

# Određivanje tercijarne strukture nutritivnih alergena pomoću spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije (NMR)

---

Kozarić, Marta

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:441009>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Nutricionizam**

**Marta Kozarić**

7051/N

# **Određivanje tercijarne strukture nutritivnih alergena pomoću spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije (NMR)**

**ZAVRŠNI RAD**

**Modul:** Instrumentalna analiza

**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. Lidija Barišić

**Zagreb, 2018.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam**

**Zavod za kemiju i biokemiju**

**Laboratorij za Organsku kemiju**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**

**Znanstveno polje: Nutricionizam**

### **Određivanje tercijarne strukture nutritivnih alergena pomoću spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije (NMR)**

***Marta Kozarić, 0058206450***

**Sažetak:** Alergije na hranu velik su zdravstveni problem današnjice. Predstavljaju reakciju imunološkog sustava nastalu nakon konzumiranja određene hrane. U dijagnostičke svrhe koriste se dobro definirani i pročišćeni uzorci alergena. Najvažnije značajke koje određuju alergenost proteina iz hrane su: struktura i funkcija proteina, navike konzumiranja hrane, te genetska sklonost k razvoju alergije. Pokazalo se da se alergeni proteini ne razlikuju od ostalih proteina u pogledu karakterističnih strukturnih obilježja. Neki od alergeni proteina su: parvalbumini, kazeini, beta-laktoglobulini, Bet v 1 homologni alergeni iz hrane. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije jedna je od glavnih tehnika koja se koristi za proučavanje strukturnih svojstava nativnih i denaturiranih proteina. Jedan od provedenih eksperimenata pokazao je mnoge sličnosti između alergena Mal d 3 (jabuka) i Cor a 8 (lješnjak), te su alergeni svrstani u skupine ovisno o obilježjima tercijarne strukture.

**Ključne riječi:** alergeni proteini, tercijarna struktura, NMR-spektroskopija

**Rad sadrži:** 29 stranica, 15 slika, 76 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10000 Zagreb**

**Mentor:** Izv. prof. dr.sc. Lidija Barišić

**Rad predan:** 3. rujna 2018.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Bachelor thesis**

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**University undergraduate study Nutrition**

**Department of Chemistry and Biochemistry**

**Laboratory for Organic Chemistry**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**

**Scientific field: Nutrition**

**Determination of tertiary structure of nutritional allergens by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy**

***Marta Kozarić, 0058206450***

**Abstract:** Food allergies are a major health problem today. They represent the reaction of the immune system which results from eating certain foods. Well-defined and purified allergen samples are used for diagnostic purposes. The most important features that determine protein's allergenicity are: protein structure and function, eating habits, and genetic predisposition to developing allergies. It has been shown that allergenic proteins do not differ from other proteins in their specific structural characteristics. Some of the allergenic proteins are: parvalbumins, caseins, beta-lactoglobulins, Bet v 1 homologous food allergens. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy is one of the main techniques used to study structural properties of native and denatured proteins. One of the experiments has shown many similarities between allergens Mal d 3 (apple) and Cor a 8 (hazel). Also allergens are classified into particular groups depending on the features of their tertiary structure.

**Keywords:** allergenic proteins, NMR spectroscopy, tertiary structure

**Thesis contains:** 29 pages, 15 figures, 76 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10000 Zagreb**

**Mentor:** Dr. Lidija Barišić, Associate Professor

**Thesis delivered:** September 3<sup>th</sup>, 2018

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>2</b>
2.1. Alergeni.....	2
2.1.1. Alergije i alergeni u hrani.....	2
2.1.2. Detekcija alergena u hrani.....	2
2.1.3. "Liječenje" alergija.....	3
2.2. Molekulska svojstva alergena u hrani.....	4
2.2.1. Vezanje liganda.....	5
2.2.2. Primjeri alergernih proteina.....	6
2.2.2.1. Parvalbumini.....	6
2.2.2.2. Kazein.....	6
2.2.2.3. Beta-laktoglobulini ( $\beta$ Lg).....	7
2.2.2.4. Nespecifični proteini prenosioци lipida (nsLTPs).....	8
2.2.2.5. Bet v 1-homologni alergeni iz hrane.....	9
2.3. Interakcija s membranama i drugim lipidnim strukturama.....	10
2.3.1. Proteini iz grupe taumatina.....	10
2.3.2. Superobitelj prolamina.....	11
2.4. Stabilnost i pokretljivost proteina.....	11
2.4.1. Disulfidne veze.....	12
2.4.2. Glikozilacija.....	12
2.5. Ponavljajuće strukture, agregati i glikacija.....	13
2.5.1. Ponavljajuće strukture.....	13
2.5.2. Agregati i glikacija.....	13
2.6. Primjena NMR spektroskopije za određivanje tercijarne strukture alergena u hrani..	15
2.6.1. Prolaminska superobitelj-nLTPs (Mal d 3, Pru p 3, Cor a 8).....	16
2.6.2. Skladišni globulini iz sjemenki.....	21
<b>3. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>22</b>
<b>4. LITERATURA.....</b>	<b>23</b>

## 1. UVOD

Alergije na hranu predstavljaju rastući zdravstveni problem današnjice. Epidemiološko istraživanje provedeno prije deset godina pokazalo je da skoro 4% američke populacije ima alergiju na neku vrstu namirnica (Radauer i sur., 2008.). Posebno zabrinjava činjenica da se populacija alergičara udvostručila u odnosu na prethodno zabilježenih 2% (Sampson, 1999).

Alergije ili reakcije preosjetljivosti na hranu aktivirane su imunostimuliranim sustavom, dok su intolerancije na hranu uzrokovane manjkom određenog enzima ili su potaknute farmakološki aktivnim tvarima iz hrane (Muraro i sur., 2014). Alergije na hranu najčešće se javljaju u ranom djetinjstvu i ispoljavaju se kod 6-8% djece (Radauer i sur., 2008). Iako je ljudska prehrana iznimno raznovrsna, samo manji broj specifičnih namirnica i njihovih sastojaka izazivaju većinu alergija (Sampson, 2004). Namirnice koje najčešće uzrokuju alergijske reakcije su mlijeko, jaja, kikiriki, sezam, riba i morski plodovi (Radauer i sur., 2008). I namirnice biljnog podrijetla u određenoj mjeri sadrže alergene, te također izazivaju alergijske reakcije (Jenkins i sur., 2005).

Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije je najmoćnija metoda za određivanje strukture organskih molekula. NMR-spektroskopijom mogu se detektirati jezgre s neparnim atomskim ili neparnim masenim brojem ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$  i  $^{19}\text{F}$ ), koje uslijed vrtnje oko svoje osi generiraju jezgrin (nuklearni) spin. Uslijed sprege spinova susjednih vodikovih jezgri dolazi do cijepanja signala u dublete, triplete, kvartete i više multiplete, i to po pravilu  $N+1$ , gdje  $N$  označava broj ekvivalentnih protona na susjednom ugljikovom atomu. U analizi hrane koriste se dvije vrste NMR-spektroskopije: (i) NMR-spektroskopija niske razlučivosti (engl. *Low Resolution NMR, LR-NMR*) i (ii) NMR-spektroskopija visoke razlučivosti (engl. *High Resolution NMR, HR-NMR*). Osim niskom razlučivošću, LR-NMR-spektroskopija karakterizirana je i jednostavnijom izvedbom i povoljnijom cijenom instrumenta. S druge strane, HR-NMR-spektroskopija predstavlja precizniju i ujedno skuplju metodu. Analize NMR-spektroskopijom primjenjuju se u forenzici hrane, primjerice pri određivanju zemljopisnog podrijetla i senzorskih svojstava pojedinih sorti vina, kakvoće maslinovog ulja, piva, kave, zelenog čaja, mesa i ribe kao i za određivanje udjela prirodnog soka u mješavinama (Butorac i sur., 2013).

Cilj ovog rada jest istražiti postoje li ikakve strukturne sličnosti specifične za različite alergene iz hrane. Nadalje, u ovom će se radu opisati primjena NMR-spektroskopije pri određivanju tercijarne strukture alergena u hrani. Ovisno o obilježjima tercijarne strukture alergeni su svrstani u određene skupine.

## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1. Alergeni**

Alergeni su antigeni proteinske strukture. Riječ je o inače bezopasnim molekulama koje u preosjetljivih ljudi induciraju alergijsku reakciju. Izvor alergena mogu biti razne čestice, tkiva, hrana ili organizmi (npr. mačja dlaka, mlijeko, *Aspergillus fumigatus*, pelud itd.). Alergenski ekstrakt je nepročišćena smjesa alergenskih i drugih proteina, lipida i polisaharida. Dobiven je ekstrakcijom iz prirodnih izvora, npr. zrna polena. Alergenska komponenta je protein ili glikoprotein koji je identificiran pomoću specifičnog IgE (sIgE) antitijela. Može se izolirati iz prirodnog izvora (prirodni, pročišćeni alergen) ili se proizvesti rekombinantnom DNA tehnologijom (Stipić Marković i sur., 2015).

#### **2.1.1. Alergije i alergeni u hrani**

Prethodna dva desetljeća provedena su mnoga istraživanja kako bi se identificirali nutritivni alergeni proteini iz namirnica biljnog i životinjskog porijekla, odredile njihove fizikalno-kemijske karakteristike, te interakcije sa stanicama imunskog sustava. Pokazalo se da samo manji broj proteinskih skupina sadrži alergene koji se nalaze u hrani (Radauer i sur., 2008). Najznačajnije grupe proteina koje imaju alergeni potencijal iz hrane biljnog porijekla su: 2S albumini, nespecifični proteini prenosioci-lipida, Bet v 1 proteini te proteini iz sjemenki biljaka (Hoffmann-Sommergruber i Mills, 2009).

Za alergije tipa 1 važno je prisustvo specifičnih IgE protutijela koja su usmjerena protiv određenih komponenata iz hrane (Muraro i sur., 2014). Među namirnicama životinjskog porijekla najznačajnije grupe proteina koje imaju alergeni potencijal su tropomiozini i proteini koji sadrže EF-šaku, odnosno strukturnu domenu koja sadrži motiv uzvojnica-petlja-uzvojnica. Tropomiozini se nalaze u mekušcima, rakovima i ribljim parazitima, te uzrokuju alergijske reakcije. Motiv EF-šake karakterističan je za kalcij-vezujuće proteine, poput parvalbumina, glavnog alergena iz ribe te mliječnog proteina kazeina.

#### **2.1.2. Detekcija alergena u hrani**

U dijagnostičke svrhe koriste se dobro definirani i pročišćeni uzorci alergena. Proteinski alergeni mogu biti izolirani iz prirodnih izvora ili se mogu proizvesti rekombinantnom DNA-tehnologijom. Za svaki protein postoje odgovarajući protokoli izolacije i pročišćavanja, a konačni uzorak mora imati ispravnu primarnu strukturu i obilježja koja su

jednaka nativnom proteinu. U pročišćenom proteinu istražuje se prvenstveno alergena aktivnost, a potom i enzimska (ukoliko postoji) (Hoffmann-Sommergruber i sur., 2009). Vrlo je širok raspon metoda koje se koriste za određivanje čistoće proteina, utvrđivanje njihove sekundarne strukture, kao i alergene aktivnosti. Primjerice, čistoća proteina ispituje se pomoću natrij-dodecilsulfat (SDS)-elektroforeze, no detaljnije informacije mogu se dobiti primjenom 2D-elektroforeze, visokodjelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC) ili kapilarne elektroforeze. Molekulska masa proteina najpouzdanije se određuje MALDI-spektrometrijom (matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija) (Piras i sur., 2016). Nadalje, CD-spektroskopijom (cirkularni dikroizam) moguće je utvrditi prisutnost različitih elemenata sekundarne strukture (uzvojnica,  $\beta$ -nabrana ploča, okret) u proteinskoj strukturi. Međutim, detaljniji uvid u strukturu proteina omogućuje isključivo spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR). Tijekom prve provedene analize proteinskih alergena pomoću NMR-spektroskopije, dobivene su i informacije o strukturnim promjenama koje se događaju tijekom toplinske obrade namirnica (Alessandri i sur., 2012). Kristalografija x-zrakama (X-ray) se, uz 2D-NMR-spektroskopiju, koristi za još precizniju analizu (Offermann i sur., 2015).

Klinička ispitivanja mogućih uzročnika alergijskih reakcija provode se testovima na koži i *in vitro* dijagnostičkim testovima za određivanje specifičnih IgE protutijela (Hoffmann-Sommergruber i sur., 2015). Tijekom prošlog desetljeća razvijeni su protokoli za testiranje pojedinačnih alergena. Takvim testiranjima utvrđuje se alergijska preosjetljivost pojedinca na manji broj alergena, što pomaže u određivanju potencijalne križne reaktivnosti s drugim alergenima. Time se smanjuje primjena nepotrebnih eliminacijskih dijeta što pacijentima omogućuje bolju kvalitetu života.

### **2.1.3. "Liječenje" alergija**

Zbog visoke cijene, postojeće imunoterapije teško su dostupne rastućem broju pacijenata koji pate od nutritivnih alergija. Da bi se izbjegle iscrpljujuće i zahtjevne eliminacijske dijeta, neophodna je precizna dijagnoza, odnosno utvrđivanje uzročnika alergijske reakcije. Kako ne postoji jedinstveni tretman za liječenje alergija, preporuča se izbjegavati izvore alergena. Međutim, deklariranje alergena na prehrambenim proizvodima nerijetko je nepotpuno. Zbog toga prehrambena industrija i regulatorne agencije intenzivno razvijaju strategije za pronalaženje najboljih analitičkih metoda za određivanje, ali i za ispravno deklariranje alergena (Muraro i sur., 2014). U tom smislu identifikacija i kvantifikacija proteina u hrani dovodi do bolje procjene razine alergenosti kojoj će potrošač biti izložen (Houston i sur., 2011).



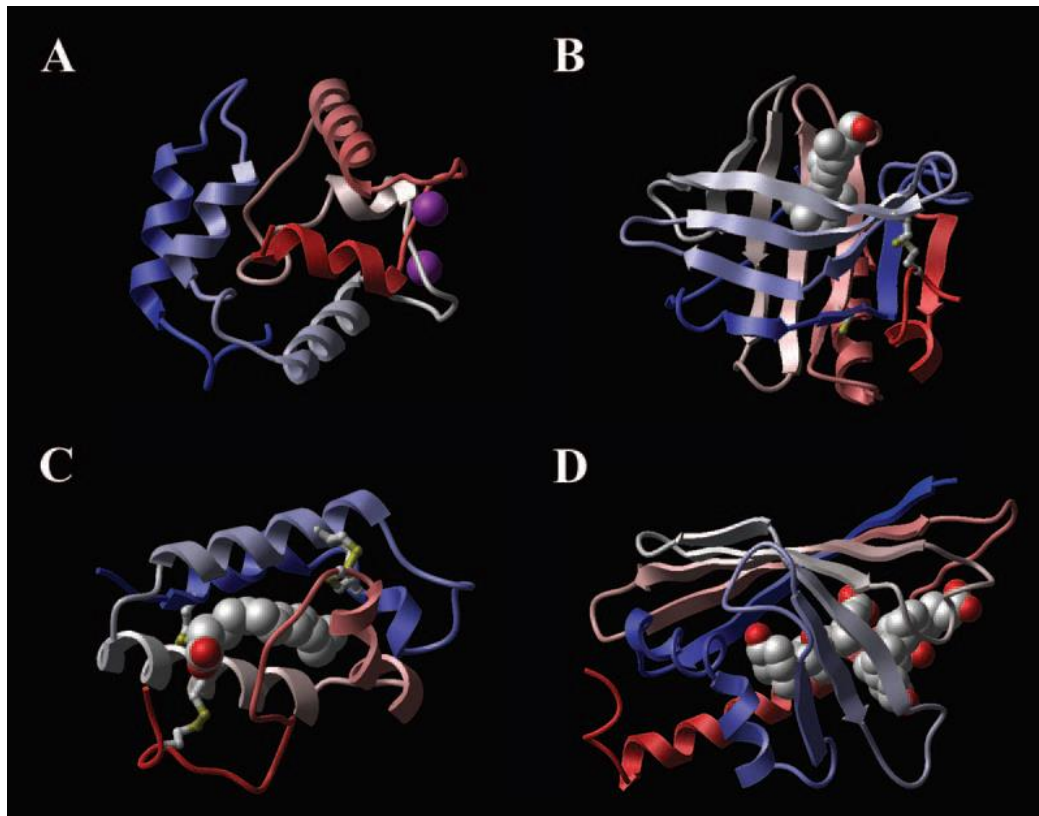
## 2.2. Molekulska svojstva alergena u hrani

Znanstvena zajednica, kao i regulatorne agencije, pokazuju veliko zanimanje za procjenu alergijskog učinka proteina iz hrane, što predstavlja bitan aspekt sigurnosne procjene nove hrane koja dolazi na tržište. Razvio se značajan interes za primjenu bioinformatičkih pristupa za identifikaciju potencijalnih alergena (Brusic i sur., 2003). Prema mišljenju stručnjaka iz Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (FAO) i Svjetske zdravstvene organizacija (WHO), određeni protein pokazuje potencijalnu križnu reaktivnost ukoliko, u usporedbi s poznatim proteinskim alergenima, sadrži barem šest identičnih aminokiselina u slijedu ili minimalno 35% podudarnosti sa sekvencijom koju čini više od 80 aminokiselina (Hileman, 2002). U jednom istraživanju (Soeria i sur., 2004) opisane su bioinformatičke metode primjenjive za otkrivanje potencijalne alergenosti proteina. Te se metode baziraju na kvantitativnom određivanju sličnosti u sekvenciji određenog proteina s već poznatim alergenima. Osim toga, relevantnim metodama smatraju se i identifikacija specifičnih IgE epitopa koji su posebno značajni za određivanje potencijalnih križno-reaktivnih alergena (Kleter i Peijnenberg, 2002), kao i mogućnost sparivanja upitne sekvencije s poznatim IgE epitopom na temelju informacije o strukturi i sekvenciji proteina (Ivanciuc i sur., 2003).

Kao i u slučaju inhalatornih alergena (Pomes, 2002), najvažnije značajke koje određuju alergenost proteina iz hrane su: struktura i funkcija proteina, navike konzumiranja hrane, te genetska sklonost k razvoju alergije. Cijelom procesu procjene rizika treba pristupiti korak po korak, zbog činjenice da nijedan od kriterija ne predviđa u dovoljnoj mjeri određenu alergenost. Razmatranjem strukturnih svojstava proteinskih alergena (Aalberse, 2000), došlo se do spoznaje da se alergeni proteini ne razlikuju od ostalih proteina u pogledu karakterističnih strukturnih obilježja. Nadalje, utvrđeno je da osim strukturnih i funkcionalna svojstva proteina igraju važnu ulogu u osjetljivosti i alergijskom odgovoru (Bredehorst i David, 2001). Naime, postoji niz potencijalno vrlo važnih funkcionalnih i fizikalnih svojstava koja su zajednička mnogim alergenim proteinima iz hrane, a neka od njih (prisutnost višestrukih, linearnih IgE vezujućih epitopa i rezistencija proteina na razgradnju i obradu) povezuju se s alergenima iz hrane.

### 2.2.1. Vezanje liganda

Određeni alergeni proteini iz hrane mogu vezati različite ligande, poput metalnih iona i lipida. Pojedini ligandi, kao što su metalni ioni, integrirani su unutar trodimenzijske strukture proteina, pri čemu se često „ukopavaju“ duboko unutar molekule (slika 1). Odsustvo metalnog liganda često remeti pravilno nabiranje proteina, uslijed čega dolazi do povećanja polipeptidne mobilnosti, te čak u nekim slučajevima i do djelomičnog razmotavanja visokouređene strukture. S druge strane, vezanje liganda može dovesti do smanjenja mobilnosti odnosno konformacijske fleksibilnosti polipeptidnog lanca, te istodobno povećavati proteolitičku stabilnost. Proteini kao što su lipokalini i nespecifični proteini prenosioci lipida, pokazuju izrazitu stabilnost kada je na tome mjestu vezana lipidna molekula (Bannon, 2004).



**Slika 1.** Vezanje liganda; A: parvalbumin koji sadrži 2 mjesta za vezanje kalcija označena ljubičastom bojom (Declercq i sur., 1991), B: goveđi beta-laktoglobulin (Bos d 5) s vezanim retinolom (O'Neill i Kinsella, 1987), C: nespecifični protein prenosioc lipida iz kukuruza s vezanom palmitinskom kiselinom (Douliez i sur., 2000), D: alergen Bet v 1 iz peluda breze s vezane 2 molekule deoksikolata (Markovic-Housley i sur., 2003)

## 2.2.2. Primjeri alergeni proteina

### 2.2.2.1. Parvalbumini

Parvalbumini sadrže kalcij-vezujuću domenu koja se još naziva EF-šaka (Lewit-Bentley i Rety, 2000) (slika 2). Sadrže tri takve EF-šake, od kojih dvije vežu kalcij, a treća preostala domena je "tiha" domena koja poput kape prekriva hidrofobnu površinu dviju funkcionalnih domena (Declercq i sur., 1991). Velika količina ovog proteina (i do 5 mg parvalbumina/g mase ribe) u bijelim mišićima mnogih ribljih vrsta smatra se važnom za relaksaciju mišićnih vlakana vezanjem slobodnog unutarstaničnog kalcija (Pauls i sur., 1996). Parvalbumini pokazuju značajnu rezistenciju na toplinu, denaturirajuće kemikalije te proteolitičke enzime (Elsayed i Aas, 1971). Procjenjuje se da je IgE-vezujuća aktivnost konzervirane ribe 100 do 200 puta manja nego kod kuhane ribe. Ipak, nakon kuhanja ostaje dovoljna količina reaktivnih IgE epitopa koji su okidač za alergijske reakcije, što je bilo dokazano dvostruko-slijepim placebo-kontroliranim istraživanjem (Barnhisel-Broadbent i sur, 1992).

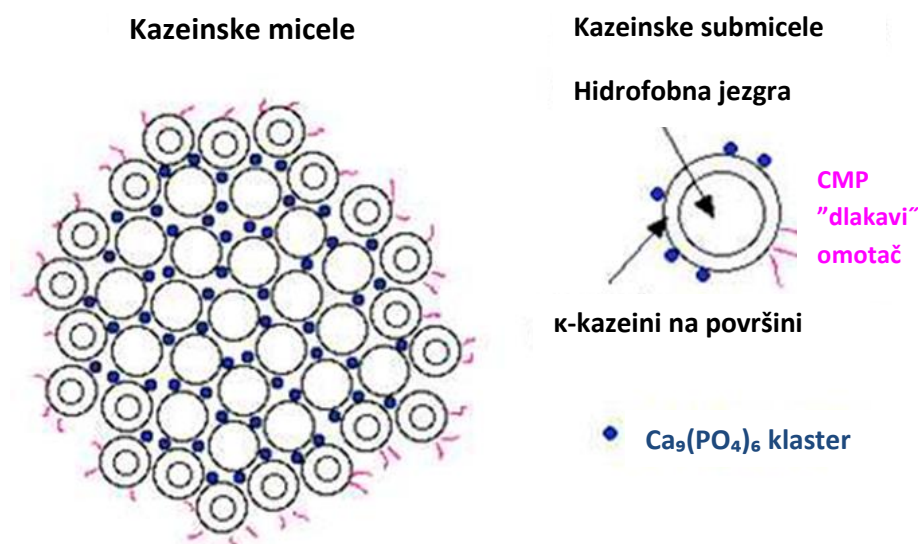


**Slika 2.** EF-šaka se sastoji od 2 uzvojnice povezane petljom. Ime dolazi od E i F uzvojnica u petlji parvalbumina. Petlja sadrži dijelove za koordinaciju kalcijevog iona ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Rajesh, 2014).

### 2.2.2.2. Kazein

Kazein je glavni alergen u kravljem mlijeku (slika 3). Također može vezati kalcij, ali na drugačiji način nego parvalbumini. Grupe fosfoserinskih, fosfotreoninskih ostataka, te  $\beta$ -kazeini keliraju s metalnim ionima, uključujući i kalcij. Formiraju mikrostrukture koje se zovu

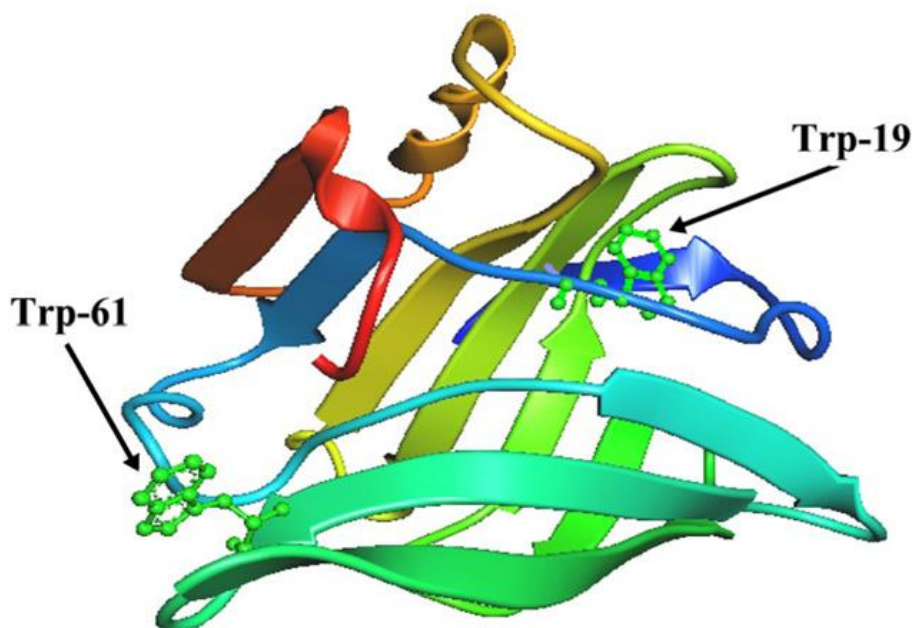
nanoklasteri (Holt i sur., 1998) u kojima je amorfnu kalcijev fosfat izdvojen unutar omotača sačinjenog iz kazeinskih polipeptida. Takve se nanostrukture nakupljaju u puno veće strukture koje sadrže oko 1000 nanoklastera što odgovara micelama kazeina u mlijeku (Tuinier i de Kruif, 2002). Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se povezali kazeinski nanoklasteri s alergeni potencijalom kazeina, iako defosforilacija smanjuje vezanje IgE protutijela na kazein (Bernard i sur., 2000).



**Slika 3.** Struktura kazeinske micelle (Šumić, 2008)

### 2.2.2.3. Beta-laktoglobulini (βLg)

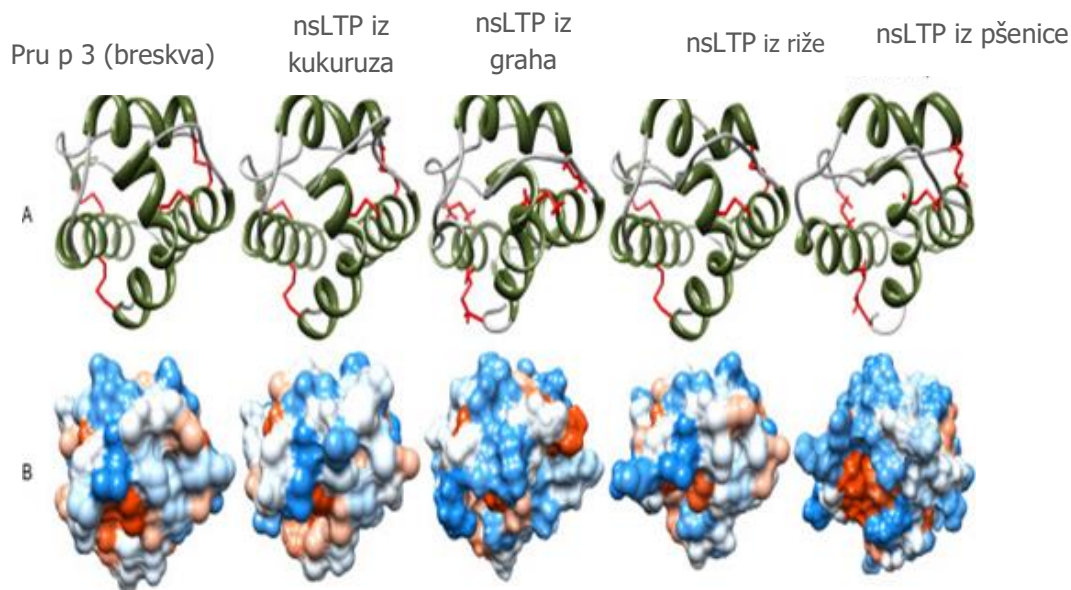
Beta-laktoglobulini svrstavaju se u lipokalinsku skupinu ekstracelularnih lipid-vezujućih proteina, a ujedno su najbolje istraženi lipid-vezujući proteini (slika 4). Vežu različite molekule, uključujući retinol i njegove analoge, β-karoten, zasićene i nezasićene dugolančane masne kiseline, te alifatske ugljikovodike (O'Neill i Kinsella, 1987). Pretpostavlja se da je vezanje liganda određeno otvaranjem-zatvaranjem EF-petlje što ovisi o pH-vrijednosti (Ragona i sur., 2003).



**Slika 4.** 3D struktura beta-laktoglobulina (Kanakis i sur., 2011)

#### 2.2.2.4. Nespecifični proteini prenosioi lipida (nsLTPs)

Nespecifični proteini prenosioi lipida su molekule koje, za razliku od  $\beta$ -laktoglobulina, mogu vezati lipide unutar tunela obloženog hidrofobnim ostacima (slika 5). Pšenični nespecifični protein prenosioi-lipida s visokim afinitetom veže dugolančane masne kiseline i fosfolipide (Douliez i sur., 2000). Šupljina proteina (tunel) je iznimno prilagodljiva i omogućuje vezivanje različitih lipofilnih molekula, uključujući i sfingolipide, prostaglandine i sl. (Pato i sur., 2001). Trodimenzijska struktura nsLTP-proteina karakteristična je za prolaminsku grupu proteina. Pokazalo se da neki proteini, poput AceAMP1 iz korijena luka, nemaju unutrašnju šupljinu, te samim time ni mogućnosti vezanja lipida (Tassin i sur., 1998).



**Slika 5.** Trodimenzijska struktura nespecifičnih proteina prenosioca lipida (nsLTPs). Svima je zajedničko da sadrže 4  $\alpha$ -uzvojnice (označeno zelenom bojom na slici) (Hauser i sur., 2010).

#### 2.2.2.5. Bet v 1- homologni alergeni iz hrane

Bet v 1- homologni proteini pripadaju skupini proteina povezanih s patogeneza (PR-10 skupina proteina). Homolozi Bet v 1 proteina formiraju skupinu proteina koja je identificirana u velikom broju biljnih vrsta (slika 6) (Breiteneder i Ebner, 2000). Otkriće velike strukturne sličnosti između Bet v 1 proteina i domene humanog proteina MLN64 odgovorne za vezanje steroida indiciralo je moguću uključenost Bet v 1-homolognih proteina u transport steroidnih liganada, što potencijalno ima važnu ulogu u steroidogenezi u placenti i mozgu (Tsujišita i Hurley, 2000). Primjenom NMR-spektroskopije dokazano je da Pru av 1 protein iz trešnje, koji je homologan proteinu Bet v 1, stupa u interakciju s fitosteroidima (Neudecker i sur., 2001). Pokazalo se da su simptomi oralnog alergijskog sindroma povezani s labilnim alergenima, dok su anafilaktičke reakcije povezane sa stabilnim alergenima iz hrane (Vieths i sur., 2002). Također, alergen Gly m 4 iz soje koji je homologan Bet v 1 proteinu može izazvati snažan oralni alergijski sindrom i ozbiljne sistemske reakcije kod pojedinaca s alergijom na pelud (Kleine-Tebbe i sur., 2002).



	1				50
Bet v 1	GVFNTEETTT	SVIPAARLFK	AFILDGDNLF	PKVAPQAISS	VENIEGNGGP
Mal d 1	-Y F-N-*	-E P-S-	-V -A- I	-S -K- A-IL	-K A-IL
Pyr c 1	-LYTF-N-	-E P-P-	-V -A- I	-S -K- A-IL	-K A-IL
Pru av 1	-T T-S	-E P-P-	-V -A- V	-S -K- S-IL	-D -D-
Pru ar 1	-T T-S	-E P-P-	-V -GP- V	-S -K- S-IL	-D -D-
Api g 1	-QTHVL-L	-T T-S	-VI-V- VL	-A -Y-	-K -K-
Dau c 1	-AQSLS-I	-T T-S	-IV-V- VI	-A -Y-	-VK -A-
PcPR1	-QKS-V	-T T-S	-LC-I- L	-Q-L- S-TL	-V -V-
pSTH-2	-TS-TH-*	-TP-APT-*	-LVV-S-*	-LM- VKN-I	-AE-D
	51				100
Bet v 1	GTIKKISFPK	GFPPKYVKDR	VDEVDHTNFK	YNYSVIEGGP	IGDTLEKISN
Mal d 1	-T T-G	-SQYQ- H	-I -SI- EASY	-S -TL- DA	-L T-I- K
Pyr c 1	-T T-G	-SQYQ- H	-I -SI- EASY	-A -TL- DA	-L T-I- K
Pru av 1	-T T-G	-SQYQ- HK	-I -SI- KE-Y	-S -TL- DA	-L L-T- I
Pru ar 1	-T T-G	-SQYQ- HK	-I -SI- KE-HS	-S -TL- DA	-L L-T- I
Api g 1	-L-I-T-D	-G-I-T-TL	-I-G-NKEAL	-FD- -	-E- -
Dau c 1	-VRI-T	-S-ITS-TV	-T-A-NKEAL	-DST- -	-ET- -
PcPR1	-S-VLRVGD	-AS--T-QK	-AI-KAT-	-S-I- -	-N- -
pSTH-2	--MN-V	--S-I--L-HK	-IHV--DK-LV	-TK--M-*	-L--K--S--Y
	101				150
Bet v 1	EIKIVATPQG	GSILKISNKKY	HTKGDHEVKA	EQVKASKKMG	ETLLRAVESY
Mal d 1	-T L-CGS	-T L-SISH	---NI- I	-H-VG- KA	-HG- FKLI
Pyr c 1	-A L-SGS	-T L-SISH	---I- I	-H-VG- KA	-HG- FKLI
Pru av 1	-T L-S-S	-T L-SISH	---NV- I	-H-VG- KA	-SN- FKLI
Pru ar 1	-T L-S-S	-T L-SISH	---NV- I	-H-VG- KA	-SN- FKLI
Api g 1	-VVL- -	-C-TA- -	-V- -	-H-VG- KA	-TA- -
Dau c 1	-LVV- -	-T-TA- -	-V- -	-H-VG- KA	-TA- -
PcPR1	-FTA- -	-CIV-S- -	-N- -	-H-VG- KA	-L-I- -
pSTH-2	-DL-FE-HGN	-CVC-SITE-	---YVL-D	-EDREGQKQ-	-ME-FKI--A-
	151				
Bet v 1	LAHSDAYN*				
Mal d 1	-KQHP-*				
Pyr c 1	-KQHP-*				
Pru av 1	-KQHP-*				
Pru ar 1	-KQHP-*				
Api g 1	-KQHP-*				
Dau c 1	-KQHP-*				
PcPR1	-KQHP-*				
pSTH-2	--NPSV-A*				

**Slika 6.** Usporedba aminokiselinskih ostataka Bet v 1 homolognih proteina iz biljaka: Mal d 1 iz jabuke, Pyr c 1 iz kruške, Pru av 1 iz trešnje, Pru ar 1 iz marelice, Api g 1 iz celera, Dau c 1 iz mrkve, PcPR1 iz peršina, te pSTH-2 iz krumpira (Breiteneder i Ebner, 2000).

### 2.3. Interakcija s membranama i drugim lipidnim strukturama

Mnogi alergeni biljnog porijekla mogu se povezati sa staničnim membranama i drugim tipovima lipidnih struktura koje su prisutne u hrani. Iako biljke nemaju imunski sustav, razvile su niz obrambenih mehanizama uključujući sintezu niskomolekulskih proteina i peptida koji imaju antifungalnu aktivnost. Uočeno je da proteini destabilizacijom membrana bakterija ili gljiva štite biljke od mikrobnih patogena. Primjeri takvih proteina su proteini iz grupe taumatina, 2 tipa proteina iz grupe prolamina (2S albumini i nespecifični proteini prenosioci-lipida), te određeni defenzini. Općenito, takvi proteini nisu specifični za određenu vrstu, te imaju širok raspon aktivnosti (Selitrennikoff, 2001).

#### 2.3.1. Proteini iz grupe taumatina

Mnoge biljne vrste koje se koriste u svakodnevnoj konzumaciji hrane sadrže proteine strukturno slične taumatinu, intenzivno slatkoj proteinskoj molekuli iz ploda afričke biljke *Thaumatococcus daniellii*. Ti se proteini svrstavaju u skupinu taumatina (TLPs)

(Selitrennikoff, 2001). Navedeni proteini izolirani su iz velikog broja biljnih vrsta. Pokazalo se da mnogi proteini iz navedene skupine inhibiraju rast gljiva, među kojima je i alergen Mal d 2 iz jabuke (Krebitz, 2003). Još se ne zna točan mehanizam takvog procesa, ali smatra se da je rezultat permeabilnosti fungalnih membrana (Vigers i sur., 1991). Također se mogu vezati na lipidni dvosloj koji je sastavljen od sfingolipida, fosfolipida i sterola. To su molekule koje se nalaze u membranama svih živih organizama (Anzlovar i sur., 1998).

### **2.3.2. Superobitelj prolamina**

2S albumin svrstava se u prolamine, biljne proteine iz sjemenki žitarica. Riječ je o skladišnom proteinu koji je odgovoran za različite funkcije, uključujući i antifungalnu aktivnost (Terras i sur., 1992). Pokazano je da 2S albumin Sin a 1 iz biljke gorušice može stupiti u interakciju s fosfolipidnim vezikulama (Onaderra i sur., 1994). Postoji oko 20 lipidnih molekula koje se vežu sa svakim 2S albuminom, a navedeni protein uzrokuje agregaciju vezikula (Zachowski, 1993). To je dovelo do zaključka da navedene interakcije mogu utjecati na ispoljavanje takvih alergena u gastrointestinalnom traktu, uz mogućnost da biološka aktivnost proteina smanjuje njihov alergeni potencijal (Onaderra i sur., 1994). Pored interakcija s membranskim lipidima, brojni proteini iz hrane ulaze u interakciju s lipidima kako bi formirali emulgirane i druge strukture, primjerice tokom pripreve majoneze. Fiziološki značaj takvih interakcija s obzirom na alergeni potencijal nespecifičnih proteina prenosioca lipida ostaje još za istražiti.

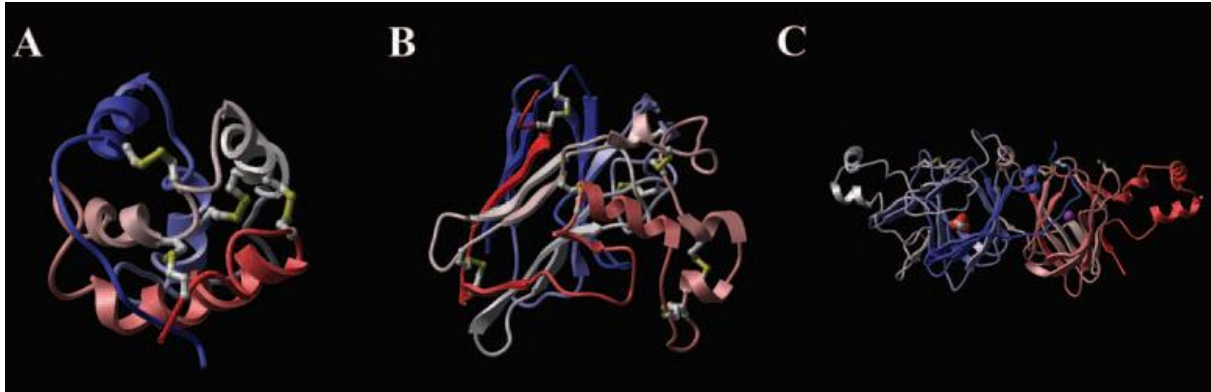
Mnogi alergeni proteini iz hrane kao što su proteini sirutke, kazein te skladišni proteini iz zrna soje prisutni su u hrani u emulgiranom obliku. Nakon adsorpcije na lipidni sloj u emulziji, dolazi do razmatavanja nabranih proteinskih lanaca pri čemu se oslobađaju njihove hidrofobne regije. Tako izložene hidrofobne regije potom stupaju u interakcije s lipidima. Iako su emulzije i druge lipidne strukture često korištene kao pomoćna sredstva za povećanje razine protutijela, nije poznat njihov utjecaj na alergeni potencijal namirnica. Jasno je, međutim, da će protein koji je izložen imunosnom sustavu biti barem djelomično denaturiran (Wagner i sur., 1999).

### **2.4. Stabilnost i pokretljivost proteina**

Stabilnost proteina odnosi se na njegovu sposobnost da zadrži svoju originalnu, nativnu trodimenzijsku strukturu pri različitim uvjetima, npr. nakon izlaganja povišenoj temperaturi. Također, stabilnost se odnosi i na rezistenciju na djelovanje proteaza. Postoje određeni



pokazatelji da termostabilni proteini češće poprimaju strukturu  $\beta$ -ploče, te da su u prosjeku manji. Mogući razlog tome je njihov manji kapacitet zagrijavanja (slika 7) (Chakravarty i Varadarajan, 2000).



**Slika 7.** Prikazi trodimenzijskih, nabranih struktura alergeni proteina ili njihovih homologa. A. Jednolančani 2S albumin iz suncokreta (Dominguez i sur., 1990). B: Protein taumatin iz biljke *Thaumatococcus daniellii* (Min i sur., 2004). C. Glicinin iz soje s prikazom homoheksamerne podjedinice (Chakravarty i Varadarajan, 2000).

#### 2.4.1. Disulfidne veze

Disulfidne veze čine važno strukturno svojstvo koje se povezuje sa stabilnošću proteina. Općenito gledajući, inter- i intralančane disulfidne veze ograničavaju konformacijsku slobodu i stabiliziraju trodimenzijsku strukturu molekule, što smanjuje moguću destabilizaciju djelovanjem topline ili kemikalijama. Velik broj alergena iz hrane [alergeni iz prolaminskih proteina (2S albumini, nespecifični proteini prenosioci-lipida, itd.)] sadrže brojne disulfidne veze. Primjerice, 2S albumini su kompaktne molekule jer sadrže 4 očuvane disulfidne veze, a to ukazuje na visoku razinu termostabilnosti i rezistenciju na ekstremne pH-vrijednosti i proteolizu (Dominguez i sur., 1990).

#### 2.4.2. Glikozilacija

Kod mnogih ekstracelularnih proteina dolazi do glikozilacije tijekom njihovog prolaza kroz endoplazmatski retikulum. Imunološka aktivnost IgE protutijela usmjerena je protiv ugljikohidratnog djela glikoalergena, što se ispituje nakon otkrića *N*-glikan-specifičnih IgE protutijela (van Ree, 2002). Ugljikohidratno-specifična IgE protutijela kod pacijenata s

alergijom na pelud križno reagiraju s hranom biljnog porijekla, ali se kod pacijenata nisu javljali klinički simptomi. Glikozilacija također utječe na biološka svojstva alergena. *N*-glikozilacija može značajno utjecati na stabilizaciju proteinske strukture (Wormald i Dwek, 1999), te je dokazano da povećava stabilnost i rezistenciju na denaturaciju kemijskim sredstvima 7S globulina iz graška (Pedrosa i sur., 2000).

## **2.5. Ponavljajuće strukture, agregati i glikacija**

Imunološki sustav ima ulogu u obrani organizma od stranih tijela. Imunogeničnost je svojstvo antigena da izazove specifičnu imunoreakciju nakon unosa određene tvari (Mijić i sur., 2009). Ponavljajuće strukture i sklonost agregiranju mogu utjecati na imunogeničnost, bilo da se radi o fiziološkim uvjetima ili kao posljedica prerade hrane (Chirino i sur., 2004). Povećanjem valencije IgE epitopa također može doći do porasta imunogeničnosti, te posljedično do otpuštanja histamina iz mastocita (Braun i sur., 1997). Neki od alergena u hrani koji sadrže ponavljajuće strukture su tropomiozini iz školjaka i prolamini iz zrna žitarica, a mogu formirati agregate.

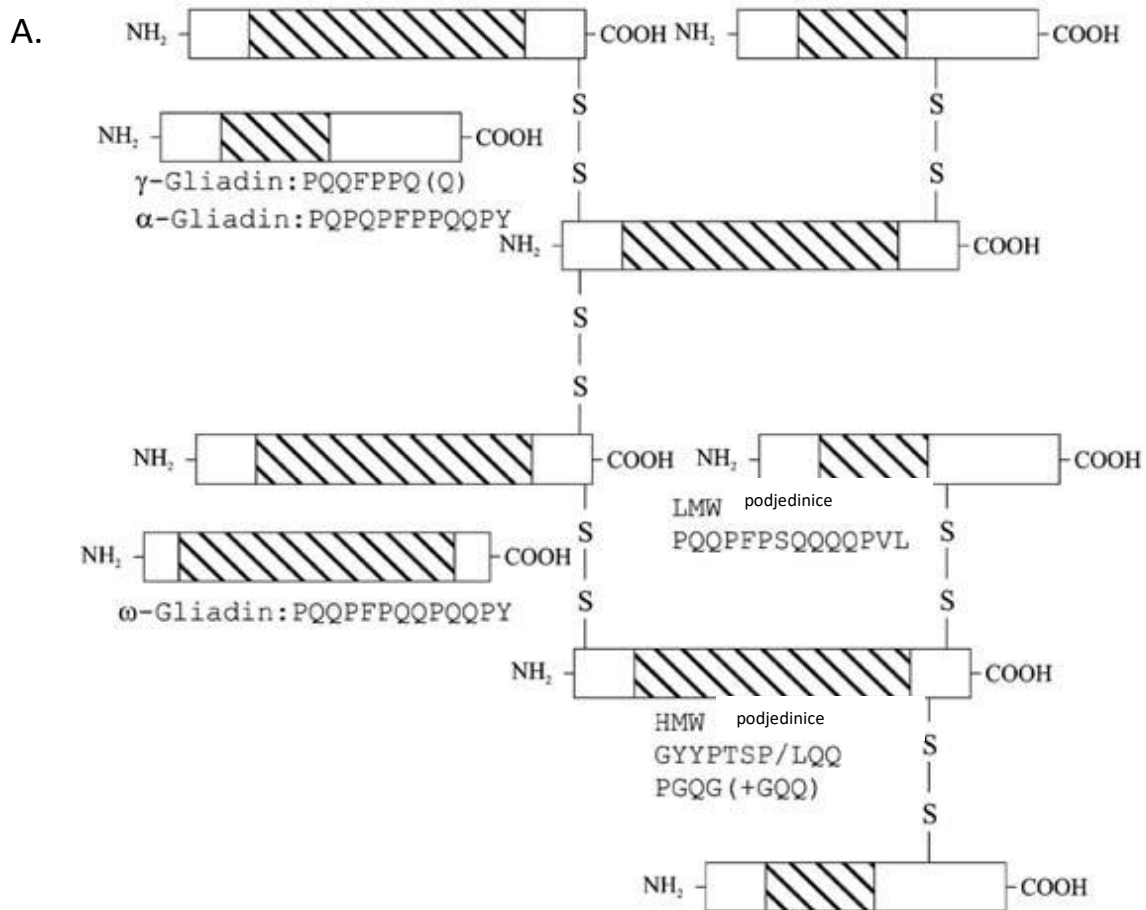
### **2.5.1. Ponavljajuće strukture**

Tropomiozini su proteini prisutni u mišićnim i nemišićnim stanicama (Brown i sur., 2001). S aktinom i miozinom sudjeluju u mišićnoj kontrakciji. Predstavljaju termostabilne, križno-reaktivne alergene u hrani. Pokazalo se da ekstrakti iz kuhanog škampa sadrže Pen a 1 alergen s nepromijenjenim alergenim potencijalom (Naqpal i sur., 1989). Također sadrže alergene koji su topljivi u vodi, te se otpuštaju tijekom kuhanja u vodu (Lehrer i sur., 1990). Ponavljajuće strukture su također karakteristično svojstvo mnogih reomorfni proteina, a prolamini sadrže vrlo nestabilne ponavljajuće sekvence, te su bogate prolinom i glutaminom (slika 8) (Brett i sur., 1999).

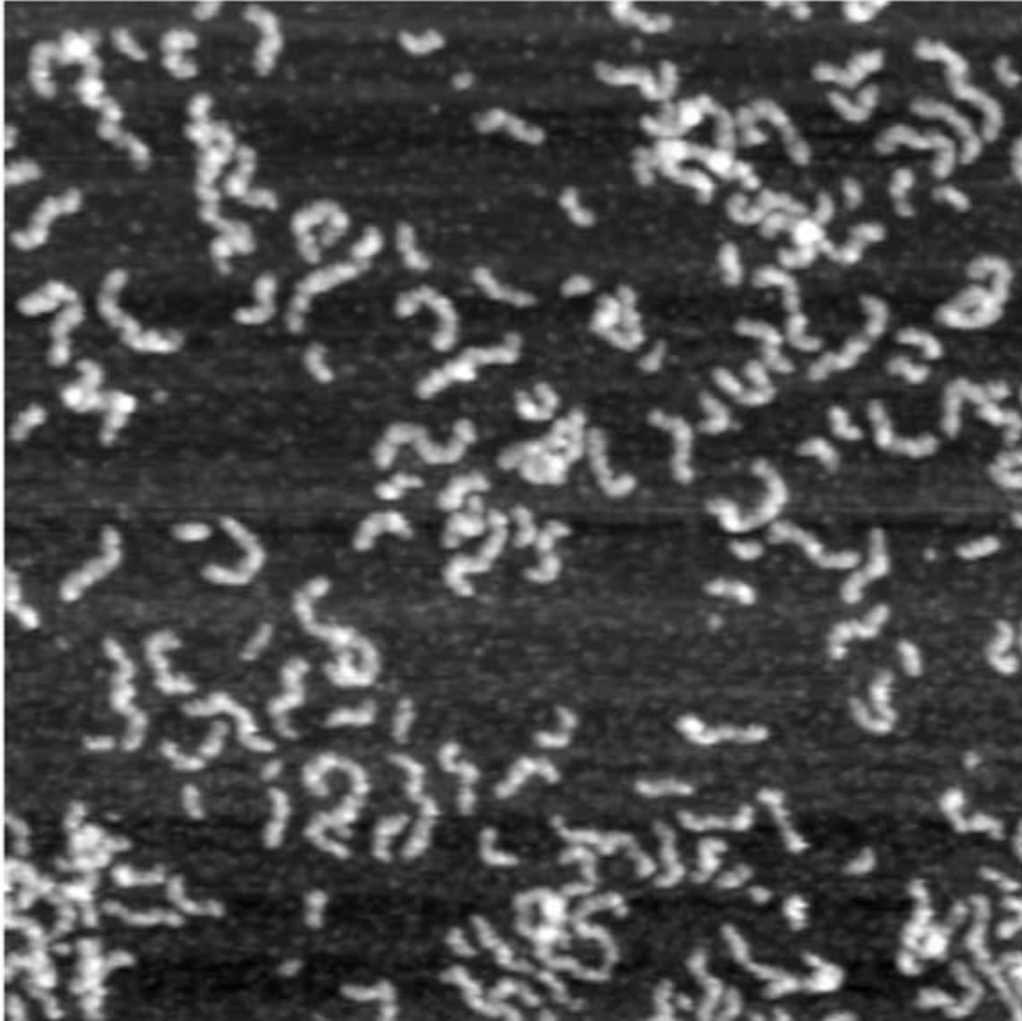
### **2.5.2. Agregati i glikacija**

Globulini iz zrna žitarica mogu formirati velike 3D-strukture. Pojavljuju se u obliku trimerâ i heksamerâ, a u slučaju 11S globulina iz soje i dodekamerâ koji su stabilizirani nekovalentnim interakcijama (Wolf i Nelsen, 1996). Nakon toplinske obrade namirnice, mogu formirati gelove. 11S i 7S globulini su termostabilni. Dok se 7S globulini razmataju pri 70-75 °C, 11S globulini razmataju se pri temperaturama višim od 94 °C. Razmatanje dijelova

polipeptidnog lanca rezultira gubitkom uređene kvaterne strukture, te posljedično formiranjem velikih agregata. Kada dosegnu određenu veličinu, formiraju ili gelove ili pahuljaste taloge. Kod visoke koncentracije proteina (5-10 %) formiraju mreže gelova (Mills i sur., 2003). Za razliku od soje i leće, kikiriki i ostalo orašasto voće često se obrađuju termičkim procesima poput prženja čime se smanjuje udio vode. Kako denaturacija zahtijeva prisutnost vode, proteini su stabilniji u sustavima s nižim udjelom vode (Gekko i Timasheff, 1981). Glikacija je reakcija ne-enzimske adicije šećera na protein(e), za razliku od glikozilacije koja je enzimski katalizirana reakcija. Postoje određeni pokazatelji da bi reakcije glikacije mogle biti odgovorne za povećanje alergene aktivnosti u kikirikiju nakon procesa kao što su prženje ili konzerviranje (Chung i sur., 2003). Zbog toplinskog tretmana, bilo da se radi o kuhanju ili prženju, dolazi do denaturacije ili modifikacije proteina, pa različiti procesi različito utječu na alergenostrukturu pojedine hrane.



B.



**Slika 8.** Ponavljajuće strukture i agregati. A. Struktura tipičnih pšeničnih prolamina, B. Toplinski inducirani agregati 7S globulina iz soje (Brett i sur., 1999).

## **2.6. NMR-spektroskopska analiza strukturnih svojstava alergeni proteina iz hrane**

Imunoglobulin E (IgE), vrsta protutijela prisutna isključivo u sisavcima, ima esencijalnu ulogu u alergijskim reakcijama. Alergija na hranu posredovana IgE protutijelima uzrokovana je prepoznavanjem i vezivanjem alergeni proteina (male skupine netoksičnih dijetarnih proteina životinjskog ili biljnog podrijetla) na IgE protutijela, a manifestirira se širokim rasponom simptoma, od blagih lokalnih reakcija na koži do vrlo ozbiljnih, po život opasnih stanja.

Konvencionalna dijagnostika alergija bazira se na utvrđivanju prisutnosti specifičnih IgE protutijela usmjerenih protiv odgovarajućih alergena. Kad je riječ o alergijama na hranu,

koriste se alergeni proteini visoke čistoće i poznate konformacije, što je izuzetno važno za prepoznavanje tog proteina i specifičnog IgE protutijela stvorenog u organizmu alergičara.

Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) je metoda koja omogućava karakterizaciju strukturnih, kemijskih i dinamičkih svojstava proteina. S pomoću NMR-spektroskopije moguće je razlikovati visokouređene proteine koji zauzimaju tercijarnu strukturu (poput nsLTPs) od nasumično smotanih proteina kao i proteina koji su potpuno neuređeni (npr. kazein) ili fleksibilni (Alessandri i sur., 2012). (Tercijarna struktura: trodimenzijski raspored svih atoma polipeptidnog ili proteinskog lanca stabiliziran hidrofobnim, vodikovim i ionskim vezama, disulfidnim mostovima i sl.). Na temelju NMR-spektara moguće je zaključiti o udjelu tercijarne strukture u djelomično uređenim proteinima, kao i o prisutnosti agregata. Također, moguće je detektirati reverzibilne i ireverzibilne strukturne promjene do kojih može doći termičkom obradom namirnica.

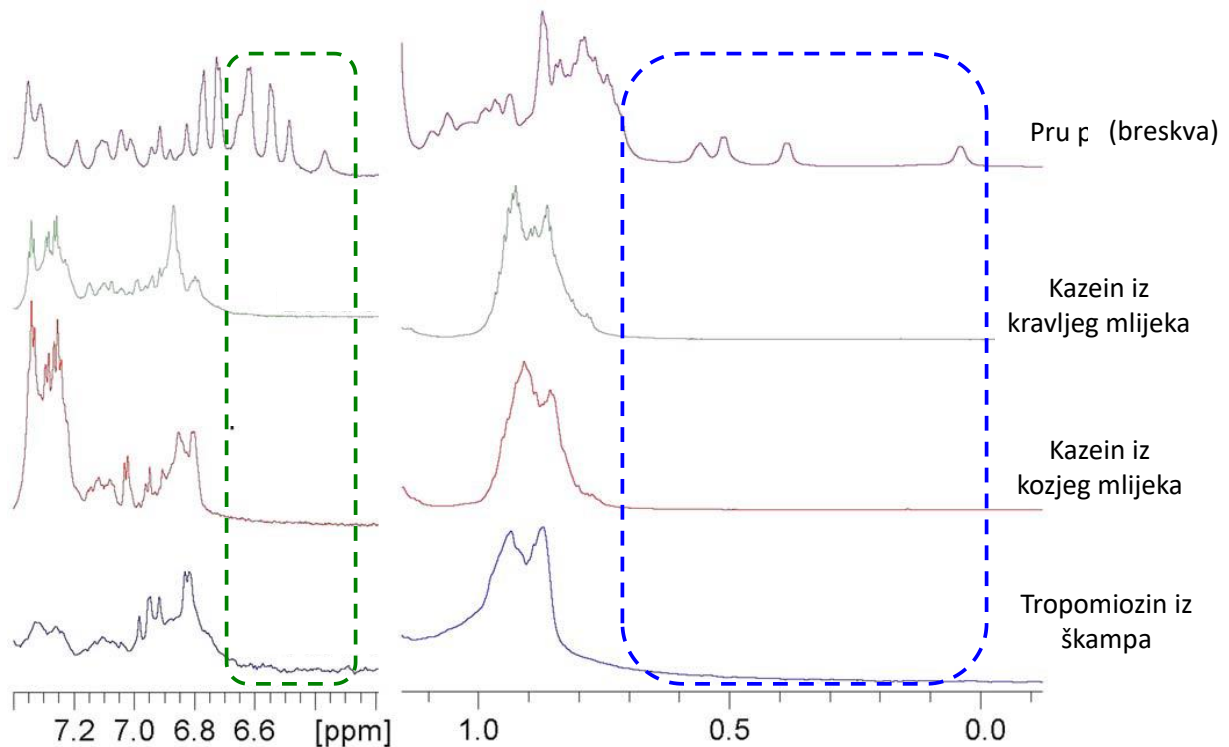
U nastavku će biti opisana primjena NMR-spektroskopije u strukturnoj analizi alergena iz različitih skupina proteina. Nespecifični proteini prenosioци lipida bili su izolirani iz jabuke (*Malus domestica*, Mal d 3), breskve (*Prunus persica*, Pru p 3) i lješnjaka (*Corylus avellana*, Cor a 8). 7S i 11S skladišni globulini iz zrna bili su izolirani iz lješnjaka i kikirikija (*Arachis hypogaea*, Ara h 1, Ara h 3). Kazeini su bili izolirani iz kravljeg (*Bos domesticus*, Bos d 8) i kozjeg mlijeka (cjeloviti kazeini iz kozjeg mlijeka). Tropomiozin, glavni alergen iz škampa (*Penaeus aztecus*, Pen a 1) izoliran je i pročišćen kao rekombinantni protein. Uzorci alergena bili su pripremljeni u H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O otopini (9:1) u vodenom puferu (pH ~7- 7.8).

Određivanje strukturnih svojstava odabranih alergeni proteina temelji se na razmatranju specifičnih kemijskih pomaka koji indiciraju nabiranje proteina. Pri tom je posebno indikativan širok raspon kemijskih pomaka metilnih (između 1 i -1 ppm) i amidnih protona (> 8,5 ppm). Izostanak uređene tercijarne strukture sugeriran je prisutnošću nekoliko širokih pikova pri ~ 8,3 ppm koji su karakteristični za konfiguraciju nasumičnog klupka. S druge strane, prisutnost nekoliko uskih i dobro razdvojenih pikova pri niskom polju (8,5 – 11 ppm) indicira rigidnu i uređenu tercijarnu strukturu.

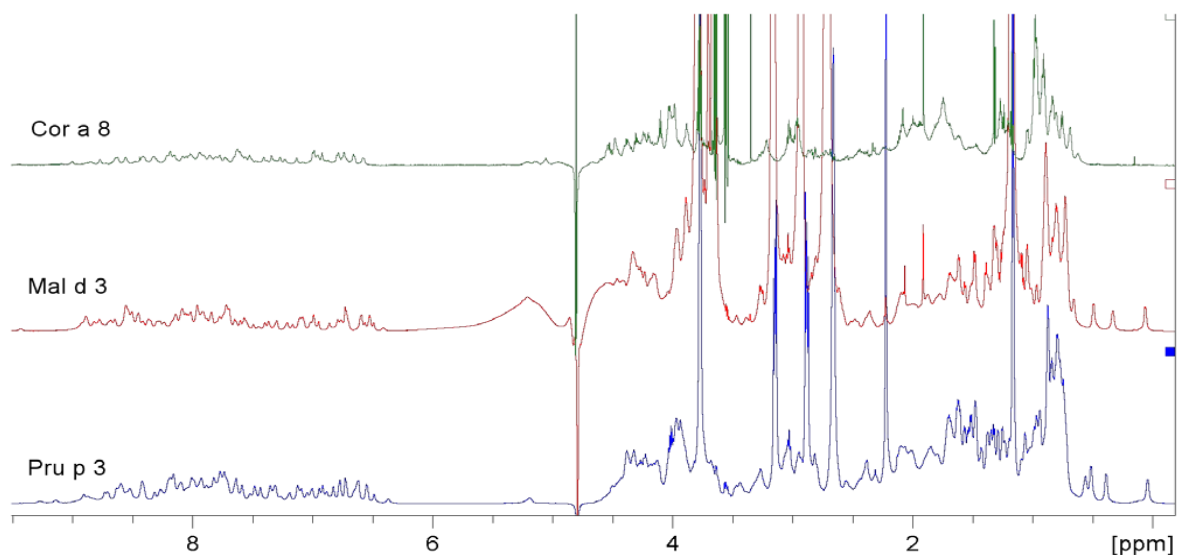
### **2.6.1. Prolaminska superobitelj – nLTPs (Mal d 3, Pru p 3, Cor a 8)**

NMR-spektri nespecifičnih proteina prenosioца lipida Mal d 3 (jabuka) Pru p 3 (breskva), Cor a 8 (lješnjak) (slike 9 i 10) nedvojbeno ukazuju na prisutnost rigidnih i istegnutih tercijarnih struktura, na čiju stabilnost ne utječe niska pH-vrijednost, što je u korelaciji s 2D-NMR-analizom Pru p 3 alergena. NMR-spektri ovih alergena su vrlo slični,

posebice u području metilnih ( $\delta \sim 1-0$  ppm) i amidnih protona, te aromatskoj regiji ( $\delta \sim 6-8$  ppm) gdje su vidljivi brojni uski razdvojeni pikovi.

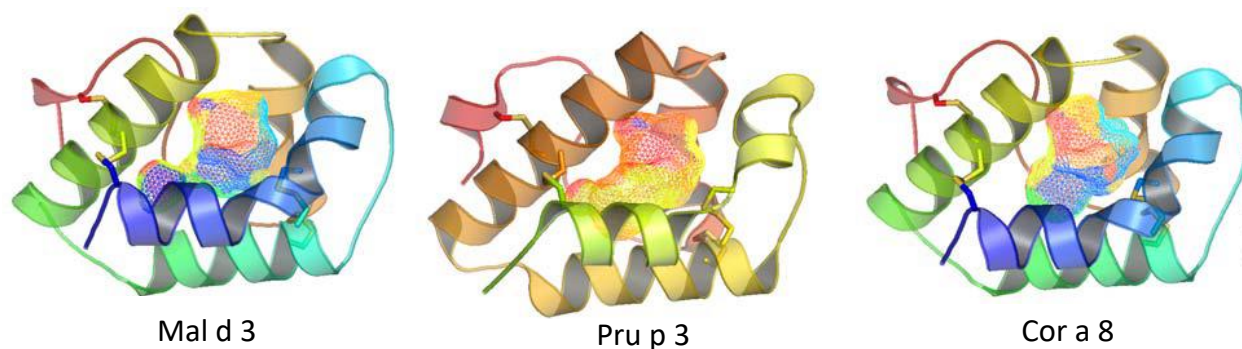


**Slika 9.** Usporedba NMR-spektara alergena s neuređenom strukturom (kazeini i tropomiozin) i alergena Pru p 8 (breskva) s rigidnom tercijarnom strukturom. U području 0,3-1,2 ppm vidljivi su signali metilnih protona, dok pikovi u području 6,2-7,4 ppm odgovaraju rezonanciji protona iz aromatskih prstenova, NH protona iz bočnih ogranaka i amidnih protona iz okosnice. Za razliku od visoko-uređenog i nabranog alergena Pru p 8 (breskva), NMR-spektri kazeina i tropomiozina ne sadrže signale pri  $\delta < 6,6$  ppm i  $\delta < 0,7$  ppm što se pripisuje njihovim razmotanim i neuređenim strukturama (Wijesinha-Bettoni i sur., 2010).



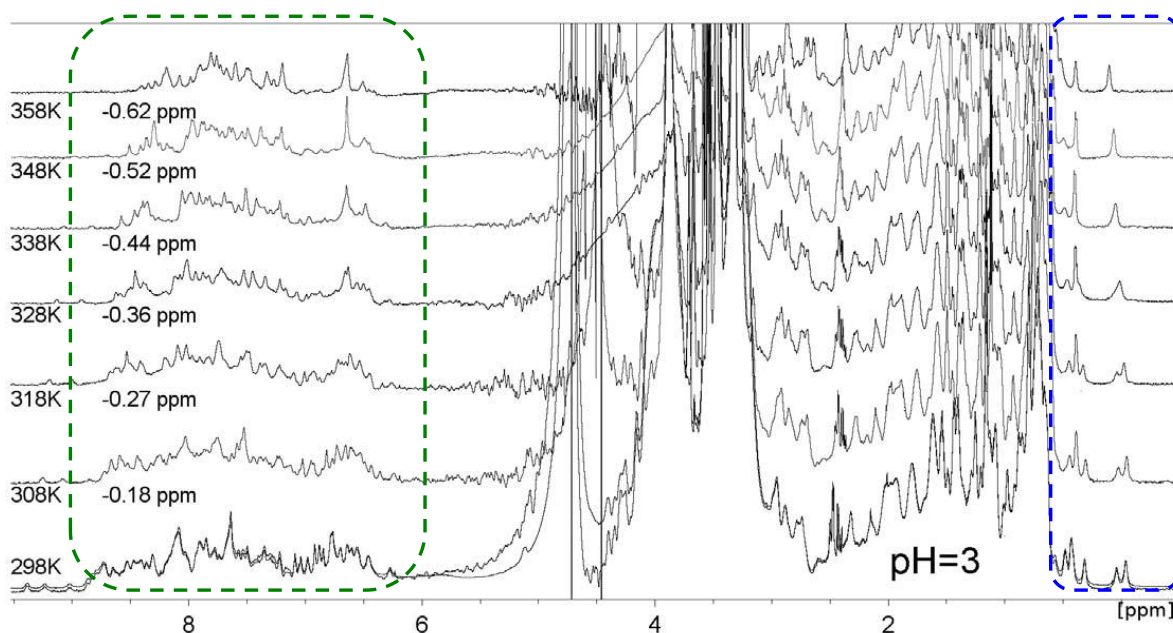
**Slika 10.** NMR-spektri nespecifičnih proteina prenosioca lipida(nsLTP) iz breskve (Pru p 3), jabuke (Mal d 3) i lješnjaka (Cor a 8) pokazuju visok stupanj podudarnosti i indiciraju prisutnost istegnutih, rigidnih i visoko-uređenih tercijarnih struktura (Wijesinha-Bettoni i sur., 2010).

Podjednaki NMR-spektri ovih alergena indiciraju njihovu strukturnu sličnost (slika 11), uslijed visokog stupnja sekvencijske homologije i očuvanih cisteinskih ostataka povezanih disulfidnim mostovima. Pri tom je utvrđeno da Mal d 3 (jabuka) dijeli 81,3% sekvencijske homologije s Pru p 3 (breskva), dok je u slučaju Cor a 8 (lješnjak) ta podudarnost nešto manja (59%).



**Slika 11.** Modelirane i eksperimentalne strukture nsLTP iz jabuke (Mal d 3), breskve (Pru p 3) i lješnjaka (Cor a 8). Disulfidni mostovi prikazani su štapićima, a unutrašnja hidrofobna šupljina prikazana je kao mreža (Baum i sur., 1989).

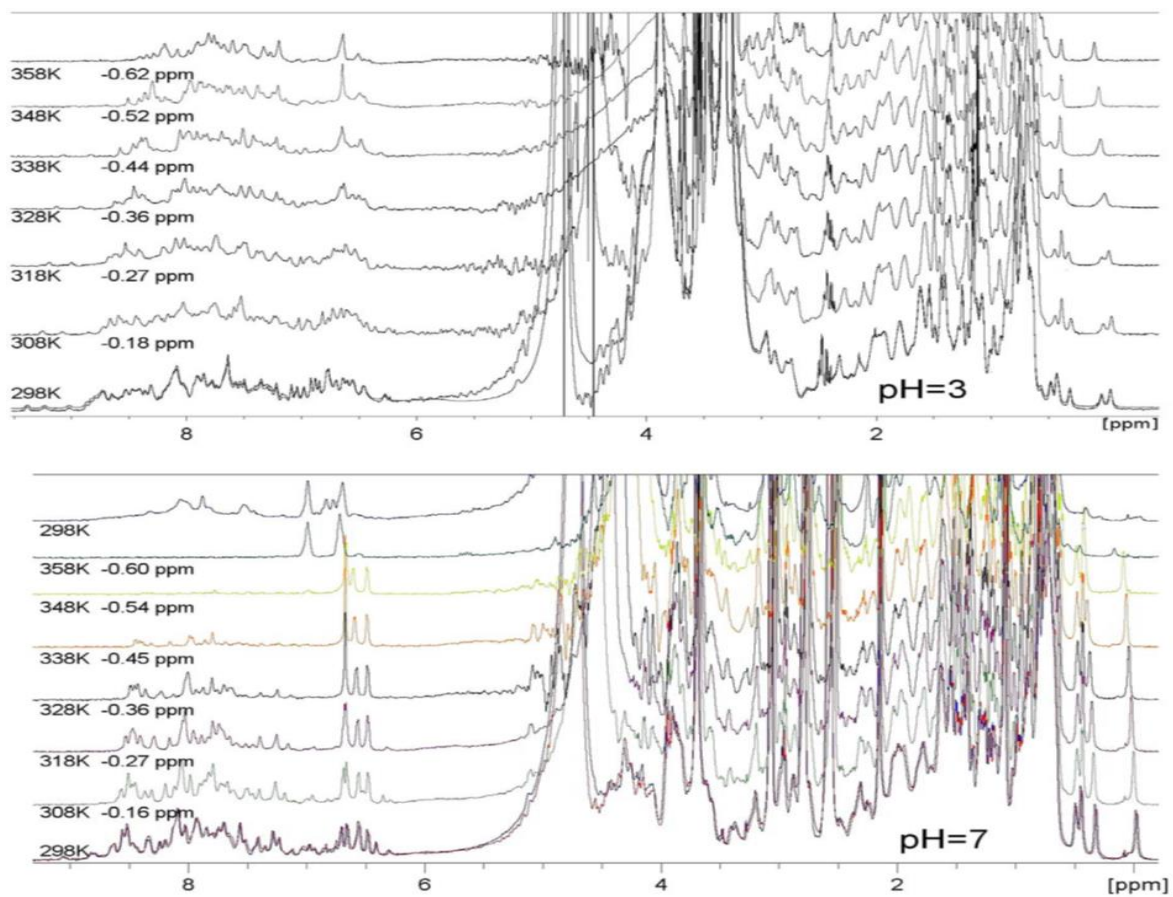
Vezivanje alergeni proteina s IgE protutijelom uvjetovano je prepoznavanjem njihovih 3D-struktura. Stoga je Pru p 3 (breskva) podvrgnut postepenom zagrijavanju kako bi se utvrdilo utječe li termičko tretiranje namirnice na njegovu terciarnu strukturu, odnosno prepoznavanje i vezivanje s IgE. Tijekom zagrijavanja dolazi do promjena u NMR-spektrima koje ukazuju na denaturaciju. U kiselim uvjetima (slika 12) dolazi do pojačanog narušavanja terciarne strukture Pru p 3 što je vidljivo iz smanjenog raspršenja signala u metilnom (oko 0 ppm) ili amidnom području (6-10 ppm). NMR-spektri izmjereni pri sobnoj temperaturi, te zagrijavanjem do 358 K i ponovnim hlađenjem do sobne temperature potpuno se preklapaju, što indicira izostanak ireverzibilne denaturacije, odnosno ukazuje na termičku otpornost.



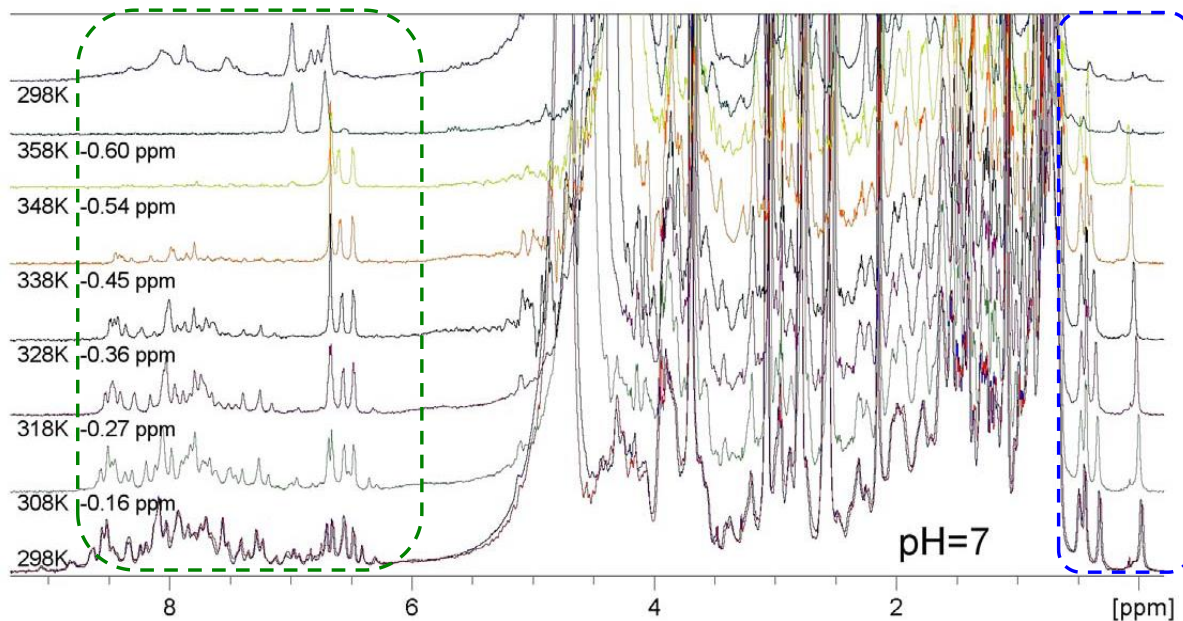
**Slika 12.** NMR-spektri nsLTP iz breskve (Pru p 8) izmjereni nakon zagrijavanja u kiselim uvjetima (Perrocheau i sur., 2006).

Pri neutralnim uvjetima (pH 7), dolazi do ireverzibilne strukturne tranzicije opažene zagrijavanjem od 353 K do 358 K (slika 13). Pri sobnoj temperaturi u spektru je vidljivo svega nekoliko širokih i slabo razdvojenih pikova u amidno-aromatskom području, dok u metilnoj regiji izostaju rezonancije pri nižem i višem polju. Povećanjem temperature dolazi do nestanka amidnih signala pri  $\delta$  7-9 ppm zbog izmjene protona s otapalom što ovisi o pH, temperaturi i dostupnosti izmjenjivih protona uslijed razmotavanja protenskog lanca i narušavanja terciarne strukture (slika 14).





**Slika 13.** NMR spektar nsLTP iz breskve (Pru p 3) podvrgnut toplinskom tretmanu u kiselim i neutralnim pH uvjetima.

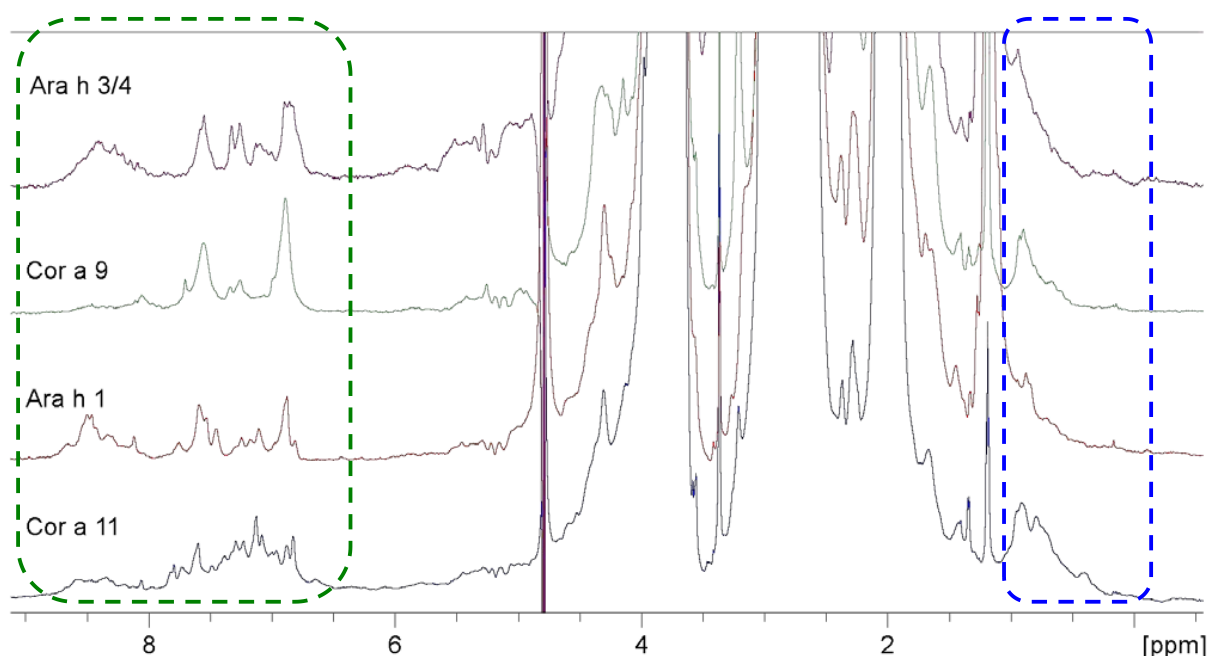


**Slika 14.** NMR-spektari nsLTP iz breskve (Pru p 8) izmjereni nakon zagrijavanja pri neutralnim uvjetima.

Nativni Mal d 3 (jabuka) zagrijavanjem pri neutralnim uvjetima ponaša se kao Pru p 3 (breskva), odnosno podliježe gubitku tercijarne strukture. S druge strane, pokazano je da se uređena tercijarna struktura Cor a 8 (lješnjak) narušava zagrijavanjem, ali i obnavlja hlađenjem do sobne temperature.

## 2.6.2. Skladišni globulini iz sjemenki

U odnosu na alergene proteine iz skupine nTLPs, skladišni proteini iz sjemenki odlikuju se većom molekulskom masom i sklonošću k agregiranju u kompleksnije kvaterne strukture, što otežava asignaciju i tumačenje njihovih NMR-spektara (slika 15).



**Slika 15.** NMR-spektri globulina iz kikirikija i lješnjaka. Izraženi signali u metilnoj regiji ( $\delta \sim 0,5$  ppm) indiciraju prisutnost regija s visoko-uređenim tercijarnim strukturama. Prisutnost neuređenih regija sugerirana je širokim pikovima opaženima u cijelom spektru, posebno u NH regiji ( $\delta \sim 6-8$  ppm) i to za Cor a 9 (lješnjak). S druge strane, ista regija u spektru Cor a 11 (lješnjak) sadrži nekoliko dobro razdvojenih i užih signala, koji su indicacija rigidnih i uređenih struktura (Mills i Mackie, 2008).

### 3. ZAKLJUČAK

Na temelju strukture alergena, njihovih svojstava, općih karakteristika i analiza odrađenih uz pomoć NMR spektroskopije mogu se donijeti pojedini zaključci.

1. Na temelju molekulskih svojstava alergena mogu se vidjeti neke zajedničke karakteristike u strukturi različitih alergena. Neke od karakteristika su: prisutnost višestrukih, linearnih IgE vezujućih epitopa, rezistencija proteina na razgradnju i obradu, vezanje određenih liganda.
2. Prisutnost ponavljajućih struktura i sklonost alergena agregiranju povećavaju imunogeničnost.
3. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) je brza, pouzdana i jeftina metoda koja omogućava karakterizaciju strukturnih, kemijskih i dinamičkih svojstava proteina. Pomoću NMR-spektroskopije moguće je razlikovati visokouređene proteine koji zauzimaju terciarnu strukturu (poput nsLTPs) od nasumično smotanih proteina kao i proteina koji su potpuno neuređeni (npr. kazein) ili fleksibilni.
4. Proteini iz prolaminske superobitelji (nLTPs) (Pru p 8, mal d 3 i Cor a 8) pokazuju visok stupanj podudarnosti i indiciraju prisutnost istegnutih, rigidnih i visoko-uređenih terciarnih struktura. Na njihovu stabilnost ne utječe niska pH vrijednost.
5. Kod skladišnih globulina iz sjemenki otežano je tumačenje njihovih NMR-spektara zbog veće molekulske mase i sklonosti agregiranju u kompleksnije kvaterne strukture.

Pored za sada nerazjašnjenog mehanizma senzitivacije, alergije na hranu predstavljaju velik izazov i na području dijagnostike, te je za sada jedina uspješna terapija strogo izbjegavanje unosa alergene namirnice. To zahtjeva pažljivo čitanje deklaracija prehrambenih proizvoda, te oprez prilikom konzumacije prerađene hrane.

#### 4. LITERATURA

- Aalberse, R.C. (2000) Structural biology of allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **106**: 228-38.
- Alessandri, S., Sancho, A., Vieths, S., Mills, C.E., Wal, J.M., Shewry, P.R., Rigby, N., Hoffmann-Sommergruber, K. (2012) Highthroughput NMR assessment of the tertiary structure of food allergens. *PLoS One* **7**: 397-85.
- Anzlovar, S., Dalla Serra, M., Dermastia, M., Menestrina, G. (1998) Membrane permeabilizing activity of pathogenesis-related protein linusitin. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 610-7.
- Bannon, G.A. (2004) What makes a food protein an allergen? *Current Allergy and Asthma Reports* **4**: 43-6.
- Bernard, H., Meisel, H., Creminon, C., Wal, J.M. (2000) Post-translational phosphorylation affects the IgE binding capacity of caseins. *FEBS Letters* **467**: 239-44.
- Bernhisel-Broadbent, J., Scanlon, S.M., Sampson, H.A. (1992) Fish hypersensitivity. I. In vitro and oral challenge results in fish-allergic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **89**: 730-7.
- Bernhisel-Broadbent, J., Strause, D., Sampson, H.A. (1992) Fish hypersensitivity. II: Clinical relevance of altered fish allergenicity caused by various preparation methods. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **90**: 622-9.
- Braun, A., Kwee, L., Labow, M.A., Alsenz, J. (1997) Protein aggregates seem to play a key role among the parameters influencing the antigenicity of interferon alpha (IFN-alpha) in normal and transgenic mice. *Pharmaceutical Research* **14**: 1472-8.
- Bredehorst, R., David, K. (2001) What establishes a protein as an allergen? *Journal of Chromatography B Biomedical Sciences and Applications* **756**: 33-40.
- Breiteneder, H., Eber, C. (2000) Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **106**: 1: 1
- Brett, G.M., Mills, E.N.C., Goodfellow, B.J., Fido, R.J., Tatham, A.S., Shewry, P.R., et al. (1999) Epitope mapping studies of broad specificity monoclonal antibodies to cereal prolamins. *Journal of Cereal Science* **29**: 117-28.
- Brown, J.H., Kim, K.H., Jun, G., Greenfield, N.J., Dominguez, R., Volkmann, N., et al. (2001) Deciphering the design of the tropomyosin molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **98**: 8496-501.

- Brusic, V., Petrovsky, N., Gendel, S.M., Millot, M., Gigonzac, O., Stelman, S.J. (2003) Computational tools for the study of allergens. *Allergy Journal* **58**: 1083-92.
- Butorac, A., Marić, M., Badanjak Sabolović, M., Hruškar, M., Rimac Brnčić, S., Bačun Družina, V. (2013) Analitičke metode u forenzici hrane. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **8**: 90-101.
- Chakravarty, S., Varadarajan, R. (2000) Elucidation of determinants of protein stability through genome sequence analysis. *FEBS Letters* **470**: 65-9.
- Chirino, A.J., Ary, M.L., Marshall, S.A. (2004) Minimizing the immunogenicity of protein therapeutics. *Drug Discovery Today* **9**: 82-90.
- Chung, S.Y., Butts, C.L., Maleki, S.J., Champagne, ET. (2003) Linking peanut allergenicity to the processes of maturation, curing, and roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 4273-7.
- Declercq, J.P., Tinant, B., Parello, J., Rambaud, J. (1991) Ionic interactions with parvalbumins. Crystal structure determination of pike 4.10 parvalbumin in four different ionic environments. *Journal of Molecular Biology* **220**: 1017-39.
- Dominguez, J., Cuevas, M., Urena, V., Munoz, T., Moneo, I. (1990) Purification and characterization of an allergen of mustard seed. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* **64**: 352-7.
- Douliez, J.P., Michon, T., Marion, D. (2000) Steady-state tyrosine fluorescence to study the lipid-binding properties of a wheat non-specific lipid-transfer protein (nsLTP1). *Biochimica et Biophysica Acta* **1467**: 65-72.
- Dunker, A.K., Lawson, J.D., Brown, C.J., Williams, R.M., Romero, P., Oh JS, et al. (2001) Intrinsically disordered protein. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **19**: 26-59.
- Elsayed, S., Aas, K. (1971) Characterization of a major allergen (cod). Observations on effect of denaturation on the allergenic activity. *Journal of Allergy* **47**: 283-91.
- Gekko, K., Timasheff, S.N. (1981) Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry* **20**: 4667-76.
- Grozdanović, M. (2013) Strukturna i imunološka karakterizacija aktivnog i inhibiranog aktinidina, cistein proteaze iz kivija (*Actinia deliciosa* Liang, Ferguson). Doktorska disertacija, str. 1-16.
- Hauser, M., Roulias, A., Ferreira, F., Egger, M. (2010) Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* **6 (1)**: 1.
- Hileman, R.E., Silvanovich, A., Goodman, R.E., Rice, E.A., Holleschak, G., Astwood J.D., et al. (2002) Bioinformatic methods for allergenicity assessment using a

comprehensive allergen database. *International Archives of Allergy and Immunology* **128**: 280-91.

- Hoffmann-Sommergruber, K., Mills, E.N. (2009) Food allergen protein families and their structural characteristics and application in component-resolved diagnosis: new data from the EuroPrevall project. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **395 (1)**: 25–35.
- Hoffmann-Sommergruber, K., Pfeifer, S., Bublin, M. (2015) Applications of molecular diagnostic testing in food allergy. *Current Allergy and Asthma Reports* **15 (9)**: 56.
- Holt, C., Sawyer, L. (1993) Caseins as rheomorphic proteins: interpretation of the primary and secondary structures of alpha S1-beta- and kappa-caseins. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **89**: 2683-92.
- Holt, C., Timmins, P.A., Errington, N., Leaver, J. (1998) A core-shell model of calcium phosphate nanoclusters stabilized by beta-casein phosphopeptides, derived from sedimentation equilibrium and small-angle X-ray and neutron-scattering measurements. *European Journal of Biochemistry* **252**: 73-8.
- Houston, N.L., Lee, D.G., Stevenson, S.E., Ladics, G.S., Bannon, G.A., McClain, S., et al. (2011) Quantitation of soybean allergens using tandem mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* **10 (2)**: 763–773.
- Ivanciuc, O., Mathura, V., Midoro-Horiuti, T., Braun, W., Goldblum, R.M., Schein, C.H. (2003) Detecting potential IgE-reactive sites on food proteins using a sequence and structure database SDAP-Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 4830-7.
- Jenkins, J.A., Griffiths-Jones, Shewry, P.R., Breiteneder, H., Mills, ENC. (2005) Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens—an in silico analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **115**: 163-70.
- Kanakis, C.D., Hasni, I., Bourassa, P., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G. (2011) Milk b-lactoglobulin complexes with tea polyphenols. *Food Chemistry* **127**: 1046–1055.
- Kleine-Tebbe, J., Vogel, L., Crowell, D.N., Haustein, U.F., Vieths, S. (2002) Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by a Bet v 1- related PR-10 protein in soybean, SAM22. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **110**: 797-804.
- Kleter, G.A., Peijnenberg, A.C.M. (2002) Screening of transgenic proteins expressed in genetically modified food crops for the presence of six amino acid sequences

identical to potential, IgE-binding linear epitopes of allergens. *BMC Structural Biology* **2**:8.

- Kontopidis, G., Holt, C., Sawyer, L. (2002) The ligand-binding site of bovine betalactoglobulin: evidence for a function? *Journal of Molecular Biology* **318**: 1043-55.
- Krebitz, M., Wagner, B., Ferreira, F., Peterbauer, C., Campillo, N., Witty, M., et al. (2003) Plant-based heterologous expression of Mal d 2, a thaumatin-like protein and allergen of apple (*Malus domestica*), and its characterization as an antifungal protein. *Journal of Molecular Biology* **329**: 721-30.
- Lehrer, S.B., Ibanez, M.D., McCants, M.L., Daul, C.B., Morgan, J.E. (1990) Characterization of water-soluble shrimp allergens released during boiling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **85**: 1005-13.
- Lewit-Bentley, A., Rety, S. (2000) EF-hand calcium-binding proteins. *Current Opinion in Structural Biology* **10**: 637-43.
- Marković, Degano, M., Lamba, D., von Roepenack-Lehaye, E., Clemens, S., Susani, M., et al. (2003) Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. *Journal of Molecular Biology* **325**: 123-33
- Mijić, J., Marinc, S., Cindrić, M. (2009) Imunogeničnost agregata terapeutskih proteina. *Medicina Fluminensis* **45**: 245-251
- Mills, E.N., Mackie, A.R. (2008) The impact of processing on allergenicity of food. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **8**: 249-253.
- Mills, E.N., Marigheto, N.A., Wellner, N., Fairhurst, S.A., Jenkins, J.A., Mann, R., et al. (2003) Thermally induced structural changes in glycinin, the 11S globulin of soya bean (*Glycine max*)—an in situ spectroscopic study. *Biochimica et Biophysica Acta* **1648**: 105-14.
- Muraro, A., Hoffmann-Sommergruber, K., Holzhauser, T., Poulsen, L.K., Gowland, M.H., Akdis, C.A. et al. (2014) EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines. Protecting consumers with food allergies: understanding food consumption, meeting regulations and identifying unmet needs. *Allergy Journal* **69 (11)**: 1464–1472.
- Muraro, A., Werfel, T., Hoffmann-Sommergruber, K., Roberts, G., Beyer, K., Bindslev-Jensen, C., et al. (2014) EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: diagnosis and management of food allergy. *Allergy Journal* **69 (8)**: 1008–1025.

- Naqpal, S., Rajappa, L., Metcalfe, D.D., Rao, P.V. (1989) Isolation and characterization of heat-stable allergens from shrimp (*Penaeus indicus*). *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **83**: 26-36.
- Neudecker, P., Schweimer, K., Nerkamp, J., Scheurer, S., Vieths, S., Sticht, H., et al. (2001) Allergic cross-reactivity made visible: solution structure of the major cherry allergen Pru av 1. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 22756-63.
- Offermann, L.R., Bublin, M., Perdue, M.L., Pfeifer, S., Dubiela, P., Borowski, T., et al. (2015) Structural and functional characterization of the hazelnut allergen Cor a 8. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63 (41)**: 9150–9158.
- Onaderra, M., Monsalve, R.I., Mancheno, J.M., Villalba, M., Martinez del Pozo, A., Gavilanes JG, et al. (1994) Food mustard allergen interaction with phospholipid vesicles. *European Journal of Biochemistry* **225**: 609-15.
- O'Neill, T.E., Kinsella, J.E. (1987) Binding of alkanone flavours to betalactoglobulin: Effects of conformational and chemical modification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **35**: 770-4.
- Pauls, T.L., Cox, J.A., Berchtold, M.W. (1996) The Ca<sup>2+</sup>(-)-binding proteins parvalbumin and oncomodulin and their genes: new structural and functional findings. *Biochimica et Biophysica Acta* **1306**: 39-54.
- Pedrosa, C., De Felice, F.G., Trisciuzzi, C., Ferreira, S.T. (2000) Selective neoglycosylation increases the structural stability of vicilin, the 7S storage globulin from pea seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **382**: 203-10.
- Perrocheau, L., Bakan, B., Boivin, P., Marion, D. (2006) Stability of barley and malt lipid transfer protein 1 (LTP1) toward heating and reducing agents: relationships with the brewing process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 3108-3113.
- Piras, C., Roncada, P., Rodrigues, P.M., Bonizzi, L., Soggiu, A. (2016) Proteomics in food: quality, safety, microbes, and allergens. *Proteomics* **16 (5)**: 799–815.
- Pomes, A. (2002) Intrinsic properties of allergens and environmental exposure as determinants of allergenicity. *Allergy Journal* **57**: 673-9.
- Radauer, C., Bublin, M., Wagner, S., Mari, A., Breiteneder, H. (2008) Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **121 (4)**: 847–852.
- Ragona, L., Fogolari, F., Catalano, M., Ugolini, R., Zetta, L., Molinari, H. (2003) EF loop conformational change triggers ligand binding in beta-lactoglobulins. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 38840-6.



- Rajesh, G. (2014) SlideShare, <<https://www.slideshare.net/RajeshG5/bt631-6-structuralmotifs>> Pristupljeno 28. kolovoza 2018.
- Sampson, HA. (1999) Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **103**: 717-28.
- Sampson, HA. (2004) Update on food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **113**: 805-19.
- Selitrennikoff, C.P. (2001) Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 2883-94.
- Soeria-Atmadja, D., Zorzet, A., Gustafsson, M.G., Hammerling, U. (2004) Statistical evaluation of local alignment features predicting allergenicity using supervised classification algorithms. *International Archives of Allergy and Immunology* **133**: 101-12.
- Stipić Marković, A., Ivković Jureković, I., Dodig, S., Batišta, I., Zrinski Topić, R., Barberić, M., Topalušić, I., Bukovec Megla, Ž., Žižić, V. (2015) Hrvatske smjernice za IN VITRO dijagnostiku preosjetljivosti posredovane IgE protutijelima. *Acta medica croatica* **69**: 75-96
- Šumić, Z. (2008) Tehnologija hrane, <<https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/kazein>> Pristupljeno 28. kolovoza 2018.
- Tassin, S., Broekaert, W.F., Marion, D., Acland, D.P., Ptak, M., Vovelle, F., et al. (1998) Solution structure of Ace-AMP1, a potent antimicrobial protein extracted from onion seeds. Structural analogies with plant nonspecific lipid transfer proteins. *Biochemistry Journal* **37**: 3623-37.
- Terras, F.R., Schoofs, H.M., De Bolle, M.F., Van Leuven, F., Rees, S.B., Vanderleyden, J., et al. (1992) Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 15301-9.
- Tsujishita, Y., Hurley, J.H. (2000) Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain. *Nature Structural Biology* **7**: 408-14.
- Tuinier, R., de Kruif, C.G. (2002) Stability of casein micelles in milk. *Journal of Chemical Physics* **117**: 1290-1295.
- van Ree, R. (2002) Carbohydrate epitopes and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases. *International Archives of Allergy and Immunology* **129**: 189-97.

- Vieths, S., Scheurer, S., Ballmer-Weber, B. (2002) Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Annals of the New York Academy of Sciences* **964**: 47-68.
- Vigers, A.J., Roberts, W.K., Selitrennikoff, C.P. (1991) A new family of plant antifungal proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **4**: 315-23.
- Wagner, J.R., Gueguen, J. (1994) Surface functional properties of native, acid-treated, and reduced soy glycinin. 2. Emulsifying properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 2181-7.
- Wolf, W.J., Nelsen, T.C. (1996) Partial purification and characterization of the 15S globulin of soybeans, a dimer of glycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**: 785-91
- Wormald, M.R., Dwek, R.A. (1999) Glycoprotein: glycan presentation and protein-fold stability. *Structure* **7**: R155-60.
- Zachowski, A. (1993) Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochemical Journal* **294**: 1-14.

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

### Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

Monta Kozarić

ime i prezime studenta

---