalnih peptida koji se vezuju ali je manje efikasan u predstavljanju preklapajućih regiona.

EpiDOCK je prvi server za predviđanje vezivanja peptida za humani MHC II protein na osnovu strukture koji može da identifikuje 90% peptida koji se vezuju, i 76% peptida koji se ne vezuju sa 83% preciznosti. Ovaj pristup zahteva podatke o rendgenskoj strukturi što zbog vremena obrade velikih proteoma otežava pretragu (197).

NetMHCIIpan-4.0 server se koristi za predviđanje CD4+ T-ćelijskih epitopa korišćenjem veštačkih neuronskih mreža (Artificial Neural Networks). Programiran je na obimnom skupu podataka od preko 500 000 merenja afiniteta vezivanja i masene spektrometrije eluiranog liganda, i pokriva tri humana izotipa MHC klase II (HLA-DR, HLA-DQ i HLA-DP) kao i H-2 molekul iz miša. Server može napraviti procenu za MHC II za bilo koji peptid za čiju sekvencu postoji FASTA format i može predvideti peptide bilo koje dužine. (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHCIIpan-4.0/>).

Korišćenjem NetMHCIIpan 4.0 programa, T-ćelijski epitopi iz banana SAHH su mapirani *in silico*. Jedanaest T-ćelijskih epitopa sa dužinom peptida od petnaest aminokiselina su detektovani za referentni set MHCII molekula, koji imaju prag 1% za peptide sa jakim vezivanjem. Lista peptida je prikazana u tabeli 8.

Tabela 8. *In silico* predviđeni T-ćelijski epitopi iz banana SAHH

Position	MHCII	Epitope	%Rank
182	DRB1_0301	RDGLKVDPKKYRKMK	0.04
96	DRB1_0301	AAAIARDSAAVFAWK	0.31
328	DRB1_0301	KDIIMVDHMKKMKNN	0.98
317	DRB1_0701	EADIFVTTTGNKDII	0.44
278	DRB1_0701	AAALKQAGARVIVTE	0.79
103	DRB1_1501	SAAVFAWKGETLAEY	0.39
142	DRB1_1501	DATLLIHEGVKAEED	0.91
96	DRB3_0101	AAAIARDSAAVFAWK	0.09
341	DRB3_0202	NNAIVCNIGHFDNEI	0.39
170	DRB5_0101	DNAEFQIVLGIIRDG	0.57
189	DRB5_0101	PKKYRKMKERLVGVS	0.79

Ista analiza je pokazala prisustvo 17 T-ćelijskih epitopa kod SAHH iz kivija, 12 T-ćelijskih epitopa kod SAHH iz ljulja i 8 T-ćelijskih epitopa kod SAHH iz lateksa. Četiri T-ćelijska epitopa su identična kod SAHH iz banane i kivija (pozicije 328, 278, 142 i 341) i kod SAHH iz banane i ljulja (pozicije 278, 142, 96 i 341). Dva ćelijska epitopa su identična kod SAHH iz banane i lateksa (pozicije 278 i 341). Razlike u aminokiselinskoj sekvenci kod ukrštenih T-ćelijskih epitopa naspram epitopa SAHH iz banane su označene crvenim slovima u tabelama 9, 10 i 11.

Tabela 9. T-ćelijski epitopi kod SAHH iz kivija sa ukrštenom reaktivnošću predviđeni *in silico* korišćenjem NetMHCIIpan 4.0 programa

Position	MHCII	Epitope	%Rank
182	DRB1_0301	RDGLK T DPK R Y H KMK	0.21
96	DRB1_0301	A SAIARDSAAVFAWK	0.31
328	DRB1_0301	KDIIMVDHMKMKNN	0.98
317	DRB1_0701	E TDIFVTTTGNKDII	0.42
278	DRB1_0701	AAALKQAGARVIVTE	0.79
103	DRB1_1501	SAAVFAWKGETL Q EY	0.38
142	DRB1_1501	DATLLIHEGVKAEEE	0.91
96	DRB3_0101	A SAIARDSAAVFAWK	0.09
341	DRB3_0202	NNAIVCNIGHFDNEI	0.39
170	DRB5_0101	DNAEFQIVL T IIRDG	0.52

Tabela 10. T-ćelijski epitopi kod SAHH iz ljulja sa ukrštenom reaktivnošću predviđeni *in silico*

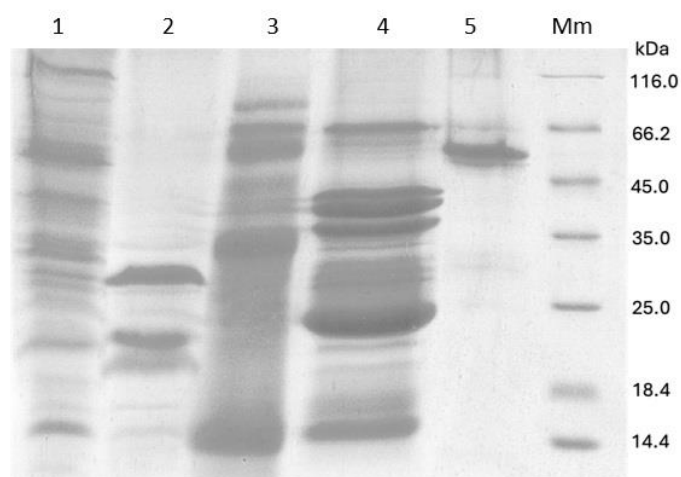
Position	MHCII	Epitope	%Rank
182	DRB1_0301	RDGLK T D V RRYRKMK	0.16
96	DRB1_0301	A SAIARDSAAVFAWK	0.31
317	DRB1_0701	D ADIFVTTTGNKDII	0.44
278	DRB1_0701	AAALKQAGARVIVTE	0.79
103	DRB1_1501	SAAVFAWKGETL E EY	0.38
142	DRB1_1501	DATLLIHEGVKAEEE	0.91
96	DRB3_0101	AAAIARDSAAVFAWK	0.09
341	DRB3_0202	NNAIVCNIGHFDNEI	0.39
170	DRB5_0101	DN P EF K IVL T IIRDG	0.07

Tabela 11. T-ćelijski epitopi kod SAHH iz lateksa sa ukrštenom reaktivnošću predviđeni *in silico*

Position	MHCII	Epitope	%Rank
182	DRB1_0301	RDGLK T DPKKY H KMK	0.16
96	DRB1_0301	AAAIARDSA S VFAWK	0.52
317	DRB1_0701	E TDIFVTTTGNKDII	0.44
278	DRB1_0701	AAALKQAGARVIVTE	0.79
103	DRB1_1501	SAS V FAWKGETL Q EY	0.39
96	DRB3_0101	AAAIARDSA S VFAWK	0.11
341	DRB3_0202	NNAIVCNIGHFDNEI	0.39
170	DRB5_0101	DNAEFQIVL T IIRDG	0.52

4.16 Ispitivanje prisustva SAHH aktivnosti u alergenim ekstraktima

Profili proteina alergenih ekstrakata banane, kivija, ljulja i lateksa su analizirani SDS PAGE elektroforezom. Banana i ljulj su pokazali širok spektar proteina čije su molekulske mase u opsegu od 116 kDa do 10 kDa. Ekstrakt kivija sadrži proteine u opsegu 67 kDa do 10 kDa sa dominantnim trakama na 28 kDa i 24 kDa, dok ekstrakt lateksa sadrži proteine koji su u opsegu masa od 67 kDa do 14.4 kDa sa dominantnim trakama na oko 40 kDa, 37 kDa i 24 kDa. Rekombinantni banana SAHH u SDS PAGE elektroforezi se nalazi na molekulskoj masi oko 55 kDa.

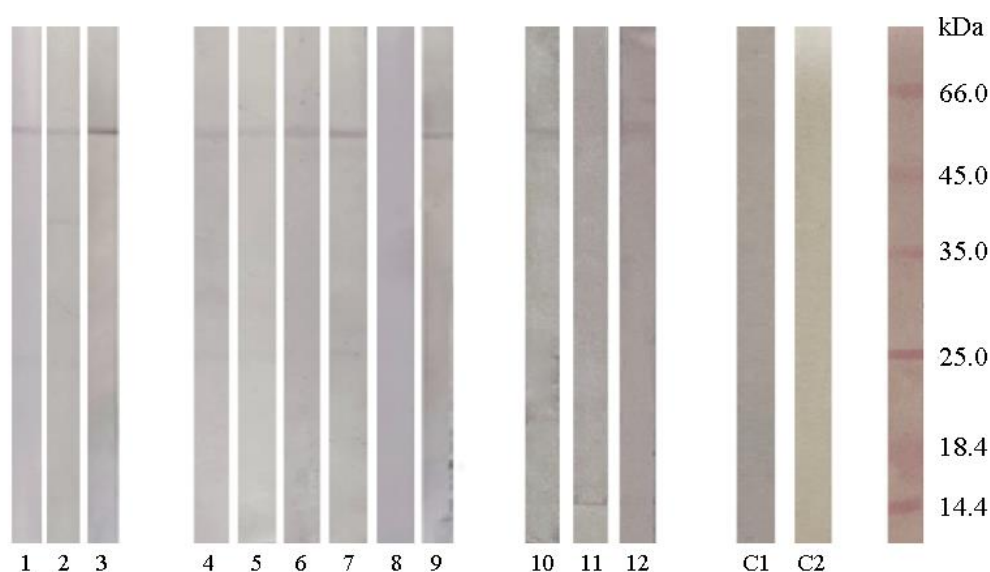


Slika 41. Profil proteina alergenih ekstrakata na 14% SDS-PAGE gelu: 1) banana, 2) kivi, 3) ljulj, 4) lateks, 5) rSAHH, Mm) molekulski markeri.

Prisustvo SAHH u pripremljenim alergenim ekstraktima je potvrđeno merenjem aktivnosti Elmanovim reagensom. Koncentracije proteina u svim ekstraktima su ujednačene na 0,25 mg/mL a izmerene aktivnosti su iznosile 0,85 U/mL u ekstraktu banane, 0,25 U/mL u ekstraktu kivija, 0,46 U/mL u ekstraktu ljulja i 0,219 U/mL u ekstraktu lateksa.

4.17 Detekcija SAHH-specifičnog IgE kod osoba alergičnih na ljulj, lateks i kivi

S obzirom na visoku homologiju u aminokiselinskoj sekvenci, kao i B-ćelijskim epitopima postavilo se pitanje da li rekombinantna SAHH iz banane može da veže IgE iz seruma osoba alergičnih na alergene izvore koji sadrže SAHH, kao što su ljulj, kivi i lateks. IgE reaktivnost na banana SAHH je detektovana kod 3 od 3 osobe alergične na lateks, 5 od 6 osoba alergičnih na ljulj i 2 od 3 osobe alergične na kivi (slika 42).



Slika 42. Detekcija specifičnog IgE pomoću rSAHH iz banane kod osoba alergičnih na lateks (pozicije 1 - 3), ljulj (pozicije 4 - 9) i kivi (pozicije (10 - 12); C1 - serum osobe alergične na grinje; C2 - kontrola sekundarnih antitela.

5. DISKUSIJA

Banana je prepoznata kao izvor nutritivnih alergena koja može izazvati ozbiljnu alergijsku reakciju kao što je anafilaksija. Kako bi se ispitao alergeni potencijal banane bilo je neophodno napraviti sirovi ekstrakt banane po opisanom protokolu (89, 119, 122). Ukupna koncentracija proteina u sirovom ekstraktu izmjerena Bradford-ovom metodom je bila 0,95 mg/mL (198), što je u skladu sa literaturnim podacima (119,122). 2D mapiranjem IgE reaktivnih proteina banane i njihovom analizom prvo korišćenjem MALDI TOF a zatim pomoću MASCOT programa (119) pored šest već registrovanih alergena banane prepoznati su dodatni IgE reaktivni proteini za koje nema literaturnih podataka kao o alergenima iz banane. Proteini koji su pokazali IgE reaktivnost se nalaze u opsegu masa 21 - 95 kDa. Tehnikom masenog otiska prsta, između ostalih, identifikovane su katalaza i SAHH kao IgE reaktivni proteini. Katalaza je okarakterisana, a IgE reaktivnost dokazana imunoblot analizom sa serumima pacijenata alergičnih na bananu (119). U literaturi je zabeležena IgE reaktivnost za SAHH iz krompira (*Solanum tuberosum*) (130) i platana (*Platanus acerifolia*) (120). Kako bi se ispitao alergeni potencijal SAHH iz banane, bilo ga je potrebno izolovati i prečistiti, a zatim proveriti njegovu IgE reaktivnost u *in vitro* esejima kao što su imunoblot i dot blot. S obzirom da pulpa banane sadrži male količine ovog proteina u složenom polisaharidnom matriksu (100, 199, 200), izolovanje i prečišćavanje se pokazalo kao veliki izazov. Iz sirovog ekstrakta banane su pomoću PVPP uklonjena polifenolna jedinjenja pa je dodatkom amonijum-sulfata 20 – 70% dobijen koncentrovan ekstrakt banane iz koga je kroz tri koraka prečišćavanja u nedenedurirajućim uslovima rađeno izolovanje SAHH. SDS PAGE nakon prečišćavanja je pokazala prisustvo dodatnih traka na 55 kDa i 60 kDa pored trake od 53 kDa koja odgovara SAHH. Masenom spektrometrijom je utvrđeno da traka na 60 kDa odgovara D-glukozidazi, a traka na 55 kDa UTP-glukozo-1-fosfat uridiltransferazi i serin proteazi. Zbog bliskih molekulskih masa i *pI* vrednosti nije bilo moguće izdvojiti nSAHH korišćenim protokolima prečišćavanja. Dodatna otežavajuća okolnost je niska zastupljenost SAHH u banani tako da je prinos nakon prečišćavanja iznosio 7 µg po gramu očišćene banane. Prečišćen nSAHH je zadržao nativnu strukturu što je potvrđeno enzimskim esejem. Imunoreaktivnost nSAHH je potvrđena u imunoblot reakciji sa pulom seruma pacijenata alergičnih na bananu.

Imajući u vidu teškoće pri izolovanju nSAHH iz banane kao i nizak prinos, u cilju detaljnije karakterizacije SAHH i ispitivanja imunoloških osobina proizveden je rekombinantni homolog prirodne SAHH. Glavna prednost korišćenja rekombinantnih proteina u odnosu na proteine izolovane iz prirodnih je njihova dostupnost i konzistencija svake nove šarže. Selekcija odgovarajućeg domaćina za ekspresiju ima odlučujući uticaj na krajnji ishod i prinos ekspresije (169). Za odabir najpogodnijeg ekspresionog sistema testirali smo tri soja *E.coli*: BL21(DE3), Rosetta™(DE3), i Shuffle® T7. Odabir ova tri soja je izvršen na osnovu njihovih karakteristika i potencijala za proizvodnju različitih rekombinantnih proteina a što je opisano u mnogobrojnim radovima (173, 201-204). Na osnovu naših rezultata BL21(DE3) se izdvojio kao najbolji ekspresioni sistem za produkciju rSAHH po svim kriterijumima. Dobijen je najveći prinos, izmjerena je najveća enzimska aktivnost a vreme ekspresije je kraće u odnosu na ostale testirane sojeve. Uslovi gajenja utiču na metabolizam domaćina pa se njihovim pažljivim podešavanjem može uticati na prinos, čistoću i ukupni kvalitet rekombinantnog proteina. Hiperprodukcija rekombinantnog proteina u *E. coli* često dovodi do stvaranja nerastvornih i neaktivnih agregata proteina - inkluzionih tela. Izolovanje željenog proteina u aktivnoj formi iz inkluzionih tela je veliki i zametan proces koji se sastoji iz više faza a krajnji rezultat je neizvestan (169). Iz tog

razloga je poželjnije optimizovati uslove, tako da je formiranje inkluzionih tela smanjeno na minimum. Iz literaturnih podataka koji se odnose na proizvodnju rekombinantnih proteina u različitim *E. coli* ekspresionim sistemima, vidi se da je najveći prinos željenog rekombinantnog proteina postignut kada je ekspresija indukovana 0,1 – 0,5 mM IPTG, u temperaturnom opsegu 15 - 25°C i vremenom inkubacije u trajanju 16 -20 sati (166, 169, 205-206). Podešavanjem uslova tako da je ekspresija indukovana 0,5 mM IPTG, sa temperaturom inkubacije 20°C i dužinom ekspresije između 16 i 20 h, duplirali smo prinos rSAHH na 10 mg iz 1L ćelijske kulture. Uslovi izvan opsega koji su navedeni mogu negativno uticati na metabolizam i rast ćelija, njihovu vijabilnost i mogu favorizovati formiranje inkluzionih tela čime se smanjuje prinos željenog proteina (169, 170). rSAHH je prečišćen metal-afinitetnom hromatografijom u jednom koraku. Nativna forma rekombinantnog enzima je pokazana merenjem enzimske aktivnosti (61.97 IU/mg).

Rezultati koje smo dobili u našem radu pokazuju da je rSAHH biološki aktivan kao monomer. Iako je sekvenca SAHH visoko konzervirana kod različitih organizama, njegova kvaternerna struktura varira između različitih vrsta. Opisane su monomerna (166), dimerna (207), tetramerna (125,171,205,208–212) i heksamerna struktura (213). Očuvanost strukture rSAHH i prisustvo 6His taga je pokazano Western blot analizom. Gel filtracija nije samo pružila informacije o molekularnoj masi i kvatenernoj strukturi rSAHH već je indirektno potvrdila integritet 6His taga u okviru rSAHH: razlika između molekularne mase određene gel filtracijom i teorijski izračunate molekularne mase pomoću ExPASy ProtParam tool programa odgovara molekularnoj masi 6His taga (0,8 kDa). Pravilan izbor afinitetnog taga je bitan zbog prečišćavanja proteina, a može i da utiče na biološku aktivnost rekombinantnog proteina. U radovima koji opisuju proizvodnju rekombinantne SAHH iz *Cryptosporidium parvum* (208) i *Leishmania donovani* (210), uočeni su potencijalni problemi u aktivnosti enzima kada su korišćeni veliki afinitetni tagovi – maltoza vezujući protein i kalmodulin vezujući peptid, redom. Inaktivacija enzimske aktivnosti SAHH ovim tagovima može biti posledica blokiranja aktivnog mesta zbog njihove veličine, ili proteolitičkim odvajanjem taga u toku prečišćavanja (214). 6His tag koji smo koristili u našem radu, obezbeđuje prečišćavanje proteina u jednom koraku, a veličina i neutralno naelektrisanje ne utiču na biološku aktivnost (215).

Rezultati funkcionalne karakterizacije su pokazali da je rSAHH mezofilni enzim sa temperaturnim optimumom na 37°C. Optimalna pH za hidrolitičku aktivnost rSAHH je 5,5. Enzim zadržava hidrolitičku aktivnost u širokom opsegu pH vrednosti, a dodatkom 15% glicerola može se čuvati na -20°C do 8 meseci bez bitnog gubitka biološke aktivnosti. Kinetički parametri SAHH variraju značajno u zavisnosti od porekla enzima, a svi naši rezultati se uklapaju u literaturne podatke. Značajne varijacije primećene kod kinetičkih parametara između SAHH različitog porekla su posledica varijacija u kvatenernoj strukturi kao i sadržaja NAD⁺.

CD spektar rSAHH meren u dalekoj UV oblasti je karakterističan za proteine koji sadrže α -helikse, sa minimumom na oko 206 nm i maksimumom na 192 nm (178).

Imunoreaktivnost rSAHH je potvrđena pojavom trake na 53 kDa u imunoblotu sa pulom seruma pacijenata alergičnih na bananu. Deset od dvanaest pacijenata (83,3%) su pokazali IgE reaktivnost na rSAHH kada je rađen imunoblot i dot blot sa pojedinačnim serumima.

Pacijenti iz naših istraživanja su pored alergije na bananu prijavili i sezonske inhalatorne alergije, pa je istražena mogućnost da SAHH može biti uzrok ukrštene reaktivnosti. *In silico* analizom utvrđena je visoka homologija SAHH sa drugim biljnim izvorima: krompir, platan i žuta lupina (≥ 90 %) i kod svih je identifikovano 5 visoko konzerviranih linearnih B-ćelijskih epitopa

koji su izloženi na površini SAHH. Dva su razloga zašto je SAHH iz žute lupine (*Lupinus luteus*) uključen u ovu analizu iako njegov alergeni potencijal još uvek nije potvrđen: SAHH iz žute lupine je strukturni prototip biljne SAHH, i dobijaju se podaci o bezbednosti hrane obrzirom da raste popularnost sirovog semena *Lupinus albus*, *Lupinus luteus* i *Lupinus angustifolius* kao alternativnog izvora proteina u Evropi, SAD, Australiji i Novom Zelandu kod osoba alergičnih na pšenicu i osoba sa celijakijom pošto lupina ne sadrži gluten ([173](#), [174](#)).

Podaci Evropske Akademije za Alergologiju i Kliničku Imunologiju (EAACI) pokazuju da se 60% alergija na hranu podudara sa inhalatornim alergijama ([88](#)), ([216](#)). Ova korelacija je povezana sa kosenzitivacijom i ukrštenom reaktivnošću. Kod ukrštene reaktivnosti jedan IgE molekul se vezuje za nekoliko alergena koji poseduju slične strukturne osobine a kod kosenzitivacije postoji istovremeno prisustvo različitih IgE molekula koji se vezuju za alergene za koje nije neophodno da imaju velike sličnosti u strukturi ([217](#)).

Panalergeni su proteini uključeni u osnovne biološke procese, široko su rasprostranjeni i imaju konzervirane sekvence i strukture ([131](#)). Ovi proteini doprinose nastanku brojnih ukrštenih reakcija, čak i kod filogenetski udaljenih i nesrodnih organizama ([131](#)). Identifikacija panalergena je važna za unapređenje dijagnostike razdvojene na komponente (CRD). Posebno je veliki značaj ukrštene reaktivnosti kada se uzmu u obzir novootkriveni alergeni. Kao odgovor na sve veću potražnju za proteinima u ljudskoj ishrani, razmatraju se alternativni izvori proteina kao što su biljke i nekonvencionalne opcije kao što su alge, insekti i meso proizvedeno u laboratoriji ([218](#)). LC-MS/MS, i *in silico* analizom proteoma algi i insekata pokazano je da sadrže panalergene koji imaju značajnu homologiju sekvencija sa već poznatim alergenima ([218,219](#)). Ovo ukazuje na značaj identifikovanja novih panalergena i kreiranje baze podataka kako bi se olakšalo prepoznavanje alergena iz novih izvora hrane.

Bitno je naglasiti i važnost zajedničkih B-ćelijskih i T-ćelijskih epitopa ([220,221](#)). Pokazano je da je homologija sekvenci između SAHH koje smo poredili veća od 92% a *in silico* analizom je potvrđeno prisustvo pet visoko konzerviranih linearnih B-ćelijskih epitopa. Identifikacijom uobičajenih T-ćelijskih epitopa kod panalergena, CRD može pružiti uvid u obrasce unakrsne reaktivnosti i poboljšati preciznost dijagnostike alergija ([222](#)). Preovlađujući uzrok i mehanizam T-ćelijske unakrsne reaktivnosti često proizilazi iz sličnosti sekvenci T-ćelijskih epitopa koji učestvuju u ukrštenoj reaktivnosti pronađenih kod blisko povezanih alergeni izvora ([223](#)). Prisustvo unakrsno reaktivnih epitopa u preparatima alergena koji se koriste za imunoterapiju alergija je ključno za bezbednost i efikasnost lečenja kao i za postizanje desenzitizacije i kliničke tolerancije što je cilj terapije ([224](#)). Skorašnje studije su pokazale da su osobe koje su podvrgnute sublingvalnoj imunoterapiji na trave pokazale značajnu toleranciju prema biljnoj hrani ([220](#)). Kontrola nad unakrsno reaktivnim epitopima u imunoterapiji alergije na hranu može pomoći u desenzibilizaciji na više namirnica, koristeći dobro okarakterisane T-ćelijske epitope ([224](#)). Trenutni napredak u imunoinformatičkim alatima nudi potencijalna rešenja pomažući u identifikaciji specifičnih zajedničkih unakrsnih peptidnih sekvenci koje pokrivaju niz različitih izvora alergena, čime se rešava izazov dizajniranja jednog kandidata zasnovanog na peptidnoj ili proteinskoj sekvenci ([224](#)).

Pristupom *in silico*, identifikovali smo T-ćelijske epitope SAHH iz banane, kivija, ljulja i lateksa koji se prikazuju u kontekstu MHC klase II. Potvrđeno je prisustvo četiri identična T-ćelijska epitopa banane sa T-ćelijskim epitopima kivija (328, 278, 142 i 341) i ljulja (278, 142, 96 i 341) i dva identična T-ćelijska epitopa sa T-ćelijskim epitopima lateksa (278 i 341). Ova otkrića ukazuju da peptidi 278 i 341 sami ili u kombinaciji sa peptidima 328, 96 i 142 mogu biti

potencijalni kandidati za alergen-specifičnu imunoterapiju (ASIT), koji pružaju mogućnost prevazilaženja ili ublažavanja alergije na pomenute unakrsno reaktivne alergene. Korišćenje bioinformatičkih i seroloških tehnika je važan pristup za potvrđivanje IgE reaktivnih epitopa alergena (225). Imunoblot analiza je potvrdila specifičnu reaktivnost SAHH iz banane sa serumima pacijenata alergičnih na kivi, ljulj i lateks. Ovo zapažanje ukazuje na moguću ukrštenu reaktivnost između ovih alergena i naglašava važnost istraživanja zajedničkih epitopa i alergenijskih komponenti među različitim alergenim izvorima. Takva unakrsna reaktivnost naglašava potrebu za sveobuhvatnim dijagnostičkim pristupima i terapijskim strategijama u upravljanju alergijama povezanim sa ovim različitim alergenima. Posmatranje reaktivnosti SAHH kod više alergena naglašava složenost alergijskog odgovora i potrebu za sveobuhvatnim dijagnostičkim i terapijskim pristupom koji uzima u obzir i IgE posredovane i T-ćelijama posredovane mehanizme ukrštene reaktivnosti.

B ćelijski epitopi se intenzivno istražuju za razvoj terapijskih vakcina za ASIT pošto korišćenje intaktnih nutritivnih alergena u preventivi ili u terapijske svrhe nosi rizik od anafilaksije. Ovakav pristup je trenutno odobren samo u tretmanu inhalatornih alergena (152). Upotreba ukrštene reaktivnosti B-ćelijskih epitopa je potencijalno nov način terapije alergija. Obećavajući rezultati su nedavno prikazani za tretman alergije na mleko korišćenjem peptida iz soje koji imaju ukrštenu reaktivne epitope sa kazeinom (192). Ova saznanja mogu imati višestruku primenu u dijagnostici i lečenju alergija na hranu, bezbednosti namirnica, a otvara se i mogućnosti daljih istraživanja na polju molekularne alergologije.

6. ZAKLJUČAK

U izvedenim eksperimentima je pokazano da i prirodni i rekombinatni SAHH pokazuju IgE reaktivnost sa serumima pacijenata alergičnih na bananu.

Imunoblotom sa serumima pacijenata alergičnih na kivi, ljulj i lateks je utvrđeno da SAHH učestvuje u ukrštenoj reaktivnosti.

In silico analizom je potvrđeno prisustvo pet visoko konzerviranih linearnih B ćelijskih epitopa, i utvrđeno je postojanje T-ćelijskih epitopa.

Može se smatrati da je SAHH novi biljni panalergen odgovoran za mnoge ukrštene reakcije čak i između nesrodnih polena i biljnih izvora nutritivnih alergena.

Potvrđeni B-ćelijski epitopi i T-ćelijski epitopi mogu imati značaja u razvoju „Component-resolved“ dijagnostike za preciznije utvrđivanje stvarnih i ukrštenih alergija, a bitni su i za razvoj vakcina za ASIT, jer nose manji rizik od razvoja anafilaksije.

7. MATERIJAL I METODE

7.1 Priprema alergeni ekstrakta

7.1.1 Priprema ekstrakta banane

Plod zrele banane kupljen u lokalnoj prodavnici je upotrebljen za dobijanje proteinskog ekstrakta. Banana i pufer za ekstrakciju (1% polivinilpolipirrolidon (PVPP), 0,01% NaN₃, 0,01% CaCl₂, 5 mM Na-L-askorbat, 50 mM NH₄HCO₃, pH 8.5) pomešani su u odnosu 1:2 m/V. Nakon homogenizacije u blenderu 1 min, mešanja na magnetnoj mešalici 2h, 4°C, centrifugiranja 30 min na 6000 x g, dobijen je sirovi ekstrakt koji je do korišćenja čuvan na -20°C.

Pufer za ekstrakciju (50 mM NH₄HCO₃, 1% PVPP, 0,01% NaN₃, 0,01% CaCl₂, 5 mM Na-L-askorbat, pH 8.5)

NH ₄ HCO ₃	2,37 g
PVPP	6,00 g
NaN ₃	0,60 g
CaCl ₂	0,60 g
Na-L-askorbat	0,60 g
dH ₂ O	do 600mL

7.1.2 Priprema ekstrakta kivija

Proteinski ekstrakt kivija pripremljen je korišćenjem ploda kivija (*Actinidia deliciosa*) koji je kupljen u lokalnoj prodavnici. Odnos polaznog materijala i ekstrakcionog pufera (1% polivinilpolipirrolidon (PVPP), 0,01% NaN₃, 0,01% CaCl₂, 5 mM Na-L-askorbat, 50 mM NH₄HCO₃, pH 8,0) je 1:2 m/V. Homogenizacija je izvedena u blenderu u trajanju od 1min. Homogenat je mešan 2 h na magnetnoj mešalici na 4°C, a zatim centrifugiran 30min na 6000 x g. Dobijeni supernatanti su dalje korišćeni kao sirovi ekstrakti a čuvani su na -20°C.

7.1.3 Priprema ekstrakta polena ljlja

Za pripremu ekstrakta korišćen je polen ljlja (*Lolium perenne*) dobijen od Instituta za virologiju, vaccine i serume, Torlak. Polen je ekstrahovan rastvorom PBS-a u odnosu 1:10 (m/V) preko noći na 4°C uz konstantno mešanje. Suspenzija je centrifugirana (5 min, 10000 rpm), supernatant je čuvan na -20°C do upotrebe.

7.1.4 Rastvor lateksa

Ekstrakt lateksa (*Hevea brasiliensis*) dobijen je od Instituta za virologiju, vakcine i serume, Torlak. Rastvor lateksa je dijaliziran naspram 20 mM NH_4HCO_3 pH 7.8 tokom 2 h uz mešanje nakon čega su uzorci liofilizovani i čuvani do upotrebe.

7.2 Koncentrovanje proteina

U cilju obogaćivanja proteinske frakcije koja sadrži SAHH u ekstrakt banane je dodavan amonijum-sulfat ili su uzorci liofilizovani.

7.2.1 Koncentrovanje proteina precipitacijom amonijum-sulfatom

Proteini su iz ekstrakta koncentrovani precipitacijom pomoću amonijum-sulfata. Prvo je postignuto zasićenje od 0-20%. Kristali amonijum-sulfata su sprášeni u avanu i uz mešanje dodavani u ekstrakt banane do postizanja zasićenja 20%. Ekstrakt je ostavljen na 4°C preko noći, a zatim centrifugiran 30 min na 6000 rpm. Talog je odbačen a u supernatant je dodavan sprášeni amonijum-sulfat do zasićenja od 70%. Nakon centrifugiranja 30 min na 6000 rpm talog je rastvoren u minimalnoj količini 20mM NH_4HCO_3 , pH 8,5. Ovom metodom su pored koncentrovanja proteina, zasićenjem 20-70% uklonjene i interferirajuće supstance kao što su polifenoli.

Količina dodatog amonijum-sulfata za postizanje željenog zasićenja na 25°C računa se po formuli

$$g = \frac{536(x - x_0)}{100 - 0,27x}$$

gde je x - % finalnog zasićenja, x_0 - %početnog zasićenja, g – grami amonijum-sulfata za 1 L rastvora.

Tabela 12. Količina amonijum-sulfata potrebna za pravljenje zasićenja

Početni % zasićenja	Finalno zasićenje																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	Količina amonijum sulfata (gr) koju treba dodati za litar rastvora na 20°C																
0	113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
5	85	115	146	179	212	246	282	319	358	397	439	481	526	572	621	671	723
10	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
15	28	58	88	119	151	185	219	255	293	331	371	412	456	501	548	596	647
20	0	29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
25		0	29	60	91	123	157	191	228	265	304	344	386	429	475	522	571
30			0	30	61	92	125	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
35				0	30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
40					0	31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
45						0	31	64	98	132	169	206	245	286	329	373	419
50							0	32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
55								0	33	66	101	138	175	215	256	298	343
60									0	33	67	103	140	179	219	261	305
65										0	34	69	105	143	183	224	267
70											0	34	70	107	146	186	228
75												0	35	72	110	149	190
80													0	36	73	112	152
85														0	37	75	114
90															0	37	76
95																0	38

7.2.2 Koncentrovanje proteina liofilizacijom

Nakon dijalize naspram 20 mM amonijum-bikarbonatnog pufera pH 8,5, tokom 2 h uz mešanje na magnetnoj mešalici, uzorci su zamrznuti na -20°C u u ependorf tubama. Liofilizacija je rađena do suva, a pritisak u liofilizatoru je bio 0,11 mbar.

Rastvor 20 mM amonijum-bikarbonata pH 8,5

Amonijum-bikarbonat	1,58 g
dH ₂ O	do 1000 mL

7.3 Prečišćavanje prirodnog SAHH

Ekstrakt banane dobijen na način opisan u odeljku 7.1.1 je bio polazni materijal za izolovanje i prečišćavanje prirodnog SAHH. Prečišćavanje SAHH iz banane izvedeno je u dva

hromatografska koraka koja su opisana u daljem tekstu, a to su: jonoizmenjivačka hromatografija na Hi Trap SP FF koloni ($V=1\text{mL}$, GE Healthcare, Upsala, Švedska) i jonoizmenjivačka hromatografija na Hi Trap QFF koloni ($V=1\text{mL}$, GE Healthcare, Upsala, Švedska).

7.3.1 Jonoizmenjivačka hromatografija na Hi Trap SP FF koloni

Uzorak koji je nanešen na jonoizmenjivačku hromatografiju na Hi Trap SP FF koloni (GE Healthcare, Upsala, Švedska) je nakon rasoljavanja koncentrovan liofilizacijom. Liofilizovani uzorak je hidratisan u 100 mM natrijum acetatnom puferu pH 5,0 i dijalizovan naspram istog pufera preko noći. Pred samo nanošenje na kolonu uzorak je centrifugiran 10 min na 13400 rpm.

Radni puferi:

Pufer A (100 mM natrijum acetat pH 5.0)

Natrijum acetat	6,256 g
Sirćetna kiselina	0,0237 g
dH ₂ O	1000 mL

Pufer B (100 mM natrijum acetat, 1 M NaCl, pH 5.0)

Natrijum acetat	6,256 g
Sirćetna kiselina	0,0237 g
NaCl	58,4 g
dH ₂ O	1000 mL

Na sistem „Äkta purifier“ (GE Healthcare, Upsala, Švedska) je postavljena kolona. Nakon pripreme svakog od korišćenih rastvora usledilo je ceđenje kroz filter sa veličinom pora od 0,22 μm i dezaeracija na radnoj temperaturi (sobna temperatura). Zapremina kolone je iznosila 1 mL, gradijent elucije 15 kolonskih zapremina 0-100% pufera B a brzina protoka kroz kolonu 1 mL/min. Na kolonu je nanošeno po 1 mL pripremljenog uzorka.

7.3.2 Jonoizmenjivačka hromatografija na Hi Trap QFF koloni

Pul frakcija koje sadrže protein od interesa nakon SPFF hromatografije je dijalizovan naspram 20 mM TRIS pufera pH 7,5 preko noći. Pred samo nanošenje na Hi Trap QFF kolonu uzorak je centrifugiran 10 min na 13400 rpm. Kolona je prikačena na sistem za prečišćavanje proteina „Äkta purifier“ (GE Healthcare, Upsala, Švedska). Nakon pripreme svakog od korišćenih rastvora usledilo je ceđenje kroz filter sa veličinom pora od 0,22 μm i dezaeracija na radnoj temperaturi (sobna temperatura). Zapremina kolone je iznosila 1 mL, gradijent elucije 15 kolonskih zapremina 0-100% pufera B a brzina protoka kroz kolonu 1 mL/min. Na kolonu je

nanošeno po 1 mL pripremljenog uzorka. Po završetku jonoizmenjivačke hromatografije frakcije sa proteinom od interesa su pulovane i koncentrovane liofilizacijom.

Radni puferi:

Pufer A (20 mM TRIS pH 7,5)

TRIS	2,5 g
dH ₂ O	1000 mL

Pufer B (20 mM TRIS, 0,5 M NaCl, pH 7,5)

TRIS	2,5 g
NaCl	29,03 g
dH ₂ O	1000 mL

7.4 Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina je određivana *Bradford*-ovom metodom u uzorcima u kojima se nalazi smeša različitih proteina, a u uzorcima u kojima se nalazi prečišćen protein rađeno je spektrofotometrijsko određivanje merenjem apsorbance na 280 nm (A₂₈₀ nm), uz korišćenje specifičnog ekstinkcionog koeficijenta odedenog na osnovu aminokiselinske sekvence proteina (<http://web.expasy.org/protparam>).

7.4.1 Određivanje koncentracije proteina *Bradford*-ovim reagensom

U kiseloj sredini boja *Coomassie Brilliant Blue G250* se nekovalentno vezuje za karboksilne grupe proteina pri čemu nastaje stabilni oblik molekula boje uz promenu apsorpcionog maksimuma sa 465 nm na 595 nm i promene boje rastvora od braon do plave. Intenzitet boje je proporcionalan koncentraciji proteina. *Bradford*-ov metod (198) se koristi za određivanje koncentracije proteina u maloj količini uzorka. Za rad su korišćene mikrotitar pločice, a za očitavanje apsorbance ELISA čitač. Apsorbanca je merena na 595 nm.

Standardna prava je konstruisana korišćenjem niza razblaženja BSA u 0,15M NaCl. Koncentracije proteina korišćene za konstruisanje standardne prave i količina uzorka za makro i mikro metodu, prikazane su tabelarno. Apsorbanca je očitavana nakon 15 minuta inkubacije.

Nakon rastvaranja boje u 95% etanolu, dodata je ortofosforna kiselina, a odgovarajuća zapremina je postignuta dodavanjem destilovane vode. Na ovaj način je dobijen 5 x koncentrovan rastvor, koji je pre upotrebe razblažen i proceden nekoliko puta kroz filter papir koji je nabran

kako bi mu se povećala površina. Radni rastvor *Bradford*-ovog reagensa je braon boje. Goveđi serum albumin (BSA) je korišćen za izradu standardne prave.

Bradford-ov reagens

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

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

BSA	10 mg
0,15 M NaCl	do 10 mL

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

BSA	1 mg
0,15 M NaCl	do 10 mL

U tabelama 13 i 14 su prikazane količine osnovnog rastvora BSA i vode potrebne za pripremu finalnih koncentracija BSA za izradu standardne prave za makro i mikro *Bradford*-ovu metodu.

Tabela 13. Rastvori potrebni za izradu standardne prave makro metodom po *Bradford*-u

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

Tabela 14. Rastvori potrebni za izradu standardne prave mikro metodom po *Bradford*-u

Osnovni rastvor BSA za makro <i>Bradford</i> -ovu metodu [μL]	dH_2O [μL]	Finalna koncentracija BSA [$\text{mg}/\mu\text{L}$]
100	0	0,100
75	25	0,075
50	50	0,050
25	75	0,025
10	100	0,010

U tabelama 15 i 16 prikazane su potrebne količine standardnih rastvora BSA navedenih finalnih koncentracija za izradu standardne prave za makro i mikro metodu.

Tabela 15. Standardna prava za makro *Bradford*-ovu metodu

Finalna koncentracija BSA [$\text{mg}/\mu\text{L}$]	Zapremina standarda BSA za makro <i>Bradford</i> -ovu metodu [μL]	<i>Bradford</i> -ov reagens [μL]
1,00	5	200
0,75	5	200
0,50	5	200
0,25	5	200
0,10	5	200

Tabela 16. Standardna prava za mikro *Bradford*-ovu metodu

Finalna koncentracija BSA [$\text{mg}/\mu\text{L}$]	Zapremina standarda BSA za mikro <i>Bradford</i> -ovu metodu [μL]	<i>Bradford</i> -ov reagens [μL]
0,100	20	200
0,075	20	200
0,050	20	200
0,025	20	200
0,100	20	200

7.4.2 Određivanje koncentracije proteina spektrofotometrijski merenjem $A_{280\text{nm}}$

Na osnovu formule $A_{280\text{ nm}} = a \times b \times c$, izračunata je koncentracija proteina, pri čemu je:

$A_{280\text{ nm}}$ - izmerena apsorbanca na 280 nm talasne dužine

a - ekstinkcioni koeficijent ($\text{mL}/(\text{mg} \times \text{cm})$)

b - dužina optičkog puta

c - koncentracija proteina u uzorku (mg/mL)

Ekstinkcioni koeficijent proteina je dobijen korišćenjem poznate aminokiselinske sekvence i <http://web.expasy.org/protparam> programa.

Tabela 17. Ekstinkcioni koeficijenti SAHH

Alergen banane	Ekstinkcioni koeficijent [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]	Ekstinkcioni koeficijent [$\text{mL g}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
SAHH	60110 za oksidovan cistein (-S-S-) 59360 za redukovan cistein (-SH)	1.133 za oksidovan cistein (-S-S-) 1.119 redukovan cistein (-SH)

7.4.3 Određivanje koncentracije proteina korišćenjem eseja sa bicinhoninskom kiselinom (BCA)

Proteini redukuju Cu (II) u Cu (I) u alkalnoj sredini proporcionalno koncentraciji. Bicinoninska kiselina je visoko specifični hromogeni reagens za Cu (I) sa kojim pravi kompleks čiji je apsorpcioni maksimum na 562 nm. Izmerena apsorbanca je direktno proporcionalna koncentraciji proteina. Rastvor BSA koncentracije 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ je razblažen destilovanom vodom do finalnih koncentracija 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ za izradu standardne prave. Radni reagens se priprema dodavanjem 1 mL 4% rastvora bakar-sulfat pentahidrata u 49 mL rastvora bicinhoninske kiseline. U mikrotitarsku ploču odmereno je 200 μL radnog reagensa, dodato 25 μL standarda, odnosno 25 μL uzorka, inkubirano 60 min na 37°C, nakon čega je merena apsorbanca na 562 nm i konstruisana standardna prava. Svi standardni rastvori kao i uzorci se rade u duplikatu.

7.5 Elektroforetske tehnike

7.5.1 Agarozna elektroforeza

Sva elektroforetska razdvajanja su rađena na Peqlab (Biotechnologie GmbH, Erlangen, Nemačka) horizontalnom sistemu za elektroforezu prema uputstvima proizvođača. Za elektroforezu

je korišćena peqGREEN boja (Peqlab) i 1 kb DNK markeri (Thermo Scientific) prema uputstvima proizvođača. Rastvori potrebni za izvođenje agarozne elektroforeze:

TAE pufer (50 x), pH 8,0

Tris	48,4 g
Glacijalna sirćetna kiselina	11,42 mL
0.5 M EDTA	20 mL
dH ₂ O	do 200 mL

Za rad se koristi TAE pufer 1 x koji se neposredno pre upotrebe pravi iz štoka.

1 % agaroz

Agaroz	1 g
TAE pufer (1x)	do 100 mL

Postupak:

Rastopljena 1% agaroz sa dodatom peqGREEN bojom je razlivena na ploču za elektroforezu, u koju su, prethodno, ubačeni češljevi za bunare i ostavljena je da očvrstne. Nakon formiranja gela, izvađeni su češljevi, pa je ploča sa gelom stavljena u kadu za elektroforezu i prelivena TAE puferom (1X). Uzorci su pomešani sa peqGREEN bojom u odnosu 5:1 (v:v) i naneti na gel. Elektroforeza je rađena na 80 V, oko 60 minuta, dok front boje nije stigao na oko 1 cm od donje ivice gela. Nakon završetka elektroforeze, gel je analiziran korišćenjem UV svetla.

7.5.2 Natrijum dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS PAGE)

Originalni Laemli-jev protokol je korišćen za razdvajanje proteina PAG elektroforezom (226). Za elektroforetska razdvajanja proteina korišćena je Hoeffer SCI aparatura prema uputstvu proizvođača. U radu su korišćeni molekularni markeri masa od 14.4 to 116 kDa (ThermoFischer, SAD). Rađena je SDS PAG elektroforeza u redukujućim uslovima.

Rastvori korišćeni za SDS PAGE:

1. 30% rastvor akrilamida

Akrilamid	58,4 g
Bisakrilamid	1,6 g
dH ₂ O	do 200 mL

2. Pufer za gel za razdvajanje uzoraka (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)

Tris	18,15 g
dH ₂ O	do 100 mL

3. Pufer za gel za koncentrovanje uzoraka (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)

Tris	3 g
dH ₂ O	do 50 mL

4. Rastvor SDS-a (10%)

SDS	1 g
dH ₂ O	do 10 mL

5. Rastvor APS-a (10%)

APS	0,1 g
dH ₂ O	do 10 mL

6. n-butanol zasićen vodom (pufer za nadslojavanje gela za razdvajanje uzoraka)

n-butanol	150 mL
dH ₂ O	50 mL

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

Tris	3 g
Glicin	14,4 g
SDS	1 g
dH ₂ O	do 1000 mL

8. Pufer za pripremu uzoraka (5 x PUZ) (60 mM Tris, pH 6,8, 25% glicerol, 2% SDS, 14,4 mM 2-merkaptotanol, 0,1% bromfenol plavo)

0.5 M Tris, pH6.8	1,2 mL
98% glicerol	5 mL
10% SDS	2 mL
2-merkaptotanol	0,5 mL
1% bromfenol plavo	1 mL
dH ₂ O	do 10 mL

9. CBB boja za elektroforezu (0,1% CBB, 50 %-tni metanol, 10%-tna sirćetna kiselina)

CBB G ili R 250	0,1 g
Metanol	50 mL
Sirćetna kiselina	10 mL
dH ₂ O	do 100 mL

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

Sirćetna kiselina	7 mL
dH ₂ O	do 100 mL

Tabela 18. Rastvori potrebni za pripremu poliakrilamidnog gela za razdvajanje (10mL)

Rastvor	<i>Finalna koncentracija gela z arazdvajanje %</i>								
	8	9	10	11	12	13	14	15	16
30% rastvor akrilamida [mL]	2,67	3,0	3,33	3,67	4,0	4,33	4,67	5,0	5,33
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 [mL]	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
dH ₂ O [mL]	4,67	4,33	4,0	3,67	3,33	3,0	2,67	2,33	2,0
10% SDS [μL]	100	100	100	100	100	100	100	100	100
10% APS [μL]	75	75	75	75	75	75	75	75	75
TEMED [μL]	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Tabela 19. Rastvori potrebni za pripremu poliakrilamidnog gela za koncentrovanje:

Rastvor	<i>Finalna koncentracija gela za koncentrovanje</i>								
	10	9	8	7	6	5	4	3	
30% rastvor akrilamida [mL]	1,33	1,20	1,06	0,93	0,80	0,67	0,53	0,40	
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 [mL]	2,50	2,25	2,00	1,75	1,50	1,25	1,00	0,75	
dH ₂ O [mL]	6,0	5,4	4,8	4,2	3,6	3,0	2,4	1,8	
10% SDS [μL]	100	90	80	70	60	50	40	30	
10% APS [μL]	50	45	40	35	30	25	20	15	
TEMED [μL]	2	2	2	2	2	2	2	2	

Staklene ploče dimenzija 140 x 80 x 1 mm su postavljene na odgovarajuće nosače i nalivene gelom za razdvajanje, koji je nadslojen zasićenim rastvorom n-butanola. Ploče su ostavljene na sobnoj temperaturi da gel ispolimerizuje, nakon čega je rastvor n-butanola ispran vodom. Postavljen je češalj za elektroforezu (d - 1 mm) i dodat rastvor za koncentrovanje uzorka. Po završetku polimerizacije, izvađen je češalj, naneti su prethodno pripremljeni uzorci pa je sistem za elektroforezu uronjen u kadu sa puferom. Uzorci i pufer za pripremu uzoraka su ispipetirani u ependorf tube i zagrevani na 95°C 5min, nakon čega su naneti na gel (do 30 μL). Elektroforeza je tekla na 80 V do ulaska brom fenol plavog (BFP) u gel za razdvajanje, a zatim je napon povećan na 250 V i elektroforeza je tekla dok brom fenol plavo ne stigne do 1 cm od kraja gela. Na kraju elektroforeze, sistem je isključen, rasklopljen i gel pažljivo prebačen u posudu. Gel je obojen dodatkom rastvora boje, tokom 15 minuta, a zatim je obezbojavan pomoću 7% sirćetne kiseline (rastvor za obezbojavanje).

7.6 Izoelektrofokusingiranje i 2D elektroforeza prečišćenih proteina

Prvi korak u izvođenju 2D elektroforeze je izoelektrofokusingiranje (IEF), a zatim prethodno opisana SDS PAGE. Za potrebe naših eksperimenata, rađena je IEF u denaturišućim uslovima. Za potrebe eksperimenta, pripremljeni su sledeći rastvori:

Gel za izoelektrofokusingiranje

30% akrilamid	3,75 mL
amfoliti	1,2 mL
dH ₂ O	9,9 mL
TEMED.	12 μL
APS	75 μL

Poliakrilamidni gel sa inkorporiranim amfolitima je naliven između ploča dimenzija 8×13 cm, debljine 0,75 mm i ostavljen da polimerizuje.

Katodni rastvor (150 mM NaOH)

NaOH	0,3 g
dH ₂ O	do 50 mL

Pre korišćenja potrebno je ohladiti do ključanja zagrejan katodni rastvor.

Anodni rastvor (75 mM H₂SO₄)

H ₂ SO ₄	0,21 g
dH ₂ O	do 50 mL

Potrebno je da se iseku papirne elektrode tako da budu iste dužine kao i gel na koji naležu. Elektrode se natapaju katodnim, odnosno anodnim rastvorom i postavljaju se paralelno. Izoelektrofokusanje je izvedeno pod uslovima navedenim u tabeli 20.

Tabela 20. Uslovi izoelektrofokusanja

Napon (V)	Vreme (min)
800	30 (u cilju predfokusiranja)
Naneto je po 30 μ L uzorka	
400	10
600	10
800	30
1000	10
1200	5

Izoelektrofokusanje se izvodi u duplikatu na sistemu koji obezbeđuje temperaturu od 4°C tokom celog postupka. Po završetku IEF, deo gela bez nanetog uzorka je iskorišćen za određivanje pH gradijenta. Nakon 5 minuta ispiranja destilovanom vodom ovaj deo gela je isečen na tračice debljine 1 cm, od katode ka anodi, a one su dalje isečene na komade $1 \times 0,5$ cm i prebačene u epruvete sa 2 mL destilovane vode koja je prethodno prokuvana. Merenjema pH vrednosti u epruvetama sa tračicama dobijen je pH gradijent koji je korišćen za određivanje pI vrednosti.

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

TCA	15 g
dH ₂ O	do 50 mL

Proteinske trake su fiksirane 1 h pomoću rastvora za fiksiranje. Gel je ispran dH₂O i ostavljen preko noći u dH₂O. Nakon toga su proteinske trake obojene po postupku opisanom u odeljku 7.5.2.

Dvodimenzionom elektroforezom se proteini u prvoj dimenziji razdvajaju izoelektrofokusanjem, a u drugoj SDS-PAG elektroforezom. Nakon izoelektrofokusanja isečena je traka debljine 1 cm tako da zahvata celokupnu dužinu od anode do katode. Destilovanom vodom se ispira traka tokom 5 minuta nakon čega je rađena ekvilibracija trake u prethodno pripremljenom puferu za ekvilibraciju. Ekvilibracija je trajala 45 minuta uz dve izmene pufera.

Pufer za ekvilibraciju (5 x)

Merkaptoetanol	10 mL
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	12,5 mL
10% SDS	46 mL
85% glicerol	20 mL
dH ₂ O	200 mL

Po završetku ekvilibracije, traka je nanešena na gel koji je pripremljen kao za klasičnu SDS-PAGE, tako što je napravljen jedan bunar čija širina odgovara dužini ekvilibrisane trake. Osim ovog, širokog bunara u koji se pozicionira ekvilibrisana traka sa prve dimenzije, prave se i dodatni, klasični bunari u koje se nanose uzorak pre izoelektrofokusanja i proteinski markeri. SDS-PAGE se dalje izvodi po opisanoj proceduri.

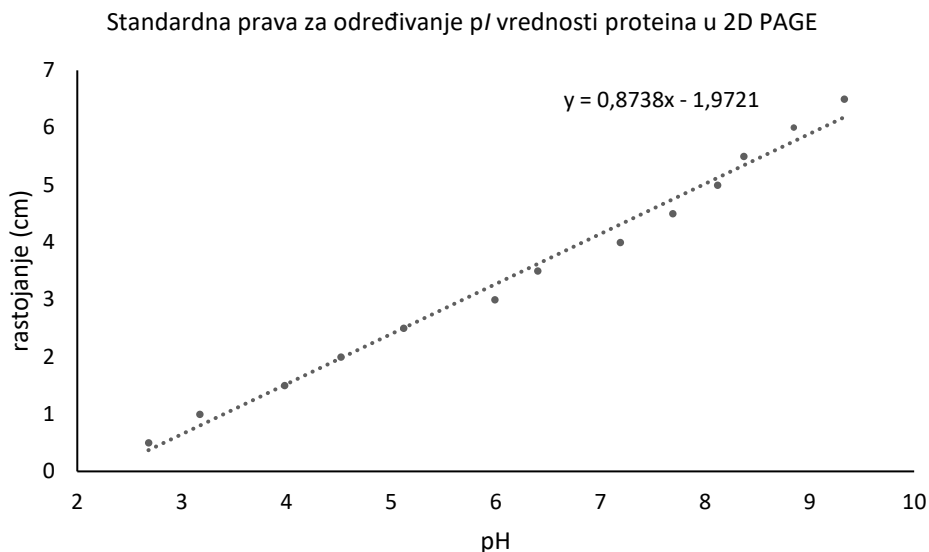
7.7 Određivanje pI rekombinantne SAHH

Posle zavešene prve dimenzije isečene tračice gela dimenzija 1 x 0,5cm su resuspendovane u vodi i izmerene su pH vrednosti. Napravljena je standardna prava na osnovu koje je izračunata pI vrednost.

Jednačina standardne prave:

$$y = 0,8738 x - 1,9721$$

Po završetku druge dimenzije izmereno je rastojanje trake koja odgovara rekombinantnoj SAHH od katode i ono je iznosilo 3,12 cm (uzete su u obzir dimenzije posle prve dimenzije i shodno tome je preračunato rastojanje).



7.8 Gel filtracija

Molekulska masa rSAHH je određena gel filtracijom na Superdex 75 PC 3.2/30 koloni (dimenzije 3,2 x 300 mm; Cv 2.4 mL; prosečna veličina čestica 13 μm ; Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska) na ÄKTA 10 HPLC sistemu (Pharmacia Biotech). Kao molekularni markeri korišćeni su: lizozim iz belanceta kokošijeg jajeta (14.3 kDa), ovalbumin (42.7 kDa), goveđi serum albumin (66 kDa) i β -glukuronidaza (290 kDa) kupljeni od Sigma Aldrich, St. Louis, SAD, i β -glukanaza iz banane (35 kDa) koja je rekombinantno proizvedena u *E. coli* u našoj laboratoriji (227). Molekularni markeri su rastvoreni u 50 mM natrijum fosfatnom puferu, koji sadrži 150 mM NaCl, pH 7,0 (elucioni pufer). Pre analize svi rastvori su dezaerisani i profiltrirani kroz 0.22 μm filter. Prečišćena rSAHH je dijalizovana naspram istog pufera na sobnoj temperaturi 30 minuta, centrifugirana 10 min na 13 400 rpm na Eppendorf miniSpin centrifugi, pa je bistar, bezbojan supernatant nanet na kolonu. Na kolonu je naneto 50 μL uzorka (12.5 μg SAHH ili 50 μg molekularnih markera). Separacija je rađena sa 3.6 mL elucionog pufera uz protok od 0,02 mL/min. Molekularni markeri su razdvojeni pojedinačno pod istim uslovima, nakon čega je napravljena kalibraciona prava. Hromatografija je praćena na 280 nm, a hromatogrami su analizirani pomoću Unicorn 5.31 softvera (Pharmacia Biotech).

7.9 Masena spektrometrija SAHH

7.9.1 Priprema SAHH uzoraka za analizu masenom spektrometrijom: tripsinska digestija proteina

Masena spektrometrija i analiza u Mascot server™ bazi podataka je korišćena za analizu fragmenata prečišćene rSAHH i nSAHH. Nakon SDS PAGE, proteinske trake obojene CBB bojom su pažljivo izdvojene iz poliakrilamidnog gela i propremljene za tripsinsku digestiju prateći protokol opisan u Shevchenko et al., 2007. Kako bi se izbegla kontaminacija keratinom potrebno je isecanje iz gela raditi čistim skalpelom uz upotrebu rukavica. Isečene trake su prebačene u mikrocentrifuške tube, pa je rađena redukcija u gelu, alkilacija i obezbojavanje. Proteinske trake su obezbojene u 100 mM amonijum bikarbonat/acetonitril rastvoru (1:1, vol/vol) i redukovane pomoću 10 mM ditionitrola (DTT) 30 min na 56°C. Nakon toga trake su alkilovane sa 55 mM jodoacetamid rastvora (Sigma-Aldrich, St. Louis, Misuri, SAD) i digestovane tripsinom (Promega V5113, Madison, Viskonsin, SAD) preko noći na 37°C (228).

7.9.2 Masena spektrometrija

Nakon tripsinske digestije uzorci su analizirani na EASY-nLC povezan sa Orbitrap Q-Exactive HF Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, Kalifornija, SAD). Pripremljeni uzorci su ubačeni u rastvor A (0,1% mravlja kiselina) na dve kolone koje se sastoje od 100 ID, predkolone od 3 cm napunjene sa Reprosil-Pur 120 C18-AQ (5 µm; Dr. Maisch) i 75 ID, 18 cm analitičke kolone napunjene sa Reprosil-Pur 120 C18-AQ (3 µm; Dr. Maisch). Peptidi su eluirani gradijentom rastvora B (95% acetonitril, 0,1% mravlja kiselina), 2% B do 34% B tokom 10 min, 34% B do 100% B tokom 8 min. MS je snimljen sa rezolucijom od 60,000 i opsegom skeniranja od 350 - 1600 m/z. MS/MS je dobijen kao prvih 12 sa rezolucijom od 30,000 i izolacionim otvorom od 1,2 m/z i dinamičkim isključenjem od 3s. Dobijeni MS/MS spektar je analiziran korišćenjem Mascot Servera™. Kriterijumi pretrage su bili 5 ppm za jone prekursora i 0,1 Da za jone fragmenta. Tip sprovedene pretrage je: MS/MS pretraga jona sa karbamidometil (cistein) fiksnom modifikacijom i oksidacijom (metionin) kao varijabilnom modifikacijom. Pretraga baza je rađena korišćenjem baze podataka za *Musa acuminata* (preuzeta 25 jula 2022 sa Uniprot.org) za koju je dodata uobičajena Repository of Adventitious Proteins (cRAP), (baza podataka za uobičajene kontaminirajuće fragmente), <http://www.thegpm.org/crap/index.html>. Masena spektrometrija je rađena na Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of South Denmark, Odense, Denmark.

7.10 CD (circular dichroism) analiza rSAHH

Za procenu sekundarne strukture prečišćenog rSAHH, sniman je CD spektar na 25°C na spektrofotometru Jasco J-815 A (Jasco, Tokio, Japan). Merenje je izvršeno u kiveti širine 0,5 mm u dalekoj UV oblasti (180 - 260 nm). Podaci su prikupljeni u intervalu od 0,1 nm pri brzini od 50 nm/min. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri merenja uz korekciju osnovne linije prema

blank uzorku. Nakon prečišćavanja, uzorak SAHH koncentracije 0,25 mg/mL je dijalizovan uz mešanje 3 h naspram 20 mM TRIS pufera napravljenog sa miliQ vodom pH 8,0 uz dodatak 5% glicerola.

7.11 Imunohemijske tehnike- Imunoblot

Prečišćeni prirodni (8,4 µg po bunaru) i rekombinantni (8 µg po bunaru) SAHH su prvo razdvojeni pomoću SDS-PAGE (226) a zatim je rađen polu-suvi transfer proteina iz gela na nitroceluloznu membranu (Serva, Hajdelberg, Nemačka). Membrana je kapilarno nakvašena prvo u vodi a zatim u puferu za blot. Gel je ispran vodom i ostavljen u puferu za blot 5 min. Sklopljen je sendvič tako što je na pozitivnu grafitnu elektrodu stavljen prvo filter papir, zatim nitrocelulozna membrana, gel i drugi filter papir. Iz sendviča je istisnut višak pufera pa je postavljena negativna grafitna elektroda. Dimenzije filter papira i gela moraju biti identične. Transfer je rađen 60 min sa jačinom struje 2 mA/cm². Transferovani proteini na membrani su provereni bojenjem sa 0,5% Ponceau-S u 5% sirćetnoj kiselini.

Puferi za elektrotransfer (25 mM Tris, 192 mM glicin, 20% metanol, pH 8,3):

TRIS	1,5 g
GLICIN	7,2 g
SDS	0,5 g
Metanol	100 mL
dH ₂ O	do 500 mL

Rastvor boje Ponceau-S

Ponceau S	0,05 g
glacijalna sirćetna kiselina	2,5 mL
dH ₂ O	do 50 mL

7.11.1 Detekcija proteina u imunoblotu (opšti protokol)

Razvijanje imunoblota je izvedeno na nitroceluloznoj membrani sa transferovanim proteinima. NC membrana je obezbojena u tTBS, 10 min, a nakon toga blokirana u 5% odmašćenom mleku (u tTBS-u), 1 h na sobnoj temperaturi uz mešanje. Nakon toga membrana je ispirana tTBS-om (3 x 10 min) i postavljena da se inkubira sa prethodno optimizovanom količinom primarnog antitela (serumi pacijenata alergičnih na bananu razblaženi 0,5% odmašćenim mlekom u odnosu 1:3, v:v) preko noći na +4°C. Nakon primarnog antitela ponovljeno je ispiranje (tTBS, 3 x 10 min) pa je membrana inkubirana u rastvoru sekundarnih antitela (mišja monoklonska anti humana IgE antitela obeležena alkalnom fosfatazom (1:1000, v:v, Sigma-Aldrich, St.Louis,

Misuri, SAD), 1 h na sobnoj temperaturi uz mešanje. Nakon ispiranja tTBS-om (3 x 15 min) i TBS-om (1 x 15 min), trake su vizuelizovane inkubiranjem u rastvoru NBT-a i BCIP-a (Sigma-Aldrich, St.Louis, Misuri, SAD) u odnosu 9:1 do pojave ljubičaste boje.

Detekcija 6His taga je izvršena po opisanom protokolu tako što su kao primarna korišćena mišja monoklonska anti-His antitela (1:3000, v:v, Sigma-Aldrich, St.Louis, Misuri, SAD), a kao sekundarna anti-mišja IgG antitela obeležena alkalnom fosfatazom (1:5000, v:v, Sigma-Aldrich, St.Louis, Misuri, SAD).

Rastvori:

TBS (20 mM Tris, 0,9% NaCl, pH 7,4)

TRIS	2,42 g
NaCl	9 g
dH ₂ O	1 L

tTBS (20 mM Tris, 0,9% NaCl, 0,2% Tween, pH 7,4)

Tween 20	1,0 mL
TBS	do 500 mL

Rastvor za blokiranje (5% odmašćeno mleko u tTBS)

Odmašćeno mleko u prahu	5 g
tTBS	do 100 mL

Rastvor za razblaživanje antitela (0,5% odmašćeno mleko u tTBS)

tTBS	do 100 mL
Odmašćeno mleko u prahu	0,5 g

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

TRIS	1,21 g
NaCl	0,585 g
MgCl ₂ x 5 H ₂ O	0,1 g
dH ₂ O	100 mL

Štok rastvor NBT-a

NBT	50 mg
Dimetil formamid	1 mL

Štok rastvor BCIP-a

BCIP	50 mg
dH ₂ O	1 mL

7.11.1 Detekcija IgE reaktivnosti prirodnog i rekombinantnog SAHH proteina u imunoblotu

IgE reaktivnost prirodnog i rekombinantnog SAHH je detektovana u imunoblotu. Prečišćeni prirodni i rekombinantni SAHH (8,4 i 8 µg/bunaru) su razdvojeni SDS-PAG elektroforezom na 12% gelu i transferovani na nitroceluloznu membranu (Serva, Heidelberg, Nemačka). Nakon blokiranja membrane pomoću tTBS (Tween Tris puferovan fiziološki rastvor, 20 mM Tris, pH 7,4; 0,9% NaCl, 0,2% Tween 20) koje sadrži 5% obrano mleko tokom 2 h na sobnoj temperaturi, membrana je inkubirana sa pulom pripremljenim od 12 seruma pacijenata alergičnih na bananu. Pul seruma je razblažen 0,5% obranim mlekom u tTBS (razblaženja 1:3; v:v). Inkubacija je trajala preko noći na 4°C. Nakon ispiranja membrana je inkubirana sa mišjim monoklonskim anti humanim IgE antitelom obeleženim alkalnom fosfatazom (1:1000, v:v, Sigma-Aldrich, St. Louis, Misuri, SAD). Vizuelizacija SAHH specifične reaktivnosti je postignuta korišćenjem supstrata BCIP/NBT (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitro blue tetrazolium, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD).

7.11.2 Dot blot

Prečišćeni nativni uzorak rSAHH (1,6 µg/bunaru) je vakumom adsorbovan direktno na prethodno vodom nakvašenu nitroceluloznu membranu. Dalji postupak razvijanja je nastavljen sa serumima 12 pacijenata alergičnih na bananu već opisanim postupkom.

7.12 Proizvodnja i prečišćavanje rekombinantnog SAHH

7.12.1 Priprema čvrstih i tečnih podloga i antibiotika

Za pripremu podloga korišćene su supstance koje su proizvedene na Institutu za virusologiju, vakcine i serume Torlak. Nakon rastvaranja sastojaka podloge, pH je podešen na 7,4 i podloga je autoklavirana 20 minuta na temperaturi od 121°C i pritisku od 103.5 kPa. Nakon autoklaviranja podloga je ohlađena ispod 50°C i u nju su dodati odgovarajući antibiotici.

Luria-Bretani (LB) – tečna podloga

Tripton	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	10 g
dH ₂ O	do 1 L

Luria-Bretani agar (LA) - čvrsta podloga

Tripton	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g
dH ₂ O	do 1 L

7.12.2 Rastvori antibiotika

Rastvor ampicilina:

Sastav štok rastvora ampicilina:

Ampicilin – natrijumova so	100 mg
dH ₂ O	1 mL

Natrijumova so ampicilina je rastvorena u dejonizovanoj vodi i rastvor je sterilno proceden kroz filter od 0,2 μm. Alikvoti antibiotika su čuvani na -20°C do upotrebe. Radna koncentracija rastvora ampicilina je pravljena direktnim razblaživanjem tečnom podlogom do finalne koncentracije od 100 mg/L.

Rastvor kanamicina:

Sastav štok rastvora kanamicina:

Kanamicin	15 mg
dH ₂ O	1 mL

Čvrsti kanamicin je rastvoren u dejonizovanoj vodi i rastvor je sterilno proceden kroz filter od 0,2 μM . Antibiotik je alikvotiran i čuvan na -20°C do upotrebe. Radna koncentracija rastvora kanamicina je pravljen direktnim razblaživanjem tečnom podlogom do finalne koncentracije od 15 mg/L.

Rastvor hloramfenikola:

Sastav štok rastvora hloramfenikola:

Hloramfenikol	25 mg
96% etanol	1 mL

Hloramfenikol je rastvoren u 96% etanolu i sterilno proceden kroz filter od 0,2 μm . Procedeni rastvor je alikvotiran i čuvan na -20°C do upotrebe. Radna koncentracija rastvora hloramfenikola je pravljen direktnim razblaživanjem tečnom podlogom do finalne koncentracije od 25 mg/L.

7.12.3 Priprema kompetentnih ćelija

Kompetentne ćelije su ćelije pripremljene tako da mogu lako primiti stranu DNK i inkorporirati je u svoj genom. Metode koje se najčešće koriste su hemijska sa kalcijum-hloridom i elektroporacija. U ovom radu korišćen je hemijski metod. Rastvori potrebni za ovaj postupak su:

- LB medijum
- 100 mM CaCl_2 u vodi
- 100 mM CaCl_2 u 10% glicerolu (v/v)

Svi rastvori moraju biti sterilni. Prekonoćna kultura ćelija (bez antibiotika) je zasejana u 20 mL LB medijuma (takođe bez antibiotika) i ostavljena na 37°C do postizanja OD_{600} 0,3-0,5 (oko 3 h). Kultura je zatim stavljena na led 10 minuta i potom centrifugirana 10 min na 5000 rpm. Talog ćelija je resuspendovan u 10 mL 100 mM CaCl_2 i inkubiran 30 minuta na ledu. Ćelijska suspenzija je ponovo centrifugirana na 5000 rpm tokom 10 minuta, talog je resuspendovan u 2 mL 100 mM CaCl_2 u 10% glicerolu i ćelije su alikvotirane (po 50 μL). Dobijene ćelije se mogu odmah koristiti za transformaciju ili se zamrzavaju u tečnom azotu i čuvaju na -70°C .

7.12.4 Transformacija kompetentnih ćelija

Transformacija je proces pri kome ćelija, kroz ćelijsku membranu, direktno usvaja egzogenu DNK. Transformacija se izvodi tako što je u 50 μL sveže napravljenih (ili sveže odmrznutih) ćelija dodato 1 μL plazmidne DNK (na hladno), smeša je pažljivo promešana tapkanjem tube i ćelije su ostavljene 30 minuta na ledu. Zatim su ćelije termički šokirane (heatshock) na 42°C u trajanju od 45 sekundi. Nakon toga, u tubu je dodat 1 mL LB-a, ćelije su

ostavljene 1 h na 37°C, uz mešanje (250 rpm), i zasejane se na čvrstu LB podlogu u koju su prethodno dodati odgovarajući antibiotici pomoću eze po Drigalskom. Za transformaciju su korišćeni plazmidi pUC57-SAHH i pET-23b .

7.12.5 Izolovanje pUC57-SAHH i pET-23b vektora iz DH5α ćelija

Plazmidni konstrukti su izolovani iz transformisanih kolonija DH5α ćelija uz pomoć *PeqGOLD Plasmid Miniprep Kit* kompleta za izolovanje plazmida (Peqlab, Nemačka) prema uputstvima proizvođača. Za izolovanje plazmida korišćene su prekonocne kulture dobijene sterilnim zasejavanjem pojedinačnih kolonija u LB tečnu podlogu sa ampicilinom (100 µg/mL) i njihovim gajenjem preko noći na 37°C, uz konstanto mešanje (250 rpm).

Postupak: 5 mL prekonocne kulture je centrifugirano (13 400 rpm, 1 min) da bi se ćelije odvojile od podloge. Talog ćelija je resuspendovan u 250 µL pufera za resuspenziju uz mešanje na vorteksu. Resuspendovanim ćelijama je dodato 250 µL rastvora za lizu i celokupna smeša je lagano izmešana i ostavljena da odstoji na sobnoj temperaturi do liziranja ćelija (30 - 60 sekundi). Da bi se uklonile ometajuće komponente ćelija (proteini, lipidi, hromozomalna DNK i sl.), ćelijskom lizatu je dodato 350 µL rastvora za neutralizaciju i lizat je momentalno izmešan. Neutralizovani lizat je centrifugiran (13 400 rpm, 10 minuta) kako bi se ometajuće komponente istaložile. Nakon centrifugiranja bistar supernatant je odvađen i nanet na kolonu za prečišćavanje koja je potom centrifugirana (13 400 rpm, 1 min). Tečnost koja je prošla kroz kolonicu je odbačena, a kolonica je isprana sa 2 x po 500 µL pufera za ispiranje sa 96 % etanolom uz centrifugiranje (13 400 rpm, 10 min). Nakon poslednjeg ispiranja sva tečnost koja je prošla kroz kolonu je odbačena, a kolona je prazna centrifugirana 1 minut na 13 400 rpm kako bi se u potpunosti uklonio pufer za ispiranje. Vezana DNK je eluirana dodvanjem pufera za eluciju (50 µL) na membranu kolone i njenim naknadnim centrifugiranjem (1 minut na 13 400 rpm). Eluirana prečišćena DNK je korišćena za dalji rad.

7.12.6 Digestija izolovanih pUC57-SAHH i pET-23b vektora

Nakon izolovanja plazmida pUC57-SAHH i pET-23b iz DH5α ćelija rađena je dupla digestija sa restrikcionim enzimima: NdeI (CATATG) i XhoI (CTCGAG) u Tango Yellow 2x puferu, po protokolu sa Thermo scientific sajta (<https://www.thermofisher.com/rs/en/home.html>). Digestija je rađena 8 h na 37°C nakon čega su enzimi inaktivirani.

Zatim je urađena je horizontalna agarozna elektroforeza a geni za SAHH i pET-23b vektor su preparativno isečeni, izolovani iz gela a njihova koncentracija izmerena pomoću Nanodrop - Thermo Scientific aparature je: [gen za SAHH] - 16,5 ng/µL i [pET-23b] - 6,4 ng/µL. Rađena je restrikcija pUC57-SAHH i pET-23b plazmida. Uzorci sa enzimima su inkubirani u PCR-u na programu za restrikciju 8 h na 37 °C, a nakon toga je rađena inaktivacija 20 min na 80°C.

7.12.7 Ligacija gena za SAHH u pET-23b vektor

Ligacija SAHH gena u pET23-b vektor je izvedena u molarnom odnosu 3 : 1 korišćenjem T4 DNA ligaze i 10 x ligacionog pufera. Ligacija je rađena 16 h na 16°C a zatim je ligaza inaktivirana 20 minuta na 80°C.

7.12.8 Amplifikacija gena za SAHH reakcijom lančanog umnožavanja (colony PCR)

Kako bi se proverilo da li je gen ukloniran, skrining kolonija izraslih nakon transformacije ligacionom smešom pET23b-SAHH je rađen umnožavanjem kolonija PCR reakcijom koristeći prajmere specifične za T7 promotor (forward prajmer TAATACGACTCACTATAGGG) i T7 terminator (reversni prajmer GCTAGTTATTGCTCAGCGG). Za reakciju lančane polimerizacije korišćeni su Dream Taq polimeraza i TANGO YELLOW 2X pufer (Fermentas), prema uputstvu proizvođača. Pripremljen je PCR master miks sa T7 prajmerima i dodat u tube za PCR. Kolonije su inkubirane po sledećem programu: jedan ciklus na 94°C tokom 240 sec, 30 ciklusa (30 sec na 94°C, 30 sec na 51°C, 30 sec na 72°C) i jedan ciklus na 72°C tokom 600 sec. PCR reakcija je analizirana agaroznom gel elektroforezom (1% gel).

7.13 Liziranje ćelija

7.13.1 Liziranje ćelija ultrazvukom

Po završetku ekspresije, ćelije su istaložene centrifugiranjem (10 min, 3000 rpm, Eppendorf centrifuga 5430 R, Hamburg, Nemačka), resuspendovane u puferu 20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 7,4 (9 ml pufera/g ćelija) i lizirane na ledu ultrazvukom (10 x 10 s, 25 W, Branson sonifier 150). Supernatant je odvojen centrifugiranjem 5 min na 13400 rpm.

7.13.2 Liziranje ćelija lizozimom

Po završetku ekspresije, ćelije su istaložene centrifugiranjem (10 min, 3000 rpm, Eppendorf centrifuga 5430 R, Hamburg, Nemačka), resuspendovane u puferu 20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 7,4 (9 ml pufera/g ćelija) i inkubirane 30 min na 37°C uz dodatak lizozima finalne koncentracije 0,5 mg/mL. Nakon 5 ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja supernatant je odvojen centrifugiranjem 5 min na 13400 rpm.

7.14. Optimizacija ekspresije rekombinantne SAHH

U cilju dobijanja što većeg prinosa rSAHH proveren je uticaj temperature, koncentracije dodatog IPTG i vremena indukcije. Jedna kolonija izrasla nakon transformacije na čvrstoj podlozi je prenet u 5mL LB medijuma sa dodatim antibioticima (100 µg/mL ampicilin, 25 µg/mL

hloramfenikol i 15 µg/mL kanamicin) i ostavljena preko noći na 37°C uz konstantno mešanje na 250 rpm. Prekonoćna kultura je prenetu u 300 mL svežeg LB medijuma koji sadrži pomenute antibiotike, i inkubirana na 37°C uz konstantno mešanje na 250 rpm. Nakon postizanja OD₆₀₀ nm – 0,6 – 0,8 ekspresija je indukovana dodatkom IPTG finalne koncentracije 0,5 mM i 1 mM. Za proveru optimalne temperature i vremena indukcije ćelije su rasle 5 h i preko noći na 20°C i 30°C uz konstantno mešanje na 250 rpm.

7.15. Metal-afinitetna hromatografija (Imobilized-metal affinity chromatography) (IMAC)

Za prečišćavanje rekombinantno dobijenog SAHH koji na C-kraju ima 6His tag korišćena je metal-afinitetna hromatografija (IMAC). Solubilna frakcija proteina je naneta na matriks (TALON Superflow, Uppsala, Švedska) zapremine 0,5 mL i eluirana po uputstvu proizvođača. Za ovaj postupak prečišćavanja korišćeni su sledeći puferi:

Pufer za ekvibraciju: 50 mM TRIS, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol pH 7,5

Pufer za eluciju: 50 mM TRIS, 300 mM NaCl, 0,5 M imidazol pH 7,5

Metal afinitetna hromatografija je rađena po sledećem postupku:

1. Ispiranje kolone destilovanom vodom (15 CV, protok 1 mL/min)
2. Ekvibracija kolone puferom za ekvibraciju - 50 mM TRIS, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol (15 CV, protok 1 mL/min)
3. Uzorak je iscentrifugiran i supernatant nanešen na kolonu (protok 0,1 mL/min)
4. Nevezani proteini su uklonjeni sa kolone puferom za ekvibraciju 50 mM TRIS, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol do postizanja negativne reakcije sa Bradford-ovim reagensom (20 CV, protok 1 mL/min)
5. Elucija vezanih proteina puferom za eluciju: 50 mM TRIS, 300 mM NaCl, 0,5 M imidazol pH 7,5. Sakupljane su frakcije po 500 µL

Frakcije sa vezanim proteinima su dijalizovane naspram 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,0 pufera koji sadrži 15% glicerol kako bi se uklonio imidazol i prisustvom glicerola stabilizovao prečišćeni enzim.

7.16 Određivanje enzimske aktivnosti SAHH Ellman-ovim reagensom

Hidrolitička aktivnost SAHH je određena korišćenjem kolorimetrijskog eseja. Supstrati za esej (S-adenosyl-L-homocysteine, Ellman-ov reagens) kupljeni su od Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, Misuri, SAD). Hidrolitička aktivnost je određivana na 37°C, pH 7,6 u mikrotitarskim pločama mešanjem 200 µL rastvora substrata (50 µM SAH, 250 µM Ellman-ov reagens) sa 50 µL enzima. Nakon 20 minuta inkubacije merena je A₄₀₅ nm na Synergy LX multi

mode čitaču (Bio Tek Instruments, Vermont, SAD), a hidrolitička aktivnost SAHH je računata prema molarnom apsorpcionom koeficijentu redukovano Ellman-ovog reagensa koji iznosi $13,600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ u uslovima izvođenja eseja. Sva merenja su urađena prema slepoj probi u kojoj je enzim izuzet iz reakcione smeše. Jedna jedinica SAHH hidrolitičke aktivnosti (IU) je definisana kao količina enzima koja proizvodi $1 \mu\text{mol}$ L-homocisteina u minuti u uslovima izvođenja reakcije.

Za pravljenje radnog rastvora za određivanje enzimske aktivnosti korišćeni su:

Komponenta	Zapremina komponente (μL)
50 mM natrijum fosfatni pufer pH 5.5	1840
1 mM s-adenozilhomocistein (SAH) (finalna koncentracija $50 \mu\text{M}$)	100
10 mM 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoat (DTNB- Elmanov reagens) (finalna koncentracija $300 \mu\text{M}$)	60
Ukupna zapremina radnog rastvora (μL)	2000

Sastav reakcione smeše

Uzorak	V radnog rastvora (mL)	V pufera (mL)	V enzima (mL)
Slepa proba	200	50	/
Ispitivani uzorak	200	/	50

Po $200 \mu\text{L}$ sveže napravljenog radnog rastvora supstrata je inkubirano 10 min na 37°C . Zatim je dodato po $50 \mu\text{L}$ rastvora koji sadrži enzim čija se aktivnost meri. Odmah nakon dodavanja enzima merena je $A_{405\text{nm}}$ u vremenu t_0 . Inkubacija uzorka i radnog rastvora supstrata je trajala 20min na 37°C uz mešanje na 250 rpm nakon čega je merena $A_{405\text{nm}}$ u vremenu t_{20} .

Koncentracija enzimske aktivnosti (C_e) izračunata je prema formuli:

$$C_e \text{ U/ml} = \Delta A_{\text{min}} * V_{\text{reakcione smeše}} / V_{\text{enzima}} * \text{Razblaženje enzima} * \epsilon * b$$

ϵ - Ekstinkcioni koeficijent koji iznosi $13700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; b- dužina puta svetlosti (0,5 cm)

7.17 Bioinformatička analiza, 3D modelovanje i *in silico* mapiranje T ćelijskih epitopa

Za analizu aminokiselinske sekvence SAHH iz banane (XP_009415939.1), kivija (PSS23942.1), ljulja (XP_051195844.1) i lateksa (XP_021689860.1) je korišćen online program ClustalOmega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>).

Predviđanje 3D modela SAHH poreklom iz banane, kivija, ljulja i lateksa je rađeno pomoću programa ColabFold v1.5.2: AlphaFold 2 (181).

Korišćenjem ProtParam određena je teorijska molekulska masa svih SAHH homologa (<https://web.expasy.org/protparam/>).

Predviđanje B ćelijskih epitopa je urađeno pomoću Bepitope (<http://bepitope.ibs.fr/>) i BepiPred 2.0 servera (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/BepiPred-2.0/>) (190) (192).

T ćelijski epitopi su predviđeni korišćenjem NetMHCIIpan verzija 4.0 (Technical University of Denmark) za 7-allele HLA reference set: HLA-DRB1*03:01, HLA-DRB1*07:01, HLA-DRB1*15:01, HLA-DRB3*01:01, HLA-DRB3*02:02, HLA-DRB4*01:01, HLA-DRB5*01:01, sa dužinom peptida od 15 amino kiselina i pragom za jako vezujuće peptide (%Rank) od 1% (229).

7.18 Serumi pacijenata

Serumi dvanaest pacijenata sa istorijom alergije na bananu (Tabela 4.5) koji su u radu korišćeni za potvrdu IgE reaktivnosti prirodnog i rekombinantnog SAHH su dobijeni od Univerziteta Libek i Medicinske klinike Istraživačkog centra Borstel, Nemačka. Pisane izjave o pristanku su dobijene od svih pacijenata i studija je odobrena od strane etičkog komiteta Univerziteta Libek (broj odobrenja 13-086) prema Helsinškoj deklaraciji.

Serumi dvanaest atopičnih pacijenata koji su korišćeni za potvrdu ukrštene reaktivnosti su dobijeni od Instituta za Virologiju, Vakcije i Serume, Torlak. Pacijenti su se javili u Odsek za kliničke alergije prema svojim istorijama hipersenzitivnosti tipa I. Dobijen je pisani pristanak i studija je odobrena od strane etičkog komiteta koja prati Helsinšku deklaraciju (broj odobrenja: 40-13-1). Specifični IgE na bananu, kivi, ljulj i lateks je urađen na automatskom analizatoru imunofluorimetrijskom metodom (ImmunoCAP 100; Phadia AB).

Kao kontrola korišćen je serum pacijenta sa potvrđenom alergijom na grinje i serum nealergične osobe.

8. LITERATURA

1. WAO White Book on Allergy 2013 Update. 2013. <https://www.worldallergy.org/wao-white-book-on-allergy>
2. Pawankar R. *It's time for an evolution*. Asia Pac Allergy 2021;11(1): p e11. <https://doi.org/10.5415/apallergy.2021.11.e11>
3. Kocacik UDF, Filiz S, Bingöl A. *An evaluation of banana allergy in children living in the Mediterranean region*. Turk J Med Sci. 2018;48(3):469–75. (<https://doi.org/10.3906/sag-1705-140>)
4. Jacob JK, Tiwari K, Correa-Betanzo J, Misran A, Chandrasekaran R, Paliyath G. *Biochemical basis for functional ingredient design from fruits*. Annu Rev Food Sci Technol. 2012;3(1):79–104. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101127>
5. Hulme AC. *The biochemistry of fruits and their products*. London, New York: Academic Press; 1970. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19720302744>
6. Martelli A, Calvani M, Foadelli T, Tosca M, Pingitore G, Licari A, et al. *Component resolved diagnosis and risk assessment in food allergy: Molecular diagnosis in food allergy*. Acta Biomed. 2021;92(S7): e2021528. <https://doi.org/10.23750/abm.v92iS7.12421>
7. Shulman ST. *Clemens von Pirquet: A remarkable life and career*. Vol. 6, Pediatr Infect Diseases Society. 2017; 6(4):376–9. <https://doi.org/10.1093/jpids/piw063>
8. Igea JM. *The history of the idea of allergy*. Allergy: European J. Allergy Clin. Immunol. 2013;68(8):966–73. <https://doi.org/10.1111/all.12174>
9. Huber B. *100 years of allergy: Clemens von Pirquet - His idea of allergy and its immanent concept of disease*. Wien Klin Wochenschr. 2006; 118:573–9. <https://doi.org/10.1007/s00508-006-0701-3>
10. Hopp RJ. *Hypersensitivity Reactions: An Everyday Occurrence in Pediatric Allergy Clinics*. Pediatr Allergy Immunol Pulmonol. 2020;33(1):12–8. (<https://doi.org/10.1089/ped.2019.1109>)
11. Sampson HA. *Update on food allergy*. J. Allergy Clin. Immunol. 2004; 113(5):805–19. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.03.014>
12. Sicherer SH, Sampson HA. *Food allergy*. J. Allergy Clin. Immunol. 2010;125(2):S116-25. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.08.028>
13. Nakamura T. *The roles of lipid mediators in type I hypersensitivity*. J Pharm Sci. 2021; 147:126–31. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2021.06.001>

14. Chiesa F ZC. *Atopic Dermatitis: Disease Background and Risk Factors*. In: Management of Atopic Dermatitis. *Advances in experimental medicine and biology*. 2017; 1027:11–9. https://doi.org/10.1007/978-3-319-64804-0_2
15. Eckl-Dorna J, Villazala-Merino S, Linhart B, Karaulov A V, Zhernov Y, Khaitov M, et al. *Allergen-specific antibodies regulate secondary allergen-specific immune responses*. *Front Immunol*. 2019;9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03131>
16. Kumar S, Verma AK, Das M, Dwivedi P D. *Molecular mechanisms of IgE mediated food allergy*. *Int Immunopharmacol*. 2012; 13(4):432–9. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2012.05.018>
17. Gouel-Chéron A, Dejoux A, Lamanna E, Bruhns P. *Animal Models of IgE Anaphylaxis*. *Biology*. 2023;12,931. <https://doi.org/10.3390/biology12070931>
18. Smolinska S, Winiarska E, Globinska A, Jutel M. *Histamine: A Mediator of Intestinal Disorders*. *Metabolites*. 2022;12(10):895. <https://doi.org/10.3390/metabo12100895>
19. Chapman MD, Pomés A, Breiteneder H, Ferreira F. *Nomenclature and structural biology of allergens*. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2007;119(2):414–20. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.11.001>
20. Vanderlugt C L, Smith Begolka W, Neville K L, Katz-Levy Y, Howard L M, Eagar T N, et al. *The functional significance of epitope spreading and its regulation by co-stimulatory molecules*. *Immunol Rev*. 2006; 164(1):63-72. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1998.tb01208.x>
21. Deng X, Storz U, Doranz BJ. *Enhancing antibody patent protection using epitope mapping information*. *MAbs*. 2017;10(2):204–9. <https://doi.org/10.1080/19420862.2017.1402998>
22. Sanchez-Trincado JL, Gomez-Perosanz M, Reche PA. *Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction*. *J Immunol Res*. 2017; 2680160. <https://doi.org/10.1155/2017/2680160>
23. Schein C. *Identifying Similar Allergens and Potentially Cross-Reacting Areas Using Structural Database of Allergenic Proteins (SDAP) Tools and D-Graph*. In *Food Allergens. Methods in Molecular Biology*. 2023; 2717:269–84. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3453-0_18
24. Ivanciuc O, Schein CH, Braun W. *SDAP: Database and computational tools for allergenic proteins*. *Nucleic Acids Res*. 2003; 31(1):359–62. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg010>
25. Schein CH, Negi SS, Braun W. *Still SDAPing Along: 20 Years of the Structural Database of Allergenic Proteins*. *Front Allergy*. 2022;3: 863172. <https://doi.org/10.3389/falgy.2022.863172>
26. Platts-Mills T A E. *The allergy epidemics: 1870-2010*. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2015; 136(1):3–13. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.03.048>

27. Bartha I, Almulhem N, Santos AF. *Feast for thought: A comprehensive review of food allergy 2021-2023*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2024;153(3):576-94. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2023.11.918>
28. Nwaru B I, Hickstein L, Panesar S S, Roberts G, Muraro A, Sheikh A. *Prevalence of common food allergies in Europe: A systematic review and meta-analysis*. *Allergy: Eur J Allergy Clin Immunol.* 2014;69(8):992–1007. <https://doi.org/10.1111/all.12423>
29. Gupta R S, Springston E E, Warrier M R, Smith B, Kumar R, Pongracic J, et al. *The prevalence, severity, and distribution of childhood food allergy in the United States*. *Pediatrics.* 2011;128(1): e9-e17. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-0204>
30. Lehrer S B, Ayuso R, Reese G. *Current Understanding of Food Allergens*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2002; 964:69-85. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04133.x>
31. Wasserman S, Bégin P, Watson W. *IgE-mediated food allergy*. Vol. 14, *Allergy, Asthma Clin Immunol.* 2018;14(Suppl 2):55. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0284-3>
32. Wypych-Ślusarska A, Grot M, Kujawińska M, Nigovski M, Krupa-Kotara K, Oleksiuk K, et al. *Respiratory Symptoms, Allergies, and Environmental Exposures in Children with and without Asthma*. *Int J Environ Res Public Health.* 2022;19(18):11180. <https://doi.org/10.3390/ijerph191811180>
33. Zukiewicz-Sobczak WA, Wróblewska P, Adamczuk P, Kopczynski P. *Causes, symptoms and prevention of food allergy*. *Advances in Dermatology and Allergology.* 2013;30(2):113-6. <https://doi.org/10.5114/pdia.2013.34162>
34. Sampson HA, Muñoz-Furlong A, Campbell RL, Thomas S, Wood J P, Decker W W. *Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: Summary report - Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network Symposium*. *Ann Emerg Med.* 2006;47(4):373–80. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2006.01.018>
35. Wasserman S, Watson W. *Food allergy*. *Allergy, Asthma Cl Im.* 2011;7(S1): S7. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-7-S1-S7>
36. Xu YS, Kastner M, Harada L, Xu A, Salter J, Wasserman S. *Anaphylaxis-related deaths in Ontario: A retrospective review of cases from 1986 to 2011*. *All Asth Clin Immun.* 2014;10(1):38. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-10-38>
37. McKibbin LR, Siu SKH, Roberts HT, Shkrum M, Jeimy S. *Fatal anaphylaxis due to peanut exposure from oral intercourse*. *All Asth Clin Immun.* 2021;17(1):110. <https://doi.org/10.1186/s13223-021-00611-9>
38. Saab IN, Jones W. *Trends in Food Allergy Research, Regulations and Patient Care*. *Nutr Today.* 2022;57(2):64–9. <https://doi.org/10.1097/NT.0000000000000530>

39. Ricketti PA, Alandijani S, Lin CH, Casale T. *Investigational new drugs for allergic rhinitis*. *Expert Opin Inv Drug*. 2017;26(3):279–292. <https://doi.org/10.1080/13543784.2017.1290079>
40. Passalacqua G, Compalati E, Canonica GW. *Investigational drugs for allergic rhinitis*. *Expert Opin Inv Drug*. 2010;19(1):93–103. <https://doi.org/10.1517/13543780903435647>
41. Parlak Z, İlgün Gürel D, Soyer Ö, Şekerel B E, Şahiner Ü M. *Nutritional risks in children with food allergy*. *Turk J Med Sci*. 2023;53(4):845–58. <https://doi.org/10.55730/1300-0144.5648>
42. Du Toit G, Sayre PH, Roberts G, Sever M L, Lawson K, Bahnson H T, et al. *Effect of Avoidance on Peanut Allergy after Early Peanut Consumption*. *N Engl J Med*. 2016;374(15):1435–43. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1514209>
43. Burks AW. *Peanut allergy*. *The Lancet*. 2008;371: 1538–46. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60659-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60659-5)
44. Ćirković Veličković T, Gavrović-Jankulović M. *Food Allergy and Gastrointestinal Tract*. *Food Allergens: Biochemistry and Molecular Nutrition*. USA: Springer; 2014; 1-28. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4939-0841-7>
45. Wood R A. *The Natural History of Food Allergy*. *Pediatrics*. 2003;111(3):1631–7. <https://doi.org/10.1542/peds.111.S3.1631>
46. Macdougall C F, Cant A J, Colver AF. *How dangerous is food allergy in childhood? The incidence of severe and fatal allergic reactions across the UK and Ireland*. *Arch Dis Child*. 2002;86(4):236–9. <https://doi.org/10.1136/adc.86.4.236>
47. Macpherson A J, Harris N L. *Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system*. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(6):478–85. <https://doi.org/10.1038/nri1373>
48. Chen Y, Cui W, Li X, Yang H. *Interaction Between Commensal Bacteria, Immune Response and the Intestinal Barrier in Inflammatory Bowel Disease*. *Front. Immunol*. 2021;12: 761981. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.761981>.
49. Stange E F, Schroeder B O. *Microbiota and mucosal defense in IBD: an update*. *Expert Rev Gastroent*. 2019;13(10):963–76. <https://doi.org/10.1080/17474124.2019.1671822>
50. Husby S, Mestecky J, Moldoveany Z, Holland S, Elson C O. *Oral tolerance in humans. T cell but not B cell tolerance after antigen feeding*. *J Immunol*. 1994;152(9):4663–70. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.152.9.4663>
51. Pinheiro-Rosa N, Torres L, Oliveira MDA, Andrade-Oliveira M F, de Freitas Guimarães M A, Coelho M M et al. *Oral tolerance as antigen-specific immunotherapy*. *Immunotherapy Advances*. 2021;1(1): ltab017. <https://doi.org/10.1093/immadv/ltab017>

52. Turner A V, Smeekens JM. *Environmental Exposure to Foods as a Risk Factor for Food Allergy*. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2023;23(8):427–33. <https://doi.org/10.1007/s11882-023-01091-0>
53. Breiteneder H, Ebner C. *Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens*. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2000;106(1):27–36. <https://doi.org/10.1067/mai.2000.106929>
54. Kanchan K, Clay S, Irizar H, Bunyavanich S, Mathias R A. *Current insights into the genetics of food allergy*. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2021;147(1):15–28. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.10.039>
55. Hong X, Tsai HJ, Wang X. *Genetics of food allergy*. *Curr Opin Pediatr*. 2009;21(6):770–6. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e32833252dc>
56. Hourihane J, Dean T, Warner J O. *Peanut allergy in relation to heredity, maternal diet, and other atopic diseases: results of a questionnaire survey, skin prick testing, and food challenges*. *BMJ*. 1996;313:518–21. <https://doi.org/10.1136/bmj.313.7056.518>
57. Sicherer S H, Furlong T J, Maes H H, Desnick R, Sampson H A, Gelb B. *Genetics of peanut allergy: A twin study*. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2000;106(1):53–6. <https://doi.org/10.1067/mai.2000.108105>
58. Tan T H T, Ellis J A, Saffery R, Allen K J. *The role of genetics and environment in the rise of childhood food allergy*. *Clin Exp Allergy*. 2012;42(1):20–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2011.03823.x>
59. Zuercher AW, Fritsché R, Corthésy B, Mercenier A. *Food products and allergy development, prevention and treatment*. *Curr Opin Biotech*. 2006;17(2):198–203. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.01.010>
60. Radauer C, Bublin M, Wagner S, Mari A, Breiteneder H. *Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions*. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2008;121(4):847–52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.01.025>
61. Breiteneder H. *Can any protein become an allergen?* *Rev Fr Allergol Immunol Clin*. 2008;48(3):135–8. <https://doi.org/10.1016/j.allerg.2008.02.001>
62. Jenkins J A, Griffiths-Jones S, Shewry P R, Breiteneder H, Mills E N C. *Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens: An in silico analysis*. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2005;115(1):163–70. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.10.026>
63. Jenkins J A, Breiteneder H, Mills E N C. *Evolutionary distance from human homologs reflects allergenicity of animal food proteins*. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2007;120(6):1399–405. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.08.019>

64. Radauer C, Breiteneder H. *Pollen allergens are restricted to few protein families and show distinct patterns of species distribution*. J. Allergy Clin. Immunol. 2006;117(1):141–7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.09.010>
65. Hoffmann-Sommergruber K, Mills E N C. *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: 25–35. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2953-z>
66. Sun N, Liu Y, Liu K, Wang S, Liu Q, Lin S. *Gastrointestinal fate of food allergens and its relationship with allergenicity*. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2022;21(4):3376–404. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12989>
67. Apostolovic D, Stanic-Vucinic D, De Jongh H H J, De Jong G A H, Mihailovic J, Radosavljevic J, et al. *Conformational stability of digestion-resistant peptides of peanut conglutins reveals the molecular basis of their allergenicity*. Sci Rep. 2016;29249. <https://doi.org/10.1038/srep29249>.
68. Pekar J, Ret D, Untersmayr E. *Stability of allergens*. Mol Immunol. 2018;100: 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.03.017>
69. Astwood J D, Leach J N, Fuchs R L. *Stability of food allergens to digestion in vitro*. Nat Biotechnol. 1996;14(10):1269–73. <https://doi.org/10.1038/nbt1096-1269>
70. Verhoeckx KCM, Vissers YM, Baumert JL, Faludi R, Feys M, Flanagan S, et al. *Food processing and allergenicity*. Food Chem Toxicol. 2015;80: 223–40. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.03.005>
71. Besler M, Steinhart H, Paschke A. *Stability of food allergens and allergenicity of processed foods*. Journal of Chromatogr B. 2001;756(1-2):207-28. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00110-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00110-4)
72. Bohle B, Zwölfer B, Heratizadeh A, Jahn-Schmid B, Antonia YD, Alter M, et al. *Cooking birch pollen-related food: Divergent consequences for IgE- and T cell-mediated reactivity in vitro and in vivo*. J. Allergy Clin. Immunol. 2006;118(1):242–9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.03.011>
73. Teodorowicz M, Van Neerven J, Savelkoul H. *Food processing: The influence of the maillard reaction on immunogenicity and allergenicity of food proteins*. Nutrients. MDPI AG. 2017;9(8): Article 835. <https://doi.org/10.3390/nu9080835>
74. Maleki SJ, Chung SY, Champagne ET, Raufman JP. *The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins*. J Allergy Clin Immunol. 2000;106(4):763-8. <https://doi.org/10.1067/mai.2000.109620>
75. Lee L A, Burks A W. *Food allergies: prevalence, molecular characterization, and treatment/prevention strategies*. Annu rev of nutr. 2006;26:539–65. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.26.061505.111211>

76. Breiteneder H, Mills E N C. *Molecular properties of food allergens*. J. Allergy Clin. Immunol. 2005;115(1):14–23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.10.022>
77. Pedrosa C, De Felice F G, Trisciuzzi C, Ferreira S T. *Selective neoglycosylation increases the structural stability of vicilin, the 7S storage globulin from pea seeds*. Arch Biochem Biophys. 2000;382(2):203–10. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2024>
78. Sastre J. *Molecular diagnosis in allergy*. Clin Exp Allergy. 2010;40(10):1442–60. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2010.03585.x>
79. Gabrielli S, Clarke A E, Morris J, Abrams E M, Simons E, Ben-Shoshan M. *Fruit-Induced Anaphylaxis: Clinical Presentation and Management*. J. Allergy Clin. Immunol: In Practice. 2021;9(7):2825-2830.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2021.02.055>
80. Saraswat A, Kumar B. *Anaphylactic reaction to apple, banana and lychee: what is common between botanically disparate plant families?* Int J Dermatol. 2005;44(12):996-8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2005.02286.x>
81. Wade A A, Boting L A, Rabson A R, Johannesburg M. *Fruit allergy: Demonstration of IgE antibodies to a 30 kd protein present in several fruits*. J. Allergy Clin. Immunol. 1990;85(4):801–7. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(90\)90202-f](https://doi.org/10.1016/0091-6749(90)90202-f)
82. Paul WE. *Fundamental Immunology*. 6th Edition, Lippincott Williams and Wilkins; 2008
83. Abbas A K, Lichtman A H, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 10th ed. Elsevier; 2021.
84. Schaap-Johansen A L, Vujović M, Borch A, Hadrup S R, Marcatili P. *T Cell Epitope Prediction and Its Application to Immunotherapy*. Front. Immunol. 2021;12:712488. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.712488>
85. Kozlova E E G, Cerf L, Schneider F S, Viart B T, Ngyen C, Trevisol Steiner B, et al. *Computational B-cell epitope identification and production of neutralizing murine antibodies against Atoxylisin-I*. Sci Rep. 2018;8(1):14904. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33298-x>
86. Potocnakova L, Bhide M, Pulzova L B. *An Introduction to B-Cell Epitope Mapping and in Silico Epitope Prediction*. Vol. 2016, J Immunol Res. 2016;2016:6760830. <https://doi.org/10.1155/2016/6760830>
87. Ferreira F, Hawranek T, Gruber P, Wopfner N, Mari A. *Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic*. Allergy. 2004;59(3):243–67. <https://doi.org/10.1046/j.1398-9995.2003.00407.x>
88. Hauser M, Roulias A, Ferreira F, Egger M. *Panallergens and their impact on the allergic patient*. Allergy Asthma Clin Immunol. 2010;6(1):1. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-6-1>

89. Wawrzęczyk A, Rawicka E, Napiórkowska-Baran K, Alska E, Bartuzi Z. *Cross-reactive aeroallergens—the main cause of food allergy*. Food Agric Immunol. 2023;34(1):1–9. <https://doi.org/10.1080/09540105.2022.2133090>
90. Aleksic I, Popovic M, Dimitrijevic R, Andjelkovic U, Vassilopoulou E, Sinaniotis A, et al. *Molecular and immunological characterization of Mus a 5 allergen from banana fruit*. Mol Nutr Food Res. 2012;56(3):446–53. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100541>
91. Parisi CAS, Kelly KJ, Ansotegui IJ, Gonzalez-Díaz S N, Bilò M B, Cardona V, et al. *Update on latex allergy: New insights into an old problem*. World Allergy Organ J. 2021 Jul 28;14(8):100569. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2021.100569>
92. Palacin A, Quirce S, Sanchez-Monge R, Bobolea I, Diaz-Perales A, Martin-Muñoz F, et al. *Sensitization profiles to purified plant food allergens among pediatric patients with allergy to banana*. Pediatr Allergy Immunol. 2011;22(2):186-95. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2010.01125.x>
93. Reindl J, Rihs HP, Scheurer S, Wangorsch A, Hausteiner D, Vieths S. *IgE Reactivity to Profilin in Pollen-Sensitized Subjects with Adverse Reactions to Banana and Pineapple*. Int Arch Allergy Immunol. 2002;128(2):105-14. <https://doi.org/10.1159/000059400>
94. Bublin M, Pfister M, Radauer C, Oberhuber C, Bulley S, Marknell DeWitt A, et al. *Component-resolved diagnosis of kiwifruit allergy with purified natural and recombinant kiwifruit allergens*. J Allergy Clin Immunol. 2010;125(3):687-94, 694.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.10.017>
95. Bernardi ML, Giangrieco I, Camardella L, Ferrara R, Palazzo P, Panico M R, et al. *Allergenic lipid transfer proteins from plant-derived foods do not immunologically and clinically behave homogeneously: The kiwifruit LTP as a model*. PLoS One. 2011;6(11): e27856. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027856>
96. Cox AL, Eigenmann PA, Sicherer SH. *Clinical Relevance of Cross-Reactivity in Food Allergy*. J Allergy Clin Immunol Pract. 2021;9(1):82-99. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.09.030>
97. Kennedy J, Research JK. *Bananas and People in the Homeland of Genus Musa: Not just pretty fruit*. Ethnobotany Research & Applications. 2009;7:179-97. <https://ethnobotanyjournal.org/index.php/era/article/view/360>
98. de Jesus O N, Silva S dO eS, Amorim E P, Fortes Ferreira C, Salabert De Campos J M, et al. *Genetic diversity and population structure of Musa accessions in ex situ conservation*. BMC Plant Biol 2013;13:41. <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/13/41>
99. Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T. *Domestication, genomics and the future for banana*. Ann Bot. 2007;100(5):1073-84. <https://doi.org/doi:10.1093/aob/mcm191>

100. Drenth A, Kema G. *The Vulnerability of Bananas to Globally Emerging Disease Threats*. *Phytopathology*. 2021;111(12):2146–61. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-20-0311-RVW>
101. Singh B, Singh JP, Kaur A, Singh N. *Bioactive compounds in banana and their associated health benefits - A review*. *Food Chemistry*. 2016;206:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.033>
102. Veliz K, Chico-Santamarta L, Ramirez AD. *The Environmental Profile of Ecuadorian Export Banana: A Life Cycle Assessment*. *Foods*. 2022;11(20):3288. <https://doi.org/10.3390/foods11203288>
103. Iriarte A, Almeida MG, Villalobos P. *Carbon footprint of premium quality export bananas: Case study in Ecuador, the world's largest exporter*. *Sci Total Environ*. 2014;472:1082–8. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.072>
104. Der Agopian R G, Soares C A, Purgatto E, Cordenunsi B R, Lajolo F M. *Identification of fructooligosaccharides in different banana cultivars*. *J Agric Food Chem*. 2008;56(9):3305–10. <https://doi.org/10.1021/jf0730111>
105. Suriyamoorthy P, Madhuri A, Tangirala S, Michael K R, Sivanandham V, Rawson A, Anandharaj A. *Comprehensive Review on Banana Fruit Allergy: Pathogenesis, Diagnosis, Management, and Potential Modification of Allergens through Food Processing*. *Plant Foods Hum Nutr*. 2022;77(2):159–71. <https://doi.org/10.1007/s11130-022-00976-1>
106. Beltramo B, Bast A, Diliën H, de Boer A. *Nutrient composition of fresh produce—Assessing variability between European countries to substantiate nutrition and health claims*. *J Food Compos Anal*. 2023;118:105201. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105201>
107. Alina Marc R, Carmen Mureşan C, Pop A, Smaranda Marţiş G, Mureşan A E, Postolache A N, et al. *An Overview of Ripening Processes*. In book: *New Discoveries in the Ripening Processes*; IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.114015>
108. Cordenunsi-Lysenko BR, Nascimento JRO, Castro-Alves VC, Purgatto E, Fabi J P, Gonçalves Peroni-Okyta F H. *The starch is (not) just another brick in the wall: The primary metabolism of sugars during banana ripening*. *Front Plant Sci*. 2019;10:391. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00391>
109. Pérez-Pérez EM, Rodríguez-Malaver AJ, Padilla N, Medina-Ramirez G, Davila J. *Antioxidant Capacity of Crude Extracts from Clones of Banana and Plane Species*. *J Med Food*. 2006;9(4):517-23. <https://doi.org/10.1089/jmf.2006.9.517>
110. Dayıoğlu A, Akgiray S, Nacaroğlu HT, Bahçeci Erdem S. *The Clinical Spectrum of Reactions Due to Banana Allergy*. *Bagcilar Medical Bulletin*. 2020;5(2):60–3. <https://doi.org/10.4274/BMB.galenos.2020.04.013>

111. O'Keefe AW, Ben-Shoshan M. *A 4-month-old baby boy presenting with anaphylaxis to a banana: A case report*. J Med Case Rep. 2014;8(1). J Med Case Rep. 2014 Feb 19;8:62. <https://doi.org/10.1186/1752-1947-8-62>
112. Tokuyama K, Takei K, Arakawa H, Kato M, Shimizu T, Hoshino M, et al. *Latex allergy in a child with banana anaphylaxis*. Allergy. 1997;52:351-1. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1997.tb01004.x>
113. Moreno-Ancillo A, Domínguez-Noche C, Gil-Adrados AC, Cosmes PM. *Allergy to banana in a 5-month-old infant*. Pediatr Allergy Immunol. 2004;15(3):284-5. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2004.00162.x>
114. Ito A, Ito K, Morishita M, Sakamoto T. *A banana-allergic infant with IgE reactivity to avocado, but not to latex*. Pediatr Int. 2006;48(3):321-3. <https://doi.org/10.1111/j.1442-200X.2006.02211.x>
115. Hauswirth DW, Burks AW. *Banana anaphylaxis with a negative commercial skin test*. J Allergy Clin Immunol. 2005;115(3):632-3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.10.034>
116. Thongkhom R, Oncham S, Sompornrattanaphan M, Laisuan W. *Banana anaphylaxis in Thailand: case series*. Asia Pac Allergy. 2020;10(1): p e4. <https://doi.org/10.5415/apallergy.2020.10.e4>
117. Popescu FD. *Cross-reactivity between aeroallergens and food allergens*. World J Methodol. 2015;5(2):31-50. <https://doi.org/10.5662/wjm.v5.i2.31>
118. Anderson LB, Dreyfuss EM, Logan J, Johnstone DE, Glaser J. *Melon and banana sensitivity coincident with ragweed pollinosis*. J Allergy. 1970;45(5):310-19. [https://doi.org/10.1016/0021-8707\(70\)90037-7](https://doi.org/10.1016/0021-8707(70)90037-7)
119. Julanon N, Thiravetyan B, Unhapipatpong C, Xanthavanij N, Krikeerati T, Thongngarm T, et al. *Not Just a Banana: The Extent of Fruit Cross-Reactivity and Reaction Severity in Adults with Banana Allergy*. Foods. 2023;12(13):2456. <https://doi.org/10.3390/foods12132456>
120. Nikolić J, Nešić A, Kull S, Schocker F, Jappe U, Gavrović-Jankulović M. *Employment of proteomic and immunological based methods for the identification of catalase as novel allergen from banana*. J Proteomics. 2018;175:87-94. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.01.007>
121. Miralles J C, Caravaca F, Guillen F, Lombardero M, Negro J M. *Cross-reactivity between Platanus pollen and vegetables*. Allergy. 2008;57(2):146-9. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2002.1s3407.x>
122. Seidler CA, Zeindl R, Fernández-Quintero ML, Tollinger M, Liedl KR. *Allergenicity and Conformational Diversity of Allergens*. Allergies. 2024;4(1):1-16. <https://doi.org/10.3390/allergies4010001>

123. 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. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.05.020>
124. www.allergen.org.
125. Kusakabe Y, Ishihara M, Umeda T, Kuroda D, Nakanishi M, Kitade Y, et al. *Structural insights into the reaction mechanism of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase*. Sci Rep. 2015;5:16641. <https://doi.org/10.1038/srep16641>
126. Reddy M C M, Kuppan G, Shetty N D, Owen J L, Ioerger T R, Sacchettini J C. *Crystal structures of Mycobacterium tuberculosis S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase in ternary complex with substrate and inhibitors*. Protein Sci. 2008;17(12):2134–44. <https://doi.org/10.1110/ps.038125.108>
127. Brzezinski K. *S-adenosyl-l-homocysteine hydrolase: A structural perspective on the enzyme with two rossmann-fold domains*. Biomolecules. 2020;10(12):1682. <https://doi.org/10.3390/biom10121682>
128. Vizán P, Di Croce L, Aranda S. *Functional and Pathological Roles of AHCY*. Front. Cell Dev. Biol. 2021;9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.654344>
129. Gadermaier G, Eichhorn S, Vejvar E, Weilnböck L, Lang R, Briza P, et al. *Plantago lanceolata: An important trigger of summer pollinosis with limited IgE cross-reactivity*. J Allergy Clin Immunol. 2014;134(2):472–5.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.02.016>
130. Ansari IT, Mu T. *A murine model of wheat versus potato allergy: Patatin and 53kDa protein are the potential allergen from potato*. Mol Immunol. 2018;101:284–93. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.07.012>.
131. Hao W, Li Y, Shan Q, Han T, Li W, He S, et al. *Characterization of human S-adenosyl-homocysteine hydrolase in vitro and identification of its potential inhibitors*. J Enzyme Inhib Med Chem. 2017;32(1):1209–15. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1370584>
132. McKenna O E, Asam C, Araujo G R, Roulias A, Goulart L R, Ferreira F. *How relevant is panallergen sensitization in the development of allergies?* Pediat Allergy Immu. 2016;27:560–8. <https://doi.org/10.1111/pai.12589>
133. Kleine-Tebbe J, Ackermann-Simon J, Hanf G. *Molecular allergy diagnosis using pollen marker allergens and pollen panallergens: Five patterns seen in multiple test reactions to pollen extracts*. Allergol Select. 2021;5(01):180–6. <https://doi.org/10.5414/ALX02238E>
134. Gavrovic-Jankulovic M, Polovic N, Prusic S, Jankov R M, Atanaskovic-Markovic M, Vuckovic O, et al. *Allergenic potency of kiwi fruit during fruit development*. Food Agric Immunol. 2005;16(2):117–28. <https://doi.org/10.1080/09540100500090804>
135. 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.* J Eur Acad Dermatol. 2016;30(7):1220–2. <https://doi.org/10.1111/jdv.13146>
136. Tanaka H, Masuta C, Kataoka J, Kuwata S, Koiwai A, Noma M. *Inducible expression by plant hormones of S-adenosyl-homocysteine hydrolase gene from Nicotiana tabacum during early flower bud formation in vitro.* Plant Sci. 1996;113(2):167-74. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(95\)04289-X](https://doi.org/10.1016/0168-9452(95)04289-X)
137. Li X, Huang L, Hong Y, Zhang Y, Liu S, Li D, et al. *Co-silencing of tomato S-adenosylhomocysteine hydrolase genes confers increased immunity against Pseudomonas syringae pv. Tomato DC3000 and enhanced tolerance to drought stress.* Front Plant Sci. 2015;6:717. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00717>
138. Cromwell O, Häfner D, Nandy A. *Recombinant allergens for specific immunotherapy.* J Allergy Clin Immunol. 2011;127(4):865–72. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.01.047>.
139. Treudler R, Simon J C. *Overview of component resolved diagnostics.* Curr Allergy Asthma Rep. 2013;13(1):110–7. <https://doi.org/10.1007/s11882-012-0318-8>
140. Si K, Fang Y, Vitale M, Fehlner P, King P. *cDNA cloning and primary structure of a white-face hornet venom allergen, antigen 5.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85(3):895-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.3.895>
141. Valenta R, Duchene M, Vttala S, Birken T, Ebner C, Hirschwehr R, et al. *Recombinant allergens for immunoblot diagnosis of tree-pollen allergy.* J Allergy Clin Immunol. 1991;88(6):889-94. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(91\)90245-J](https://doi.org/10.1016/0091-6749(91)90245-J)
142. Yssel H, Johnson KE, Schneider P V, Wideman J, Terr A, Kastelein R, et al. *T cell activation-inducing epitopes of the house dust mite allergen Der p I. Proliferation and lymphokine production patterns by Der p I-specific CD4+ T cell clones.* J Immunol. 1992;148(3):738–45.
143. Breiteneder H, Ferreira F, Hoffmann-Sommergruber K, Ebner C, Breitenbach M, Rumpold H, et al. *Four recombinant isoforms of Cor a I, the major allergen of hazel pollen, show different IgE-binding properties.* Eur J Biochem. 1993;212(2):355–62. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17669.x>
144. Gajhede M, Osmark P, Poulsen MF, Ipsen H, Larsen J N, van Neerven R J J, et al. *X-ray and NMR structure of Bet v I, the origin of birch pollen allergy.* Nat Struct Biol. 1996;3(12):1040-5. <https://doi.org/10.1038/nsb1296-1040>
145. Moser M, Cramer R, Brust E, Suter M, Menz G. *Diagnostic value of recombinant Aspergillus fumigatus allergen I/a for skin testing and serology.* J Allergy Clin Immunol. 1994;93(1 Pt 1):1-11. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(94\)90227-5](https://doi.org/10.1016/0091-6749(94)90227-5)
146. Arquint O, Helbling A, Cramer R, Ferreira F, Breitenbach M, Pichler W J. *Reduced in vivo allergenicity of Bet v Id isoform, a natural component of birch pollen.* J Allergy Clin Immunol. 1999;104(6):1239-43. [https://doi.org/10.1016/s0091-6749\(99\)70019-9](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(99)70019-9)

147. Schramm G, Kahlert H, Suck R, Weber B, Stüwe H T, Müller W D, et al. *Allergen engineering: variants of the timothy grass pollen allergen Phl p 5b with reduced IgE-binding capacity but conserved T cell reactivity*. J Immunol. 1999;162(4):2406–14.
148. Zhernov Y, Curin M, Khaitov M, Karaulov A, Valenta R. *Recombinant allergens for immunotherapy: State of the art*. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2019;19(4):402-414. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000536>
149. Schütz A, Bernhard F, Berrow N, Buyel J F, Ferreira-da-Silva F, Haustraete J, et al. *A concise guide to choosing suitable gene expression systems for recombinant protein production*. STAR Protocols. 2023;4(4):102572. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102572>
150. Brondyk WH. *Chapter 11 Selecting an Appropriate Method for Expressing a Recombinant Protein*. Method Enzymol. 2009;463:131–47. [10.1016/S0076-6879\(09\)63011-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63011-1)
151. Pittner G, Vrtala S, Thomas W R, Weghofer M, Kundi M, Horak F, et al. *Component-resolved diagnosis of house-dust mite allergy with purified natural and recombinant mite allergens*. Clin Exp Allergy. 2004;34(4):597–603. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.1930.x>
152. Akinfenwa O, Rodríguez-Domínguez A, Vrtala S, Valenta R, Campana R. *Novel vaccines for allergen-specific immunotherapy*. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2021;21(1):86–99. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000706>
153. Valenta R, Campana R, Niederberger V. *Recombinant allergy vaccines based on allergen-derived B cell epitopes*. Immunol Lett. 2017;189:19–26. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.04.015>
154. Grozdanovic M, Popovic M, Gavrovic-Jankulovic M. *Design and cloning strategies of recombinant allergens for diagnosis and specific immunotherapy*. Advances in Genetics Research. 2014. p. 19–46.
155. Dodig S, Čepelak I. *The potential of component-resolved diagnosis in laboratory diagnostics of allergy*. Biochem Med. 2018;28(2):020501. <https://doi.org/10.11613/BM.2018.020501>
156. Bertemes-Filho P, Laus Bertemes W, Cavalieri R, Torres Paré A, Spessatto J, Savi D. *Ripening classification of bananas (Musa acuminata) using electrical impedance spectroscopy and support vector machine*. Int J Biosens Bioelectron. 2020;6(4):99–101. <https://doi.org/10.15406/ijbsbe.2020.06.00195>
157. Khodabakhshian R, Baghbani R. *Classification of bananas during ripening using peel roughness analysis—An application of atomic force microscopy to food process*. J Food Process Eng. 2021;44(11): e13857. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13857>
158. Hou JC, Hu YH, Hou LX, Guo KQ, Satake T. *Classification of ripening stages of bananas based on support vector machine*. International Journal of Agricultural and Biological Engineering. 2015;8(6):99–103. <https://doi.org/10.3965/j.ijabe.20150806.1275>

159. Mazen FMA, Nashat AA. *Ripeness Classification of Bananas Using an Artificial Neural Network*. Arab J Sci Eng. 2019;44(8):6901–10. <https://doi.org/10.1007/s13369-018-03695-5>
160. Mebratie MA, Woldetsadik K, Ayalew A, Haji J. *Comparative Study of Different Banana Ripening Methods*. Science, Technology and Arts Research Journal. 2016;4(2):32. <https://doi.org/10.4314/star.v4i2.4>
161. Kusuma Sri M, Saikrishna K, Vinay Kumar V. *Classification of Ripening of Banana fruit using Convolutional Neural Networks*. International Conference on Innovative Advancement in Engineering and Technology. 2020. <https://ssrn.com/abstract=3558355>
162. Zhang C, Zhang C, Xu X, Liao M, Tong N, Zhang Z, et al. *Transcriptome analysis provides insight into the regulatory mechanisms underlying pollen germination recovery at normal high ambient temperature in wild banana (*Musa itinerans*)*. Front Plant Sci. 2023;14:1255418. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1255418>
163. Čtrnáctá V, Stejskal F, Keithly JS, Hrdý I. *Characterization of S-adenosylhomocysteine hydrolase from *Cryptosporidium parvum**. FEMS Microbiol Lett. 2007;273(1):87–95. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00795.x>
164. Yang X, Borchardt RT. *Overexpression, purification, and characterization of S-adenosylhomocysteine hydrolase from *Leishmania donovani**. Arch Biochem Biophys. 2000;383(2):272–80. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2087>
165. Nakanishi M, Iwata A, Yatome C, Kitade Y. *Purification and properties of recombinant *Plasmodium falciparum* S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase*. J Biochem. 2001;129(1):101–5. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a002819>
166. Zheng Y, Chen CC, Ko TP, Xiao X, Yang Y, Huang CH, et al. *Crystal structures of S-adenosylhomocysteine hydrolase from the thermophilic bacterium *Thermotoga maritima**. J Struct Biol. 2015;190(2):135–42. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.03.002>
167. Minotto L, Ko GA, Edwards MR, Bagnara AS. *Trichomonas vaginalis: Expression and Characterisation of Recombinant S-Adenosylhomocysteinase*. Exp Parasitol. 1998;90(2):175-80. <https://doi.org/10.1006/expr.1998.4319>
168. Porcelli M, Cacciapuoti G, Fusco S, Iacomino G, Gambacorta A, De Rosa M, et al. *S-Adenosylhomocysteine hydrolase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: purification, physico-chemical and immunological properties*. Biochim Biophys Acta. 1993;1164(2):179-88. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(93\)90246-n](https://doi.org/10.1016/0167-4838(93)90246-n)
169. Lozada-Ramírez JD, Sánchez-Ferrer A, García-Carmona F. *Recombinant S-adenosylhomocysteine hydrolase from *thermotoga maritima*: Cloning, overexpression, characterization, and thermal purification studies*. Appl Biochem Biotechnol. 2013;170(3):639–53. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0218-y>

170. Pouresmaeil M, Azizi-Dargahlou S. *Factors involved in heterologous expression of proteins in E. coli host*. Arch Microbiol. 2023; 205(5): 212. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03541-9>
171. Mühlmann M, Forsten E, Noack S, Büchs J. *Optimizing recombinant protein expression via automated induction profiling in microtiter plates at different temperatures*. Microb Cell Fact. 2017;16(1):220. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0832-4>
172. Kim IK, Zhang CY, Chiang PK, Cantoni GL. *S-Adenosylhomocysteine hydrolase from hamster liver: purification and kinetic properties*. Arch Biochem Biophys. 1983;226(1):65-72. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(83\)90271-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(83)90271-0)
173. Franceschini N, Impagnatiello A, Oratore A, Strom R, Bozzi A. *S-adenosylhomocysteine hydrolase from Acetivobacter calcoaceticus: purification and partial characterization*. Biochem Mol Biol Int. 1993;30(6):1081–92.
174. López-Cano A, Martínez-Miguel M, Guasch J, Ratera I, Arís A, Garcia-Fruitós E. *Exploring the impact of the recombinant Escherichia coli strain on defensins antimicrobial activity: BL21 versus Origami strain*. Microb Cell Fact. 2022;21(1):77. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01803-7>
175. Lozada-Ramírez JD, Martínez-Martínez I, Sánchez-Ferrer A, García-Carmona F. *S-adenosylhomocysteine hydrolase from Corynebacterium glutamicum: Cloning, overexpression, purification, and biochemical characterization*. J Mol Microbiol Biotechnol. 2008;15(4):277–86. <https://doi.org/10.1159/000115846>
176. Vallee BL, Riordan JF, Johansen JT, Livingston DM, Spring Harb Symp Quant Biol C, Adler AJ, et al. *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. Encyclopedea of Spectroscopy and Spectrometry. Academic Press; 1973;(27).
177. Sreerama N, Woody RW. *Computation and Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra*. Methods Enzymol. 2004;383:318-51. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(04\)83013](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(04)83013) .
178. Wei Y, Thyparambil A A, Latour R A. *Protein helical structure determination using CD spectroscopy for solutions with strong background absorbance from 190 to 230 nm*. Biochim Biophys Acta Proteins Proteom. 2014;1844(12):2331–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.10.001>
179. Greenfield NJ. *Circular Dichroism Analysis for Protein-Protein Interactions*. Methods in Molecular Biology, vol 261. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-762-9:055>
180. Bertucci C, Pistolozzi M, De Simone A. *Structural Characterization of Recombinant Therapeutic Proteins by Circular Dichroism*. Curr Pharm Biotechnol. 2011;12(10):1508–16. <https://doi.org/10.2174/138920111798357276>
181. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. *Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold*. Nature. 2021;596(7873):583–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

182. Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M. *ColabFold: making protein folding accessible to all*. Nat Methods. 2022;19(6):679–82. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>
183. Turner MA, Yang X, Yin D, Kuczera K, Borchardt RT, Howell PL. *Structure and Function of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase*. Cell Biochem Biophys. 2000;33:101–125. <https://doi.org/10.1385/CBB:33:2:101>
184. Tahmasian A, Drew R, Broadbent JA, Juhász A, Nye-Wood M, Colgrave ML. *Conventional solid-state fermentation impacts the white lupin proteome reducing the abundance of allergenic peptides*. Food Chem. 2023;426:136622. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136622>
185. Jappe U, Karstedt A, Warneke D, Hellmig S, Böttger M, Riffelmann FW, et al. *Identification and purification of novel low-molecular-weight lupine allergens as components for personalized diagnostics*. Nutrients. 2021;13(2):1–21. <https://doi.org/10.3390/nu13020409>
186. Angaitkar P, Aljrees T, Kumar Pandey S, Kumar A, Janghel RR, Sahu TP, et al. *Inferring linear-B cell epitopes using 2-step metaheuristic variant-feature selection using genetic algorithm*. Sci Rep. 2023;13(1):14593. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41179-1>
187. da Silva BM, Ascher DB, Pires DEV. *EpitopeID: accurate taxonomy-aware B-cell linear epitope prediction*. Brief Bioinform. 2023;24(3):bbad114. <https://doi.org/10.1093/bib/bbad114>
188. Liu F, Yuan CC, Chen H, Yang F. *Prediction of linear B-cell epitopes based on protein sequence features and BERT embeddings*. Sci Rep. 2024;14(1):2464. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-53028-w>
189. Van Regenmortel MHV. *What is a b-cell epitope?* Methods Mol Biol. 2009;524:3-20. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-450-6_1
190. Ponomarenko J, Regenmortel M Van. *B cell epitope prediction*. Structural Bioinformatics, Second Edition, John Wiley & Sons. <https://www.researchgate.net/publication/265745548>
191. Yang Y, Yan HF, Zhang YX, Chen HL, Cao MJ, Li MS, et al. *Expression and epitope identification of myosin light chain isoform 1, an allergen in Procambarus clarkii*. Food Chem. 2020;317:126422. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020>
192. Crespo JF, Bueno C, Villalba M, Monaci L, Cuadrado C, Novak N, et al. *Epitope mapping of the major allergen 2S albumin from pine nut*. Food Chem. 2021;339:127895. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127895>
193. Candreva ÁM, Smaldini PL, Cauherhff A, Petruccelli S, Docena GH. *A novel approach to ameliorate experimental milk allergy based on the oral administration of a short soy cross-reactive peptide*. Food Chem. 2021;346:128926. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128926>

194. Đurašinović T, Lopandić Z, Protić-Rosić I, Ravnsborg T, Blagojević G, Burazer L, et al. *Utilizing the Banana S-Adenosyl-L-Homocysteine Hydrolase Allergen to Identify Cross-Reactive IgE in Ryegrass-, Latex-, and Kiwifruit-Allergic Individuals*. *Int. J. Mol. Sci* 2024;25(11):5800. <https://doi.org/10.3390/ijms25115800>
195. Ahmed R K S, Maeurer M J. *T-cell epitope mapping*. *Epitope Mapping Protocols. Methods in Molecular Biology™*. Humana Press. 2009;524:427–38. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-450-6_31
196. Stern L J, Wiley D C. *Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins*. *Structure* 1994;2(4):245-51. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00026-5](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00026-5)
197. Madden D R. *The Three-Dimensional Structure of Peptide-MHC Complexes*. *Annu. Rev. Immunol.* 1995;13:587-622. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.13.040195.003103>
198. Jaiswal M, Zahra S, Kumar S. *Bioinformatics tools for epitope prediction*. In: *Systems and Synthetic Immunology*. Springer Singapore; 2020. p. 103–24. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3350-1_4
199. Bradford MM. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
200. Cardona EEG, Heathcote K, Teran LM, Righetti PG, Boschetti E, D’Amato A. *Novel low-abundance allergens from mango via combinatorial peptide libraries treatment: A proteomics study*. *Food Chem.* 2018;269:652–60. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.113>
201. Yang J, Tu J, Liu H, Wen L, Jiang Y, Yang B. *Identification of an immunostimulatory polysaccharide in banana*. *Food Chem.* 2019 Mar 30;277:46–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.043>
202. Nair IM, Jayachandran K. *In Vitro Enzymatic Conversion of Glibenclamide Using Squalene Hopene Cyclase from Pseudomonas mendocina Expressed in E. coli BL21 (DE3)*. *Mol Biotechnol.* 2020;62(9):456–65. <https://doi.org/10.1007/s12033-020-00264-w>
203. Kovács N, Farsang R, Szigeti M, Vonderviszt F, Jankovics H. *Enhanced Recombinant Protein Production of Soluble, Highly Active and Immobilizable PNGase F*. *Mol Biotechnol.* 2022;64(8):914–8. <https://doi.org/10.1007/s12033-022-00464-6>
204. Eyer P, Worek F, Kiderlen D, Sinko G, Stuglin A, Simeon-Rudolf V, et al. *Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment*. *Anal Biochem.* 2003;312(2):224-7. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00506-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00506-7)
205. Ahmadzadeh M, Farshdari F, Nematollahi L, Behdani M, Mohit E. *Anti-HER2 scFv Expression in Escherichia coli SHuffle®T7 Express Cells: Effects on Solubility and Biological Activity*. *Mol Biotechnol.* 2020;62(1):18–30. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00221-2>

206. Lozada-Ramírez JD, Martínez-Martínez I, García-Carmona F, Sánchez-Ferrer A. *Cloning, overexpression, purification, and characterization of S-adenosylhomocysteine hydrolase from Corynebacterium efficiens YS-314*. Biotechnol Prog. 2008;24(1):120-7. <https://doi.org/10.1021/bp070205c>
207. Porcelli M, Fusco S, Inizio T, Zappia V, Cacciapuoti G. *Expression, purification, and characterization of recombinant S-adenosylhomocysteine hydrolase from the thermophilic archaeon Sulfolobus solfataricus*. Protein Expr Purif. 2000;18(1):27–35. <https://doi.org/10.1006/prep.1999.1161>
208. Guranowski A, Pawelkiewicz J. *Adenosylhomocysteinase from Yellow Lupin Seeds: Purification and Properties*. Eur J Biochem. 1977;80(2):517–23. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11907.x>
209. Čtrnáctá V, Stejskal F, Keithly JS, Hrdý I. *Characterization of S-adenosylhomocysteine hydrolase from Cryptosporidium parvum*. FEMS Microbiol Lett. 2007 Aug;273(1):87–95. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00795.x>
210. Nakanishi M, Iwata A, Yatome C, Kitade Y. *Purification and Properties of Recombinant Plasmodium falciparum S-Adenosyl-L-Homocysteine Hydrolase*. J Biochem. 2001;129(1):101-5. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a002819>
211. Yang X, Borchardt RT. *Overexpression, purification, and characterization of S-adenosylhomocysteine hydrolase from Leishmania donovani*. Arch Biochem Biophys. 2000;383(2):272–80. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2087>
212. Zheng Y, Chen CC, Ko TP, Xiao X, Yang Y, Huang CH, et al. *Crystal structures of S-adenosylhomocysteine hydrolase from the thermophilic bacterium Thermotoga maritima*. J Struct Biol. 2015;190(2):135–42. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.03.002>
213. Hu Y, Komoto J, Huang Y, Gomi T, Ogawa H, Takata Y, et al. *Crystal structure of S-adenosylhomocysteine hydrolase from rat liver*. Biochemistry. 1999;38(26):8323–33. <https://doi.org/10.1021/bi990332k>
214. Matuszewska B, Borchardt RT. *The Mechanism of Inhibition of Alcaligenes faecalis S-Adenosylhomocysteine Hydrolase by Neplanocin A'*. Arch Biochem Biophys. 1987;256(1):50-5. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(87\)90424-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(87)90424-3)
215. Pina AS, Batalha ÍL, Roque ACA. *Affinity tags in protein purification and peptide enrichment: An overview*. Methods Mol Biol. 2014;1129:147-68. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-977-2_14
216. Đurašinović T, Lopandić Z, Protić-Rosić I, Nešić A, Trbojević-Ivić J, Jappe U, et al. *Identification of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from banana fruit as a novel plant panallergen*. Food Chem. 30;437(Pt1). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137782>

217. Werfel T, Asero R, Ballmer-Weber BK, Beyer K, Enrique E, Knulst AC, et al. *Position paper of the EAACI: Food allergy due to immunological cross-reactions with common inhalant allergens*. Allergy. 2015;70(9):1079-90. <https://doi.org/10.1111/all.12666>
218. Miguères M, Dávila I, Frati F, Azpeitia A, Jeanpetit Y, Lhéritier-Barrand M, et al. *Types of sensitization to aeroallergens: Definitions, prevalences and impact on the diagnosis and treatment of allergic respiratory disease*. Clin Transl Allergy. 2014;4:16. <https://doi.org/10.1186/2045-7022-4-16>
219. Polikovskiy M, Fernand F, Sack M, Frey W, Müller G, Golberg A. *In silico food allergenic risk evaluation of proteins extracted from macroalgae *Ulva* sp. with pulsed electric fields*. Food Chem. 2019;276:735–44. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.134>
220. Barre A, Pichereaux C, Simplicien M, Burlet-Schiltz O, Benoist H, Rougé P. *A proteomic- and bioinformatic-based identification of specific allergens from edible insects: Probes for future detection as food ingredients*. Foods. 2021;10(2). <https://doi.org/10.3390/foods10020280>
221. Furci F, Ricciardi L. *Plant food allergy improvement after grass pollen sublingual immunotherapy: A case series*. Pathogens. 2021;10(11):1412. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111412>
222. Matsuo H, Yokooji T, Taogoshi T. *Common food allergens and their IgE-binding epitopes*. Allergol Int. 2015;64(4):332-43. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2015.06.009>
223. Borres MP, Maruyama N, Sato S, Ebisawa M. *Recent advances in component resolved diagnosis in food allergy*. Allergol Int. 2016;65(4):378-387. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2016.07.002>
224. Sewell AK. *Why must T cells be cross-reactive?* Nat Rev Immunol. 2012;12:669–77. <https://doi.org/10.1038/nri3279>
225. Kamath SD, Bublin M, Kitamura K, Matsui T, Ito K, Lopata AL. *Cross-reactive epitopes and their role in food allergy*. J Allergy Clin Immunol. 2023;151(5):1178-1190. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2022.12.827>
226. Cong Y, Li Y, Li L. *Immunoglobulin E and immunoglobulin G cross-reactive allergens and epitopes between cow milk α S1-casein and soybean proteins*. J Dairy Sci. 2020;103(11):9815–24. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18250>
227. Laemmli UK. *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4*. Nature. 1970;227(5259):680–5. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
228. Gavrovic-Jankulovic M, Nesic A. *Allergen for detection of specific antibodies and use thereof*. Serbia; 2015;57352. <https://reg.zis.gov.rs/patreg/?t=p>
229. Shevchenko A, Tomas H, Havliš J, Olsen J V, Mann M. *In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes*. Nat Protoc. 2007;1(6):2856–60. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468>

230. Reynisson B, Alvarez B, Paul S, Peters B, Nielsen M. *NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIPan-4.0: Improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data.* Nucleic Acids Res. 2021;48(W1):W449–54. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa379>

Biografija

Tatjana N. Đurašinović je rođena 18.01.1970. godine u Zemunu, Srbija gde je završila osnovnu i srednju školu. Osnovne akademske studije je upisala školske 1988/89 godine na Univerzitetu u Beogradu – Hemijskom fakultetu, smer Biohemija. Završni rad pod nazivom „Karakterizacija hemoglobinskih modifikacija nastalih pod uticajem organskih rastvarača“ je odbranila sa ocenom 10. Master akademske studije je upisala školske 2008/2009. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu Biohemija, koje je završila 2011. godine sa prosečnom ocenom 9.20. Master rad pod naslovom „Proizvodnja rekombinantnog Der p 2 alergena za primenu u dijagnostici alergije na kućnu prašinu“ odbranila je sa ocenom 10. Doktorske akademske studije upisala je 2015. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu Biohemija. Od 1998 – 2005 radila je u laboratoriji Doma zdravlja Južni Banat u Pančevu, poliklinici Vizim u Beogradu i u laboratoriji Doma zdravlja Rakovica. Od 2007 zaposlena je u Institutu za medicinsku biohemiju VMA, a 2018. godine je postavljena za načelnika Odseka za proteinsku dijagnostiku Instituta za medicinsku biohemiju VMA gde i dalje radi.



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 - Хемијски факултет

Студентски трг 12-16 • П. факс 51 • 11158 Београд 110 • ПАРК: 105305 • Тел/факс: 011-2184330 • <http://belix.chem.bg.ac.rs/>

Универзитет у Београду
ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ
Бр. 481/2
01-06-2022 год.
БЕОГРАД

Одлука број 1-6/22

**ЕТИЧКА КОМИСИЈА ЗА УПОТРЕБУ ХУМАНОГ БИОЛОШКОГ
МАТЕРИЈАЛА ЗА ИСТРАЖИВАЊЕ**

Универзитет у Београду – Хемијски факултет

На online седници Етичке комисије за употребу хуманог биолошког материјала за истраживање, одржаној 01. јуна 2022. године, разматран је захтев др Марије Гавровић-Јанкуловић, редовног професора Хемијског факултета у Београду, о давању сагласности за употребу хуманог биолошког материјала у истраживачке сврхе, за потребе израде научно-истраживачке студије под називом: "Испитивање имунореактивности серума особа алергичних на банану на протеин S-аденозил-L-хомоцистеин-хидролазу", које ће се спроводити под руководством др Марије Гавровић-Јанкуловић на Хемијском факултету Универзитета у Београду. Део резултата ове студије биће коришћен у оквиру докторске дисертације мср Татјане Ђурашиновић (Војномедицинска Академија, Институт за медицинску биохемију), студента докторских академских студија на Хемијском факултету Универзитета у Београду под називом "Испитивање алергености природне и рекомбинантно произведене S-аденозил-L-хомоцистеин-хидролазе из банане" (ментор др Марија Гавровић-Јанкуловић, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду).

На основу анализе приспеле документације (Захтев за одобрење спровођења научно-истраживачке студије; Образац са подацима о одговорном истраживачу; Образац обавештења за испитаника и Образац за добијање писане сагласности за учешће у научно-истраживачкој студији; дозвола од стране Етичког комитета Универзитета у Лубеку, Немачка, бр. 13-086) и непосредног увида у стање, Етичка комисија Хемијског факултета донела је следећу

ОДЛУКУ

Одобрава се коришћење биолошког материјала узоркованог на Одељењу за клиничку и молекуларну алергологију, Медицинске клинике у Борстелу, Немачка, а под надзором клиничког алерголога проф. др Ute Jarre (пуна крв, 10 mL, група од 20 испитаника алергичних на банану и 20 контролних испитаника) за академску студију: "Испитивање имунореактивности серума особа алергичних на банану на протеин S-аденозил-L-хомоцистеин-хидролазу", чији је експериментални протокол у складу са прописаним етичким нормама.

Београд, 01.06.2022. године

Председник Етичке комисије:

Natalija Polovic
Проф. др Наталија Половић

04-03-2024		П-01-СОП-0010-017 (издање 08)	
ТОРЛАК 40/13-1		ОПШТИ ОБРАЗАЦ КОМУНИКАЦИЈЕ	
		Ознака записа:	1/2024

ПРЕДМЕТ: Мишљење Етичког Одбора о предлогу научноистраживачког рада

ТЕКСТ:

На захтев истраживача Исидоре Протић-Росић (бр.40/13) са Хемијског факултета Универзитета у Београду, Етички одбор Института за вирусологију, вакцине и серуме "Торлак", дана 04.03.2024. даје

ОДОБРЕЊЕ

Да се спроведе истраживање под називом "Испитивање имунореактивности рекомбинантних алергена полена и хране". Руководилац истраживања је проф. др Марија Гавровић-Јанкуловић са Хемијског факултета Универзитета у Београду. Током овог истраживања, прикупљаће се узорци пацијената (серуми) који се привремено складиште и обрађују на Институту за вирусологију, вакцине и серуме "Торлак", у Одсеку за бактериологију и имунологију и Одсеку за научноистраживачки рад.

Главни одговорни учесник истраживања са Института, др Гордан Благојевић је образложио како ће се применити принцип анонимности и заштите података пацијената, чиме се искључује могућност да се ови подаци користе у сврхе које нису прописане по закону о заштити података о личности ("Сл. Гласник РС", бр. 87/2018). Такође, сви испитаници учествују на добровољној бази, потписују писану сагласност за учешће и имају право на повлачење учешћа и својих података из истраживања у било ком моменту.

Етички Одбор је утврдио да ће у истраживању бити испоштована процедура заштите личних података пацијената чији узорци ће бити донети на Институт, као и да на Институту постоји техничка и стручна подобност за извођење планираних анализа.

Датум: 04.03.2024. године

Председавајући

Др Вељко Благојевић, Научни сарадник

Доставити:

- Председнику Етичког одбора
- Архиви

Прилог 1.

образац изјаве о ауторству

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____Татјана Ђурашиновић_____

Број индекса _____ДБ 06/2015_____

Изјављујем

Да је докторска дисертација под насловом

„Испитивање алергености природне и рекомбинантно произведене S-аденозил-L-хомоцистеин хидролазе из банане“

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

У Београду, _____

Потпис аутора _____

Прилог 2.

образац изјаве о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Татјана Ђурашиновић

Број индекса ДБ 06/2015

Студијски програм Биохемија

Наслов рада „Испитивање алергености природне и рекомбинантно произведене S-аденозил-L-хомоцистеин хидролазе из банане“

Ментор др Марија Гавровић-Јанкуловић, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду

Потписани _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањења у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

У Београду, _____

Потпис аутора _____

Прилог 3.*образац изјаве о коришћењу***Изјава о коришћењу**

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

„Испитивање алергености природне и рекомбинантно произведене S-аденозил-L-хомоцистеин хидролазе из банане“

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство - некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство - некомерцијално - без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство - без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство - делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, _____

Потпис аутора _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име ауторана начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство - некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство - некомерцијално - без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовање или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада

дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

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