

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

**Milica M. Grozdanović**

**Strukturna i imunološka karakterizacija  
aktivnog i inhibiranog aktinidina, cistein  
proteaze iz kivija (*Actinidia deliciosa*  
Liang, Ferguson)**

Doktorska disertacija

Beograd

Maj 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

**Milica M. Grozdanović**

**Structural and immunological  
characterization of actinidin, a cysteine  
protease from kiwifruit  
(*Actinidia deliciosa* Liang, Ferguson)**

Doctoral Dissertation

Belgrade

May 2013

## **Članovi komisije:**

1. dr Marija Gavrović-Jankulović, vanredni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (mentor)

2. dr Zoran Vujčić, vanredni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

3. dr Marina Atanasković- Marković, naučni saradnik Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane:

## ***Zahvalnica***

*Zahvaljujem se svom mentoru, dr Mariji Gavrović-Jankulović, na predloženoj temi i pruženoj podršci tokom realizacije ove disertacije, kao i na nesebičnom trudu i vremenu koji je uložila u sve aspekte naše saradnje. Zahvalna sam na prenetom znanju i na naučenoj strpljivosti i upornosti.*

*Zahvaljujem se dr Zoranu Vujčiću na kritičkoj analizi ove disertacije i veoma korisnim sugestijama i savetima.*

*Zahvaljujem se dr Marini Atanasković - Marković na pruženoj pomoći prilikom imunološke karakterizacije aktinidina.*

*Zahvalnost dugujem i svim kolegama iz laboratorija 429 i 434 na saradnji, podršci, prijateljstvu i svim radosnim trenucima koje smo podelili.*

## **Naziv: Strukturna i imunološka karakterizacija aktivnog i inhibiranog aktinidina, cistein proteaze iz kivija (*Actinidia deliciosa* Liang, Ferguson)**

### **Izvod**

Alergije na hranu su IgE antitelima posredovane imunološke reakcije na komponente hrane, najčešće proteine. Razvijaju se nakon primarne senzitivacije preko gastrointestinalnog trakta, i za sada nije poznat mehanizam senzitivacije ovim putem. Smatra se da bi alergeni proteini hrane morali da prođu kroz gastrointestinalni trakt barem delimično očuvane strukture kako bi doveli do senzitivacije. Pored nerazjašnjenog mehanizma senzitivacije, alergije na hranu predstavljaju i izazov na polju dijagnostike, dok je jedina do sada potpuno uspešna metoda terapije strogo izbegavanje unosa alergene namirnice.

Tokom svega 30-tak godina od svog prvog pojavljivanja na svetskom tržištu pa do danas plod kivija je postao jedna od omiljenijih namirnica u ljudskoj ishrani, ali je istovremeno dospelo i među deset najčešćih uzročnika alergije na hranu. Aktinidin, cistein proteaza iz papainske familije, je najzastupljeniji protein pulpe kivija i smatra se glavnim alergenim molekulom ovog izvora.

U okviru ove disertacije ispitivane su strukturne i imunološke osobine aktinidina u cilju rasvetljavanja puta oralne senzitivacije i poboljšanja dijagnostike alergije na kivi. Pokazano je da aktinidin prečišćen iz svežeg ploda kivija pod nativnim uslovima predstavlja smešu aktivnog i neaktivnog enzima. Između proteolitički aktivnog i neaktivnog aktinidina postoji razlika u elektroforetskoj pokretljivosti, sposobnosti vezivanja IgE u imunoblotu i obrascima reagovanja pacijenata u kožnim probama. Pokazano je da samo aktivni enzim preživljava uslove simuliranog želudačnog i crevnog soka i da nakon ovih tretmana pokazuje očuvanu imunogenost i proteolitičku aktivnost. Uočene razlike između aktivnog i inhibiranog oblika aktinidina najverovatnije su posledica razlika u strukturi enzima koje nastaju prilikom inhibicije, a ova pretpostavka je potkrepljena rezultatima CD spektroskopije i fluorimetrije.

Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji doprinose rasvetljavanju mehanizama oralne senzitivacije na kivi ukazujući na strukturne osobine aktinidina koje mu omogućavaju da u proteolitički aktivnom obliku dospe do intestinalne mukoze. S obzirom da je pokazan uticaj aktivnosti (konformacije) aktinidina na *in vivo* i *in vitro* dijagnostičke eseje prikazani rezultati mogu doprineti i poboljšanju dijagnostike alergije na kivi.

Pokazano je i da relativni odnos aktivnog i inhibiranog aktinidina u ekstraktu kivija zavisi od načina pripreme ekstrakta. Ovi rezultati, osim u poboljšanju dijagnostike alergije na kivi, mogu biti upotrebljeni i za optimizaciju proteinskih ekstrakata kivija i njihovu upotrebu u industriji mleka. U ovoj disertaciji je ispitana moguća upotreba ekstrakta kivija kao sredstva za koagulaciju mleka u procesu proizvodnje sira. Dobijeni rezultati su pokazali da dodavanjem proteinskog ekstrakta kivija pripremljenog na pH 5.0 u kravlje mleko dolazi do nastanka gruševine i surutke identičnih proteinskih profila kao prilikom dodavanja himozina poreklom iz želuca teleta. Izmeren odnos koagulacione i proteolitičke aktivnost ovog ekstrakta prema mleku je bio svega 30% lošiji od himozina.

**Ključne reči:** Alergije na hranu, plod kivija, cistein peptidaze, aktinidin, digestibilnost proteina, E-64 inhibitor, konformacija proteina, koagulaciono sredstvo

**Naučna oblast:** Prirodno-matematičke nauke

**Uža naučna oblast:** Biohemija

**UDK broj:** 577.112

**Title: Structural and immunological characterization of actinidin, a cysteine protease from kiwifruit (*Actinidia deliciosa* Liang, Ferguson)**

**Abstract**

Food allergy is an IgE mediated reaction of the immune system to food components, most commonly to food proteins. Food allergies develop after primary sensitization through the gastrointestinal tract and the mechanism behind this route of sensitization has not yet been elucidated. It has been postulated that in order to sensitize the organism through an oral route, food allergens must reach the gastrointestinal mucosa in at least a partially intact form in order to interact with the immune system. In addition to the unclear mechanism of sensitization, food allergies also present a challenge in the field of diagnostics, while the only effective therapy method to date is the strict avoidance of allergenic substances.

During the last 30 years, since its first appearance on the world market, kiwifruit has become one of the more popular components of human nutrition, and yet, at the same time, it has emerged as one of the ten most frequent elicitors of allergic reactions to food. Actinidin, a cysteine protease from the papain family, is the most abundant protein in the pulp of kiwifruit and is considered the major allergen of this fruit.

In this thesis the structural and immunological characteristics of actinidin were examined in order to shed light on the mechanism of oral sensitization and to aid in the improvement of kiwifruit allergy diagnosis. It was shown that actinidin purified from fresh kiwifruit under native conditions represents a mixture of the active and inactive enzyme. Differences in electrophoretic mobility, IgE binding in immunoblot and patient response in skin prick tests were shown for proteolytically active and inhibited actinidin. It was demonstrated that only the active enzyme survives conditions of simulated gastric and intestinal fluid while preserving its immunogenicity and proteolytic activity. The observed differences between the active and inhibited form of actinidin are most likely a consequence of differences in

the conformation of the enzyme that arise upon inhibition, a hypothesis supported by results from CD spectroscopy and fluorimetry.

Results presented in this thesis contribute to the effort of elucidating the mechanism of oral sensitization to kiwifruit by shedding light on the features of actinidin which enable it to reach the intestinal mucosa in a proteolytically active form. Additionally, since the influence of the activity (conformation) of actinidin on results of *in vitro* and *in vivo* diagnostic assays was demonstrated, results from this thesis could contribute to the improvement of kiwifruit allergy diagnosis.

In addition, it was shown that the relative ratio of active and inhibited actinidin in kiwifruit protein extract depends on the chosen method for extract preparation. Apart from influencing future kiwifruit allergy diagnostic procedures, these results can be used to optimise the extraction procedure for kiwifruit protein extracts. In this thesis the possibility of using kiwifruit extract as a plant milk clotting agent was analysed. It was shown that the addition of kiwifruit extract prepared at pH 5.0 to cow milk leads to the formation of a casein clot. The obtained clot and whey were shown to have identical protein profiles to the clot and whey obtained through the activity of calf chymosin. The ratio between coagulating and proteolytical activity towards cow milk was only 30 % less favorable when using kiwifruit extract.

**Key words:** Food allergy, kiwifruit, cysteine proteases, actinidin, protein digestibility, E-64 inhibitor, protein conformation, milk-clotting agent

**Scientific field:** Life sciences

**Scientific discipline:** Biochemistry

**UDK number:** 577.112



# Spisak skraćenica

Act d 1 – aktinidin

ANS – 8-anilino-1-naftalensulfonska kiselina

APĆ – antigen prezentujuće ćelije

APS- amonijum-persulfat

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

BFP- bromfenol plavo

BSA - goveđi serum albumin (*Bovine Serum Albumin*)

CBB - *Comasie Brilliant Blue*

CD - cirkularni dihroizam

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

DSC – diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (*Differential Scanning Calorimetry*)

EDTA - etilendiamin tetrasirćetna kiselina

ELISA - enzim-povezani imunosorbentni esej (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

ESI - *electrospray*

FACS – protočni citometar (*Fluorescence Activated Cell Sorter*)

FAST – fluorescentni alergosorbentni test

FITC – fluorescein izotiocijanat

FT-ICR - *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*

GIT – gastrointestinalni sistem

IEF – izoelektrično fokusiranje

IFN – interferon

Ig – imunoglobulin

IL – interleukin

IR – infracrveno (*Infrared*)

iRNK – informacijska ribonukleinska kislina

LTP – protein za transfer lipida (*lipid-transfer protein*)

MALDI - *Matrix-assisted laser desorption/ionization*

MAST – modifikovani radioalergosorbentni test

MHC - glavni kompleks histokompatibilnosti (*Major Histocompatibility Complex*)

MM – molekularni markeri

MS – masena spektroskopija

NBT - 4-nitroblue tetrazolium

NC- nitroceluloza

NMR – nuklearna magnetna rezonanca

OAS - oralni alergijski sindrom

PVDF – poliviniliden fluorid

QAE – kvaternarni amino-etil (*Quaternary Aminoethyl*)

RAST - radioalergosorbentni test

SDS-PAGE - natrijum dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (*Sodium Dodecylsulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*)

SGF – veštački želudačni sok (*Simulated Gastric Fluid*)

SIF – veštački crevni sok (*Simulated Intestinal Fluid*)

SP – sulfo-propil

TBS - TRIS-om puferisan fiziološki rastvor (*TRIS Buffer Saline*)

TCA- trihlorsirćetna kislina

TEMED - N,N,N',N'-tetrametiletildiamine

TOF – *time of flight*

UV – ultraljubičasto (*Ultraviolet*)

VIS – vidljivi spektar

# Sadržaj

<b>1. Uvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Opšti deo .....</b>	<b>4</b>
2.1. Alergije.....	4
2.1.1. Mehanizam nastanka alergija .....	4
2.2. Alergije na hranu.....	6
2.2.3. Stabilnost alergena u uslovima gastrointestinalnog trakta .....	12
2.2.4. Uticaj termalne obrade hrane na alergenost proteina .....	13
2.2.5. Dijagnostika alergije na hranu.....	14
2.2.6. Terapija alergija na hranu.....	15
2.2.7. Značaj karakterizacije alergena hrane u dijagnostici i imunoterapiji .....	16
2.3. Alergija na plod kivija.....	17
2.3.1. Kivi.....	17
2.3.2. Alergeni kivija.....	18
2.3.3. Učestalost i simptomi alergije na kivi .....	20
2.4. Cistein peptidaze .....	21
2.4.2. Papainska familija cistein peptidaza.....	23
2.5. Aktinidin .....	24
2.5.1. Molekulska struktura aktinidina.....	25
2.5.2. Industrijska primena aktinidina .....	27
2.6. Inhibitori cistein peptidaza .....	28
2.6.1. Endogeni inhibitori cistein peptidaza .....	29
2.6.3. E-64.....	31
<b>3. Cilj istraživanja .....</b>	<b>33</b>
<b>4. Rezultati .....</b>	<b>34</b>
4.1. Ispitivanje homogenosti izolovanog preparata aktinidina.....	34
4.1.1. SDS- PAGE i 2D- PAGE .....	34
4.1.2. N-terminalno sekvenciranje .....	35
4.1.3. Masena analiza preparata aktinidina .....	35

4.2. Proteolitička aktivnost komponenti prisutnih u preparatu aktinidina.....	36
4.3. Strukturna analiza aktivnog i inhibiranog aktinidina .....	40
4.3.1. IEF i 2D- PAGE aktivnog i aktinidin-E-64 kompleksa.....	41
4.3.2. CD spektrometrija .....	42
4.3.3. Fluorimetrija.....	44
4.4. Imunološka karakterizacija aktivnog i inhibiranog aktinidina .....	45
4.4.2. <i>In vivo</i> vezivanje IgE.....	46
4.4.3. <i>In vitro</i> vezivanje IgE.....	48
4.4.4. Test aktivacije bazofila.....	48
4.5. Ispitivanje stabilnosti aktinidina i inhibiranog aktinidina u uslovima GI trakta .....	49
4.5.1. Pepsinska digestija .....	50
4.5.2. Tripsinska digestija .....	51
4.5.3. Masena spektrometrija uzoraka Act d 1 nakon digestije.....	52
4.5.4. Imunogenost aktinidina nakon digestije u SGF i SIF.....	54
4.6. Ispitivanje prisustva aktivnog i inhibiranog aktinidina u proteinskim ekstraktima kivija .....	55
4.7. Upotreba proteinskog ekstrakta kivija kao agensa za koagulaciju mleka .....	58
4.7.1. Koagulaciona aktivnost ekstrakata.....	59
4.7.3. Proteinski profili gruševine i surutke .....	61
4.7.4. Stabilnost proteinskog ekstrakta kivija pripremljenog na pH 5.0. ....	62
4.8. Ispitivanje termalne stabilnosti aktivnog aktinidina.....	63
<b>5. Diskusija.....</b>	<b>66</b>
<b>6. Zaključak .....</b>	<b>72</b>
<b>7. Eksperimentalni deo .....</b>	<b>73</b>
7.1. Priprema proteinskog ekstrakta kivija.....	73
7.2. Određivanje koncentracije proteina.....	73
7.2.1. Bradford-ova metoda.....	73
7.2.2. Određivanje koncentracije proteina spektroskopskom metodom.....	76
7.3. Prečišćavanje aktinidina iz sirovog ekstrakta kivija.....	76
7.3.2. Prečišćavanje Act d 1 na QAE-Sephadex A-50 .....	77
7.4. Elektroforetske tehnike .....	77
7.4.1. Natrijum dodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE).....	77
7.4.2. Izoelektrično fokusiranje (IEF) .....	82

7.4.3. Dvodimenzionalna poliakrilamid gel elektroforeza (2D PAGE) .....	84
7.5. Određivanje proteolitičke aktivnosti aktinidina .....	85
7.5.1. Aktivacija aktinidina .....	85
7.5.2. Inaktivacija aktinidina .....	85
7.5.3. Zimogram sa želatinom .....	85
7.5.4. Kazeinolitički esej .....	85
7.5.5. Proteolitička aktivnost enzimskih preparata prema mleku .....	86
7.6. Dobijanje poliklonskog zečijeg antiseruma na aktinidin .....	87
7.7. Elektrotransfer proteina sa poliakrilamidnog gela na NC ili PVDF membranu .....	87
7.8. Detekcija proteina u imunoblotu .....	88
7.8.1. Opšti protokol .....	88
7.8.2. Detekcija aktinidina poliklonskim anti-Act d 1 zečijim antiserumom .....	90
7.8.3. Detekcija aktinidina vezivanjem IgE iz seruma pacijenata .....	90
7.9. Kožne probe .....	91
7.10. Test aktivacije bazofila .....	91
7.11. Raketna imunoelektroforeza .....	92
7.12. Testovi digestije Act d 1 u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta .....	92
7.12.1. Digestije Act d 1 u simuliranom želudačnom soku .....	93
7.12.2. Digestije Act d 1 u simuliranom crevnom soku .....	93
7.14. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) aktinidina .....	94
7.15. Cirkularni dihroizam (CD) .....	94
7.16. Fluorimetrija .....	95
7.17. Masena spektrometrija .....	95
7.17.1. Peptidno mapiranje aktivnog i inhibiranog aktinidina .....	95
7.17.2. Određivanje molekulske mase aktinidina .....	96
7.17.3. Procena strukturnog integriteta aktinidina nakon tretmana digestije .....	96
7.18. N-terminalno sekvenciranje .....	96
<b>8. Literatura .....</b>	<b>97</b>
<b>9. Prilog A: Radovi koji čine deo disertacije .....</b>	<b>115</b>

# 1. Uvod

Od kasnih pedesetih godina prošlog veka učestalost alergija u razvijenim zemljama je u stalnom porastu. Prema poslednjim procenama trećina stanovnika ovih zemalja će u nekom periodu svog života razviti alergijske simptome. Sličan porast učestalosti nije primećen u zemljama u razvoju, ali iako je postavljeno više hipoteza, stvarni razlog pojave „alergijske epidemije” u razvijenim zemljama nije poznat.<sup>1-2</sup> Osim ukupnog porasta učestalosti alergija, u poslednjih pedeset godina je primećena i promena u učestalosti nekih vrsta alergija u odnosu na druge. Sve veći broj ljudi pati od alergija na hranu, atopijskog ekcema i alergijskog rinitisa. Istovremeno, sve su češći slučajevi ozbiljnijih alergijskih reakcija koje predstavljaju pretnju po život pacijenta.<sup>1</sup>

Alergije na hranu su IgE antitelima posredovane imunološke reakcije na komponente hrane, najčešće proteine.<sup>3</sup> Alergijska reakcija može da se javi na bilo koju namirnicu u ljudskoj ishrani, ali je već duže vreme poznato da određene namirnice, poput mleka, jaja, morskih mekušaca, orašastih plodova, pšenice i kikirikija, izazivaju većinu ovih reakcija.<sup>3-4</sup> Ali i u tom pogledu dolazi do određenih promena. Sve veći broj namirnica dospeva na tržišta gde prethodno nisu bile prisutne, a potreba da se prehrani rastuća svetska populacija dovela je i do upotrebe genetski modifikovane hrane. Kao posledica, beleže se promene u učestanosti alergijskih reakcija na neke namirnice, dok se istovremeno po prvi put detektuju i neki novi potencijalni alergeni.<sup>5-6</sup>

Do danas ne postoje dobro uspostavljeni kriterijumi za dijagnozu alergije na hranu, a dodatni problem predstavlja i činjenica da kada se dijagnoza uspostavi, jedini sasvim delotvoran mehanizam prevencije je izbacivanje određenih namirnica iz ishrane. Ovo zahteva pažljivo čitanje etiketa prehrambenih proizvoda, kao i obazrivost prilikom konzumiranja hrane koju je pripremila neko drugo lice. Studije pokazuju da se slučajno unošenje alergena dešava kod 40 - 75 % pacijenata.<sup>4,7</sup>

U cilju poboljšanja dijagnostike alergija na hranu i napretku ka razvoju delotvornijih imunoterapija, danas se sve više okreće karakterizaciji pojedinačnih alergenijskih proteina

hrane. Ovaj pristup omogućava bolje razumevanje procesa nastanka i razvoja alergijske reakcije i istovremeno otvara nove terapijske pravce za efikasnije suzbijanje alergijskih oboljenja.<sup>8-9</sup>

Normalan odgovor imunog sistema gastrointestinalnog trakta (GIT) na kontakt sa antigenom hrane predstavlja razvoj oralne tolerance, snažnog imunosupresivnog mehanizma. Smatra se da alergije na hranu nastaju prekidom u funkcionisanju ovog mehanizma, ili kao posledica njegove nedovoljne razvijenosti.<sup>10</sup> Stoga, dva najznačajnija nerazjašnjena pitanja vezana za alergije na hranu su: koje su to osobine nekih proteina hrane koje ih čine sposobnim da izazovu imuni odgovor prilikom unošenja i zašto se alergijske reakcije javljaju kod nekih ljudi, a kod drugih ne.<sup>11</sup> Što se tiče osobina samih alergena, utvrđeno je da senzitivizacija oralnim putem zavisi od digestivne stabilnosti proteina, a kod industrijski procesovanih namirnica i od strukturne stabilnosti proteina u uslovima povišene temperature. Smatra se neophodnim da protein izbegne degradaciju, tj. da se odupre denaturaciji i proteolizi tokom prolaska kroz GIT, i stigne u barem donekle intaktnom obliku do intestinalne mukozne da bi izazvao senzitivizaciju oralnim putem.<sup>12</sup>

Plod biljke kivi je jedna od namirnica koja je donedavno smatrana egzotičnom i bila teško dostupna da bi danas bila prisutna na skoro svim tržištima. Prva alergijska reakcija na ovo voće opisana je 1981. godine, a tokom svega tridesetak narednih godina dospela je među deset najčešćih uzročnika alergija na hranu.<sup>13-16</sup> Poznato je 11 alergenijskih proteina kivija, a među njima je aktinidin (Act d 1) najzastupljeniji i čini 60% proteina pulpe ovog voća.<sup>17</sup> Smatra se biomarkerom monosenzitivizacije na kivi, s obzirom da nema pokazanih reakcija ukrštene reaktivnosti sa polenima trava ili drveća, niti sa proteinima lateksa, i u većini studija je detektovan kao glavni alergen kod pacijenata alergičnih na kivi.<sup>5,18</sup>

Aktinidin spada u proteolitičke enzime iz klase cistein peptidaza i pripada papajskoj superfamiliji, zajedno sa papainom iz papaje (*Carica papaya*), bromelainom iz ananasa (*Ananas comosus*), ficinom iz smokve (*Ficus glabrata*) i dr.<sup>19</sup> Mehanizmi inhibicije cistein peptidaza su već dugo vremena predmet detaljnih istraživanja usled mogućnosti upotrebe selektivnih proteaznih inhibitora u terapiji brojnih humanih oboljenja. S obzirom da su biljne cistein peptidaze znatno dostupnije od humanih, mnoga istraživanja su fokusirana na prvobitnom rasvetljavanju mehanizama inhibicije i pronalaženju novih inhibitora

upotrebom prvo biljnih proteaza, nakon čega se dobijeni rezultati dalje ispituju na humanim proteazama.<sup>20-22</sup> Cistein peptidaze papainske superfamilije imaju i primenu u industriji, kao omekšivači mesa i koagulacioni enzimi u industriji mlečnih proizvoda.<sup>23-26</sup>

U cilju rasvetljavanja puta oralne senzitivacije i poboljšanja dijagnostike alergije na kivi, kao i bezbedne primene aktinidina u prehrambenim proizvodima, bilo je neophodno detaljno ispitivanje strukturnih i imunoloških osobina aktinidina, što je predmet istraživanja ovog rada.



## 2. Opšti deo

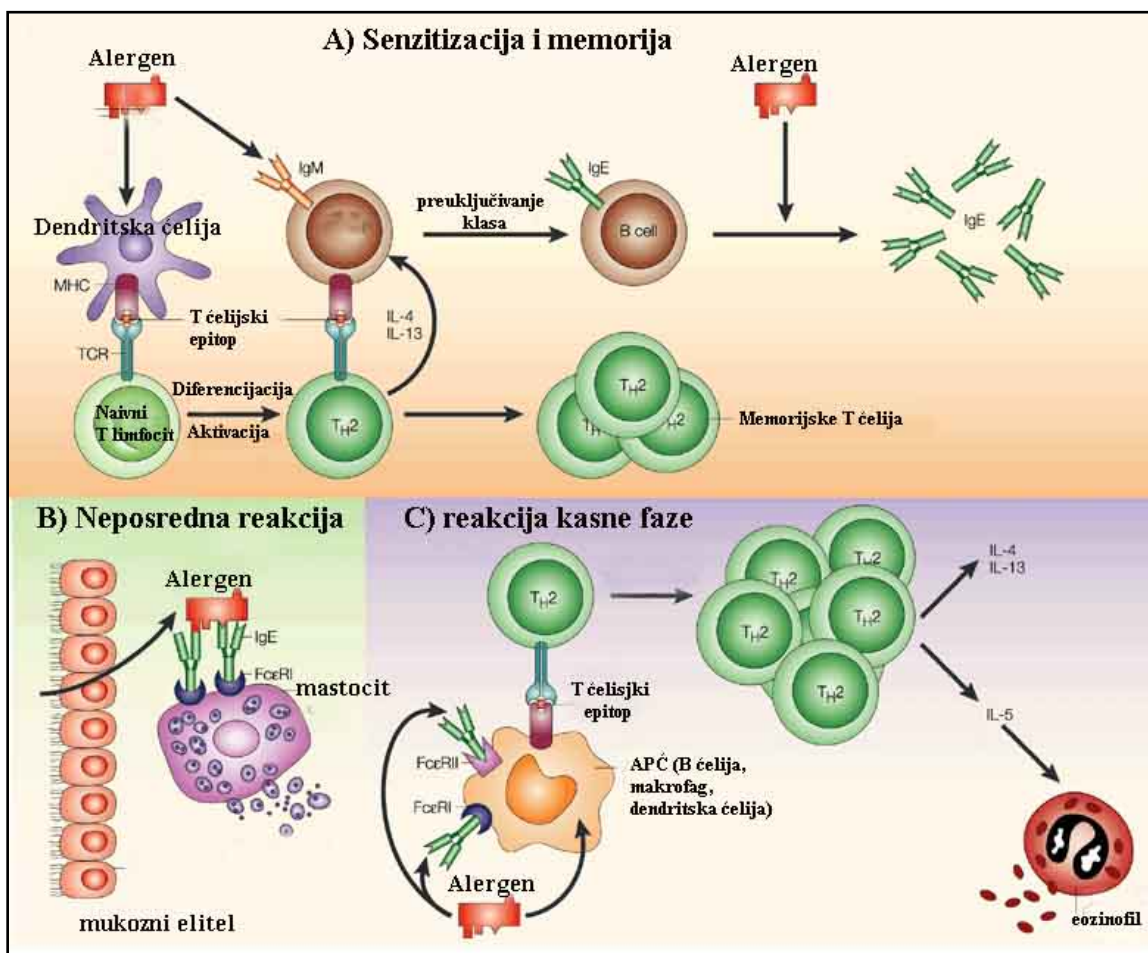
### 2.1. Alergije

Adaptivni imuni sistem obezbeđuje zaštitu organizma od infekcija prouzrokovanih bakterijama, virusima, gljivicama i parazitima. U nekim slučajevima može se dogoditi da ovaj odgovor bude preteran i neadekvatan; takav odgovor nazivamo preosetljivošću. Alergije spadaju u najčešći tip preosetljivosti i predstavljaju neadekvatan, preterano jak odgovor imunog sistema na inače bezopasne supstance prisutne u spoljašnjoj sredini.<sup>27</sup> Molekuli koji izazivaju alergijske reakcije se nazivaju alergenima i većinom su proteinske prirode. U najčešće izvore alergena spadaju poleni drveća, trava i korova, zatim krzno i epidermis životinja, insekti, kao i biljne i životinjske komponente ljudske ishrane.<sup>8</sup>

#### 2.1.1. Mehanizam nastanka alergija

Alergijski imuni odgovor nastaje kao posledica nekoliko ćelijskih i molekulskih interakcija. Izlaganje alergenu dovodi do njegove fagocitoze od strane antigen prezentujućih ćelija (dendritične ćelije, makrofagi, B ćelije). Nakon fagocitoze i procesovanja ove ćelije na svojoj površini prikazuju naivnim T limfocitima fragmente alergena u okviru glavnog kompleksa histokompatibilnosti klase II (*Major histocompatibility complex II*). Ovim procesom se uzrokuje diferencijacija T limfocita u predominantno T<sub>H</sub>2 fenotip pomoćničkih T ćelija, koje luče IL-4, IL-5 i IL-10 citokine. Nasuprot ovom procesu, kod normalnog imunog odgovora na bakterijske i virusne antigene indukuje se stvaranje T<sub>H</sub>1 fenotipa T ćelija, koje luče drugačiji panel citokina (IFN $\gamma$ , IL-2).<sup>8,28</sup>

Direktnim kontaktom T<sub>H</sub>2 i B ćelija dolazi do aktivacije B ćelija, a IL-4 inicira preoključivanje klasa kod B ćelija i produkciju IgE antitela umesto IgM. IgE antitela igraju ključnu ulogu u mehanizmu alergijske reakcije. Nastali IgE se sa velikim afinitetom vezuje za Fc $\epsilon$ RI receptore prisutne na mastocitima, eozinofilima i bazofilima i time se završava prva faza alergijske reakcije – senzitivacija (slika 2.1. A).



Slika 2.1. Mehanizam alergijske reakcije.<sup>8</sup>

Prilikom sledećeg izlaganja alergen se vezuje za IgE molekule prisutne na mastocitima, i time dovodi do umrežavanja FcεRI receptora i pokretanja signalne kaskade koja vodi aktivaciji mastocita. Aktivirani mastociti luče sadržaj svojih granula (histamin), citokine i lipidne medijatore, molekule koji su direktni uzročnici kliničkih manifestacija alergijskih reakcija (Slika 2.1. B).<sup>8,28</sup>

Reakcija kasne faze se javlja kod alergičnih pacijenata koji imaju hronične manifestacije atopije (hronična astma ili atopijski dermatitis) i posledica su aktivacije i proliferacije alergen-specifičnih T ćelijskih klonova u satima ili danima po kontaktu sa alergenom (Slika 2.1 C). TH2 ćelije, pored IL-4 i IL-13 produkuju i IL-5, citokin koji privlači eozinofile u tkivo i aktivira ih. Infiltriranje eozinofila u tkivo pluća se smatra jednom od najznačajnijih

faza u nastanku astme. Oslobađanje sadržaja granula eozinofila vodi masovnom zapaljenju i oštećivanju tkiva.<sup>8</sup>

Iako je učestala podela T pomoćničkih limfocita na  $T_H1$  i  $T_H2$  klasu, novija istraživanja su pokazala da nisu u pitanju dva sasvim razgraničena podtipa ćelija, već da ove dve klase pre svega predstavljaju krajnje polarizovane forme veoma heterogenog  $CD4^+$   $T_H$  – ćelijama posredovanog imunog odgovora.<sup>29</sup> Ekspresija alergnog fenotipa uzrokovana je genetskim faktorima, ali i faktorima spoljašnjeg okruženja. Postoje pretpostavke da bakterijske i virusne infekcije tokom rane faze života usmeravaju sazrevajući imuni sistem ka  $T_H1$  odgovoru i da time prave protivtežu razvoju  $T_H2$  odgovora. Zastupnici ove pretpostavke argumentuju da je smanjenje broja infekcija nastalih u industrijalizovanim zemljama kao posledica boljih higijenskih uslova dovela do promene ravnoteže u  $T_H1/T_H2$  odgovoru imunog sistema i povećanog broja alergijskih reakcija. Protiv higijenske hipoteze se navodi činjenica da je istovremeno u industrijalizovanim zemljama došlo i do povećanja u učestalosti  $T_H1$  autoimunih oboljenja, kao i odsustvo dokumentovane povezanosti alergijskih reakcija i parazitskih infekcija helmintima, koje su takođe posredovane  $T_H2$  odgovorom.<sup>29-30</sup>

## 2.2. Alergije na hranu

Nepoželjne reakcije na hranu podrazumevaju bilo kakav nepredviđen klinički odgovor prilikom unošenja hrane. Prema patofiziološkom mehanizmu reakcije se dele na reakcije intolerancije na hranu i na alergijske reakcije. Većina nepoželjnih reakcija spada u reakcije intolerancije i mogu biti uzrokovane kako osobinama hrane (npr. toksikološkim kontaminacijama) tako i osobinama pacijenta (metabolički poremećaji, psihološki faktori). U većini slučajeva reakcije intolerancije zavise od količine unete supstance i nisu uvek reproduktivne. Alergije na hranu se javljaju kod 2-8 % dece i 3-4 % odraslih ljudi u zapadnim zemljama i predstavlja nepoželjan *imunološki odgovor* na komponente hrane. Alergijska reakcija se javlja prilikom svakog unošenja određene namirnice i često ne zavisi od unete doze.<sup>4,31</sup>

Nakon senzitivacije na određeni alergen hrane, ponovno unošenje dovodi do brze pojave kliničkih simptoma koji uključuju povraćanje, abdominalne bolove, dijareju, svrab i

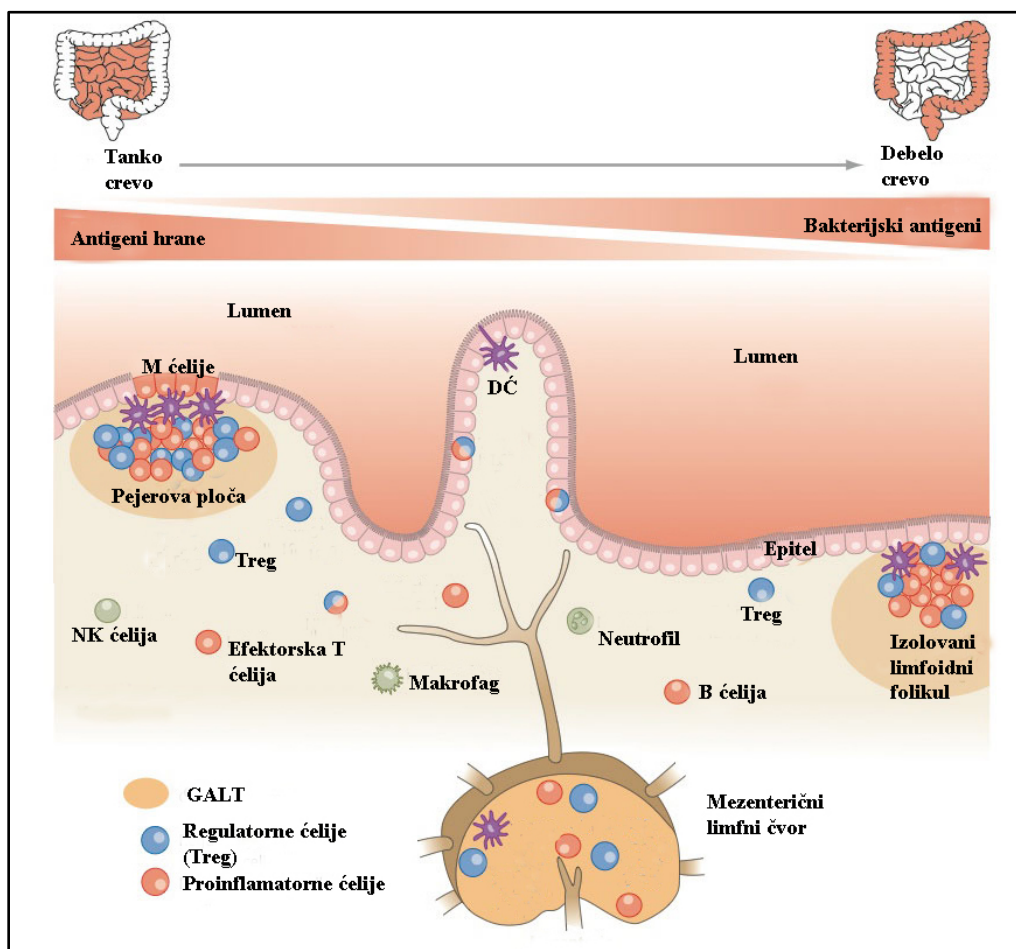
oticanje sluzokože usta, nesvestice i ponekad sistemske anafilaktičke reakcije.<sup>32</sup> Terapeutski pristup alergijama na hranu se uglavnom sastoji od preporuka za strogo izbegavanje izvora alergena i lečenje simptoma alergijske reakcije antihistaminicima i kortikosteroidima.<sup>33</sup>

Učestalost alergijskih reakcija na hranu, poput i ostalih alergijskih reakcija, je u stalnom porastu. U poslednjoj deceniji došlo je do porasta od 18 % u broju dokumentovanih slučajeva alergijskih reakcija na hranu kod dece.<sup>34</sup> Istovremeno, usled globalizacije, sve je veća dostupnost novih namirnica na tržištu, a kao odgovor na problem nedostatka hrane potrebne za rastuću svetsku populaciju pojavila se i genetički modifikovana hrana. Potreba za razumevanjem i poznavanjem strukture proteina hrane kao i mehanizama njihove interakcije sa imunim sistemom čoveka postala je jedan od prioriteta nauke o ishrani.

### 2.2.1. Imuni sistem gastrointestinalnog trakta i oralna toleranca

Gastrointestinalni trakt (GIT) je svakodnevno u kontaktu sa ogromnim brojem raznovrsnih proteina biljnog, životinjskog i mikrobnog porekla, od kojih su mnogi potencijalno imunogeni. Industrijskim procesovanjem, čime se menjaju osobine proteina hrane, kao i digestivnom razgradnjom proteina do peptida nastaju i novi imunogeni molekuli.<sup>32,35</sup>

Intestinalna mukoza obezbeđuje razmenu nutritijenata, jona i tečnosti kroz intestinalni epitel u stalnom prisustvu potencijalno štetnih luminalnih antigena i mikroba. Ova površina od preko 300 m<sup>2</sup> je kolonizovana sa više 10<sup>14</sup> mikroba i 500 različitih mikrobnih vrsta.<sup>36</sup> Stoga, nije začuđujuće što GIT predstavlja najveći imunološki organ čoveka.<sup>35</sup> Približno 70% svih limfocita u ljudskom telu se nalazi u intestinalnim intraepitelnim i subepitelnim slojevima, dok se najveći broj tkivnih makrofaga nalazi u intestinalnom zidu.<sup>36</sup> Gastrointestinalna odbrambena barijera uključuje jednoćelijski epitel povezan čvrstim vezama, gusti i debeli mukozni sloj, proteolitičke enzime, žučne soli i ekstremne pH vrednosti. Pored navedenih činioca, i komponente urođenog (NK ćelije, polimorfonuklearni leukociti, makrofagi, epitelne ćelije) i adaptivnog (intraepitelni limfociti, pejerove ploče, IgA i citokini) imunog sistema GIT-a sačinjavaju aktivnu barijeru stranim proteinima (slika 2.2).<sup>35, 37</sup>



Slika 2.2. Intestinalni imuni sistem<sup>38</sup>

Uprkos evoluciji ove kompleksne barijere, oko 2% ingestovanih antigena hrane se apsorbuje i transportuje u imunološki intaktnom obliku.<sup>39</sup> Put transporta može biti preko M ćelija (podgrupa ćelija intestinalnog epitela specijalizovanih za preuzimanje čestičnih antigena iz lumena i njihovo prebacivanje u subepitel creva do antigen-prikazujućih ćelija), preko subepitelnih dendritičnih ćelija koje izbacuju svoje dugačke nastavke direktno u lumen creva odakle preuzimaju antigene, i putem samih epitelnih ćelija. Mesto ulaska proteina može odrediti prirodu imunog odgovora.<sup>40</sup> Ipak, normalan odgovor imunog sistema na ovako transportovane antigene je stanje oralne tolerance. Ovo stanje, koje predstavlja aktivno potiskivanje imunog odgovora na antigene koji dospevaju u lumen creva, posledica je kompleksnog i do danas nedovoljno rasvetljenog mehanizma koji

uključuje klonalnu deleciju i anergiju T ćelija i aktivno učešće T regulatornih CD4+ ćelija.<sup>41</sup>

Nekoliko faktora utiče na indukciju oralne tolerance. Neki su povezani sa samim antigenom, njegovom strukturom i unetom količinom, dok su drugi faktori inherentni domaćinu, poput starosti, genetike i crevne flore.<sup>35</sup> Prekid oralne tolerance, kao i povećana propustljivost gastrointestinalnog epitela se smatraju ključnim faktorima u pojavi reakcija preosetljivosti na hranu.<sup>42-43</sup> Razlozi prekida oralne tolerance kod atopičnih pojedinaca nisu sasvim razjašnjeni, ali je predloženo nekoliko faktora koji bi mogli da utiču na razvoj alergija na hranu. Privremeno povećanje propustljivosti gastrointestinalne barijere usled infektivnih zapaljenskih procesa može povećati apsorpciju alergenijskih proteina i indukovati senzitivizaciju.<sup>44</sup>

Sa druge strane, senzitivizacija može biti olakšana ako se premosti gastrointestinalna barijera i antigen se prezentuje alternativnim putem, kao što je na primer respiratorni trakt. U oralnom alergijskom sindromu (OAS), poznatom i kao polen-hrana sindrom, oralna toleranca se ne indukuje jer do senzitivizacije dolazi respiratornim putem, usled ukrštene reaktivnosti između alergena polena i hrane. Ukrštena reaktivnost predstavlja postojanje specifičnih IgE antitela u serumu pacijenta koji prepoznaju strukturno slične epitope na alergenima različitog izvora, usled čega je moguća senzitivizacija jednim alergenim proteinom, a razvoj alergijske reakcije može biti uzrokovan drugim proteinom.<sup>45-46</sup> Primer su ukršteno reaktivni alergen polena breze Bet v 1 i njemu homolog alergen jabuke, Mal d 1, koji se inače dobro toleriše prilikom ingestije usled nestabilnosti u prisustvu digestivnih enzima.<sup>45-46</sup> Pokazano je da postoji veća sličnost u trodimenzionalnoj strukturi nego u ukupnoj identičnosti sekvenci između epitopa polena breze i epitopa alergena voća i povrća.<sup>47</sup> Primer za ukrštenu reaktivnost polena trava i voća je i ukrštena reaktivnost taumatinu- sličnog proteina iz kivija, Act d 2, sa grupom četiri alergena polena trava.<sup>48</sup> Koža je takođe predložena kao moguće mesto prvog kontakta sa alergenom (npr. ulje kikirikija u raznim kozmetičkim preparatima). U studiji koju su *Strid et al.* izveli 2005. na mišijem modelu pokazano je da epikutani kontakt sa proteinima kikirikija dovodi do indukcije specifičnih IgE i IL-4 odgovora, istovremeno sprečavajući mogućnost potonjeg razvoja oralne tolerance.<sup>49</sup>

Do prekida oralne tolerance može doći i usled pojave neravnoteže između aktivnih imunoloških komponenti gastrointestinalne barijere koja vodi ka favorizaciji T<sub>H</sub>2 odgovora. Skorije epidemiološke studije su identifikovale potencijalne faktore spoljašnje sredine koji mogu uticati na nastanak ove neravnoteže, kao što su smanjeno izlaganje bakterijama i infekcijama („higijenska hipoteza”), porast unošenja omega-6 uz istovremeno smanjenje unosa omega-3 nezasićenih masnih kiselina, i višak ili manjak vitamina D.<sup>3</sup>

Na kraju, alergije na hranu su barem delom genetski determinisane. Alergija na kikiriki, na primer, se deset puta češće javlja kod dece koja imaju brata ili sestru takođe alergične na kikiriki.<sup>50</sup> Kod pacijenata alergičnih na ovu namirnicu je ustanovljena i veća učestalost tri genotipa za humani leukocitni antigen klase II (HLA II).<sup>51</sup> Alergije na hranu se često javljaju kod pacijenata koji imaju ili će tek razviti druga atopična oboljenja. Približno trećina dece i adolescenata sa atopijskim dermatitisom imaju i alergiju na hranu, a pokazano je da postojanje alergije na hranu utiče i na razvoj alergijskih oboljenja disajnih puteva.<sup>52-53</sup>

### 2.2.2. Alergeni hrane

Dva glavna pitanja koja se postavljaju u istraživanjima alergija su: šta utiče na to da neki pojedinci razvijaju alergijske reakcije, dok drugi ne, i koje su to osobine nekih proteina koje ih čine alergičnijim od drugih. Pronalaženje odgovora na ovakva pitanja je daleko teže kod alergija na hranu, jer za razliku od kontaktnih ili inhalatornih alergena, ovde se suočavamo sa kompleksnim smešama proteina i komponenti matriksa hrane, kao i sa procesovanjem proteina prilikom obrade hrane, čime se menja njihova struktura.<sup>11</sup>

Najznačajniji uzročnici alergija na hranu su jaja, mleko, riba, morski mekušci, pšenica, kikiriki, soja i orašasto voće, ali bilo koja od mnoštva namirnica koje sačinjavaju ljudsku ishranu može prouzrokovati alergijsku reakciju.<sup>3,54</sup> Ipak, pronađeno je da je relativno mali broj proteinskih familija odgovoran za veliku većinu alergijskih reakcija.<sup>55</sup>

U studiji *Jenkins et al.* poređeni su alergeni životinjskog porekla sa njihovim humanim homolozima (u obzir su uzete proteinske familije, sekvencione analize i evolucionari odnosi) i utvrđeno je da proteini čije sekvence poseduju više od 62 % identičnosti sa humanim homolozima tipično nisu alergeni.<sup>56</sup>

Senzitizacija na hranu se može odigrati unosom alergena preko gastrointestinalnog trakta (alergeni hrane klase 1) ili kao posledica alergijske senzitizacije na inhalatorne alergene (alergeni hrane klase 2).<sup>57</sup> Alergeni hrane prve klase uopšteno dele nekoliko zajedničkih osobina: oni su rastvorni u vodi, uglavnom glikoproteini, veličine od 10 do 70 kDa i relativno stabilni na dejstvo povišene temperature, kisele sredine i peptidaza.<sup>58</sup> Takođe, alergeni proteini hrane su najčešće visoko zastupljeni u namirnici iz koje potiču.<sup>59</sup>

Nedavne studije upućuju i na značaj ugljenohidratne komponente nekih glikoproteina u alergnosti proteina hrane. *Shreffler et al.* su pokazali da glikozilovani Ara h 1, glavni alergen kikirikija, deluje kao T<sub>H</sub>2 adjuvans aktivirajući dendritične ćelija da indukuju sazrevanje T<sub>H</sub>2 ćelija, dok neglikozilovani protein nema ovo dejstvo.<sup>60</sup> *Commins et al.* su identifikovali 24 odrasla pacijenta koji su prijavili reakcije urtikarije, angioedema ili anafilakse 3 do 6 sati nakon ingestovanja govedine, jagnjetine ili svinjetine. Pronađeno je da ovi pacijenti imaju pozitivne reakcije u kožnim probama i specifična IgE antitela u serumu na galaktozil- $\alpha$ -1,3-galaktozu, gliko-komponentu proteina mesa. Ovo je prva demonstracija postojanja IgE antitela na ugljenohidratne epitope koji vode nastanku kliničkih simptoma.<sup>61</sup>

Većina biljnih alergena pripada *kupinskoj* i *prolaminskoj* superfamiliji proteina, kao i proteinskim familijama koje učestvuju u odbrambenom sistemu biljaka. *Kupinska superfamilija* uključuje, između ostalih, i alergene rezervnih proteina semena soje, kikirikija i orašastih plodova. U *prolaminsku* porodicu spadaju brojni važni alergeni leguminoza, orašastih plodova, žitarica, voća, i povrća, poput 2S albuminskih skladištenih proteina semena, nespecifičnih lipid transfernih proteina,  $\alpha$ -amilaza žitarica i proteaznih inhibitora. Biljni alergeni hrane se pronalaze i u raznolikim grupama proteina koji učestvuju u odbrani biljke od biotičkog i abiotičkog stresa. Ovde pripada 14 tipova proteina povezanih sa patogeneozom (*Pathogenesis related*, PR- proteini), kao i neke peptidaze i peptidazni inhibitori. *Profilini* spadaju u biljne alergene hrane klase 2, visoko su konzervirani u celom biljnom carstvu (70-85% identičnosti aminokiselinskih ostataka) i veoma često su ukršteno reaktivni sa proteinima polena. Pretpostavlja se da su većina alergena druge klase nepostojani u uslovima GIT-a i neotporni na dejstvo povišenih



temperatura, ali nakon senzitivacije ukršteno-reaktivnim proteinom polena može doći do pojave oralnog alergijskog simptoma prilikom konzumacije sirovog voća ili povrća.<sup>57</sup>

### 2.2.3. Stabilnost alergena u uslovima gastrointestinalnog trakta

Humani gastrointestinalni trakt ima razvijen kompleksan sistem za razgradnju hrane i ekstrakciju njenih nutritivnih komponenti. Prilikom unošenja, hrana se prvo drobi, kida i meša sa pljuvačkom u ustima. Zatim se dalje procesuje u želucu, gde pH dostiže veoma niske vrednosti (pH 2). Prilikom ulaska u tanko crevo, pH se neutrališe i procesovanje nastavlja kroz duodenum, jejunum i ileum na putu ka debelom crevu. Sve ovo vreme hrana je izložena dejstvu enzima (amilaze, peptidaze, lipaze), a u duodenumu i detergentima (žučne soli, fosfolipidi). Proteini se oslobađaju iz hrane u svim fazama ovog procesa, zavisno od pojedinačne rastvorljivosti i pristupačnosti. Enzimskoj hidrolizi podležu u želucu (pepsin), duodenumu (pankreasni enzimi: tripsin, himotripsin, elastaza) i na kraju neposredno pred apsorpciju (enzimima samih enterocita).<sup>12</sup> Nakon luminalne degradacije, proteini i peptidi se dodatno razgrađuju i intraćelijski prilikom transporta kroz enterocit. Nekada se smatralo da nakon ovog digestivnog procesa mogu preostati samo di- i tripeptidi, međutim danas je poznato nekoliko načina transporta proteina i proteinskih fragmenata alternativnim putevima kroz gastrointestinalnu barijeru, o kojima je u ovoj tezi pisano u prethodnim poglavljima.<sup>12,40</sup>

Smatra se da je za senzitivaciju organizma oralnim putem neophodno da alergen hrane dospe u delimično intaktnom obliku do intestinalne mukoze, tj. da se odupre denaturaciji i proteolizi tokom prolaska kroz GIT. Peptidni fragment mora imati barem ~3000 Da (oko 25 aminokiselinskih ostataka) da bi mogao da izazove pokretanje signalne kaskade u mastocitima vezivanjem za IgE molekule na njihovim površinama.<sup>12</sup>

*Astwood et al.* su ispitujući bezbednost genetički modifikovanih biljaka zaključili da digestiona stabilnost proteina može da posluži kao parametar u razlikovanju alergeničkih od nealergeničkih proteina.<sup>6,59</sup> Najprecizniji metod za procenu digestibilnosti proteina se zasniva na korišćenju *in vivo* testova na životinjskim modelima. Nakon hranjenja životinje, pristupa se uzimanju uzoraka digesta iz želudca, gornjeg dela tankog creva, ileuma i fecesa. Ovakve studije predstavljaju i tehnički i etički izazov, pa se procene digestibilnosti proteina

najčešće odvijaju u testovima simuliranih uslova želudačnog soka (*Simulated gastric fluid* - SGF) i simuliranih uslova crevnog soka (*Simulated intestinal fluid* - SIF), korišćenjem multifaznih sistema sa sekvencijalnim dodavanjem digestivnih enzima, surfakanta, fosfolipida i žučnih kiselina u fiziološki relevantnim količinama.<sup>12</sup> Ipak, uslovi pod kojima različiti autori primenjuju test proteolize u SGF-u se razlikuju. *Fu* je utvrdio da digestibilnost proteina u SGF testu u mnogome zavisi od relativnih količina pepsina i test-proteina i vreme potrebno za potpunu digestiju proteina se kreće od 0 do 120 min.<sup>62</sup>

#### 2.2.4. Uticaj termalne obrade hrane na alergenost proteina

Prilikom procesovanja hrane proteini mogu pretrpeti hemijske modifikacije, može doći do razvijanja proteina ili do agregacije. Ovakve promene u strukturi proteina utiču na njegovu stabilnost u uslovima gastrointestinalnog trakta, a time i na oblik u kojem su proteini prezentovani imunom sistemu. Do koje mere će doći do promene strukture proteina ne zavisi samo od osobina samog proteina, već i od uslova u kojima se proces odvija tj. vremena izlaganja, kao i od pH vrednosti i temperature na kojoj se vrši obrada. Uticaj ima i prisustvo drugih supstanci, poput lipida, polifenola i šećera.<sup>11</sup>

Pokazano je da prisustvo disulfidnih mostova značajno doprinosi termalnoj stabilnosti proteina. Primer proteina sa konzerviranim cisteinskim ostacima je prolaminska superfamilija. Oni poseduju 6 ili 8 cisteinskih ostataka, povezanih u 3 ili 4 disulfidna mosta koji spajaju polipeptidne lance. Ovako "ojačana" struktura im omogućava stabilnost prema mnogim hemijskim i fizičkim denaturišućim sredstvima, uključujući niske pH vrednosti, haotrope, visoke temperature i pritisak. Primeri ovakvih alergena su Ber e 1 iz brazilskog oraha i alergen susama Ses i 1.<sup>63-65</sup> Poznata je i termalna stabilnost nespecifičnih lipidnih transfer proteina (nsLTP), usled čijeg prisustva sok breskve ostaje alergen i nakon kuvanja, kora jabuke izaziva alergijske simptome i nakon pečenja na 180°C, a alergenost kukuruza se zadržava i nakon kuvanja palente na 100°C.<sup>65-67</sup> IgE raktivnost nsLTP-ova preživljava i fermentacione procese tokom produkcije vina ili piva, bez obzira što je LTP u pivu u suštinski razvijenoj i hemijski modifikovanoj formi.<sup>68-70</sup>

Termolabilni alergeni mogu uzrokovati pojavu alergijskih reakcija i nakon termičkog tretmana. Alergeni koji poseduju sekvencijalne epitope mogu izazvati reakcije kod pacijenata i nakon produženog termičkog tretmana ili parcijalne hidrolize, dok oni sa konformacionim epitopima, usled gubitka tercijarne strukture prilikom ovakvih tretmana, prestaju da izazivaju alergene reakcije.<sup>71-72</sup> Postojanje alergijskog odgovora zavisi i od pacijenta, tj. na koju vrstu epitopa poseduje specifična IgE antitela. U nedavnoj studiji je pokazano da 70% do 80% dece koja su alergična na mleko ili jaja toleriše temperaturno denaturisane (pečene) oblike ovih proteina. Predloženo je da ova deca imaju IgE antitela uglavnom na konformacione epitope i da će prirodnim putem prerasti svoje alergije na hranu.<sup>73-74</sup>

### 2.2.5. Dijagnostika alergije na hranu

Do danas još uvek nisu dobro definisani kriterijumi za dijagnozu alergija na hranu. Analiza kliničke istorije pacijenta i dalje igra ključnu ulogu u procesu dijagnoze. Tom prilikom lekar pokušava da utvrdi da li je došlo do pojave alergijskih simptoma, koja hrana je potencijalni uzrok reakcije i da li je mehanizam reakcije posredovan IgE antitelima. Eliminacione dijetе se koriste kako u terapeutske, tako i u dijagnostičke svrhe.<sup>42</sup> Najčešći laboratorijski testovi koji se koriste prilikom utvrđivanja alergija na hranu su:<sup>75</sup>

a) *in vivo* metode (kožne probe, oralni (provokacioni) testovi) i

b) *in vitro* metode (utvrđivanje prisustva specifičnih IgE antitela u serumu, testovi aktivacije bazofila)

Kožne probe se izvode subkutanim nanošenjem male količine antigena na unutrašnju stranu podlaktice. Na kožu nadlaktice se prvo nanese rastvor alergena, a zatim se koža na mestu nanošenja blago zagrebe lancetom. Pozitivnim rezultatom se smatra pojava otoka čiji je prečnik za barem 3 mm veći od onog koji se javlja u negativnoj kontroli, dok se prečnik nastalog otoka od preko 8 mm smatra jakom pozitivnom reakcijom koja indukuje mogućnost kliničke reaktivnosti.<sup>42</sup> Uopšteno, pozitivan rezultat kožne probe ima svega 50% uspešnosti u potvrđivanju dijagnoze, ali je zato u preko 95% slučajeva precizan u utvrđivanju nepostojanja alergije na testiranu namirnicu, tj. lažni negativan rezultat je izuzetno redak.<sup>52</sup> Dodatni problemi ovog testa su i uticaj starosti pacijenta, prethodnog

izlaganja antigenu, kao i prirode samog antigena na očekivane prečnike otoka. Takođe, ovim testom nije moguće izvesti korelaciju između jačine reakcije i ozbiljnosti kliničkih simptoma.<sup>3</sup> Ipak, ovaj test ostaje jedan od standarda u dijagnostici alergija na hranu usled njegove velike osetljivosti, brzine izvođenja i niske cene.<sup>42,75</sup>

Oralni (provokacioni) testovi, u kojem pacijent u prisustvu medicinskog osoblja unosi postepeno sve veće doze potencijalnog alergena, se mogu obavljati tako da ili pacijent ili i pacijent i lekar (duplo slepi test) ne znaju koji od pripremljenih uzoraka sadrži alergen, a koji predstavlja placebo. Test u kojem ni lekar ni pacijent nisu upoznati sa sastavom pripremljenog uzorka se smatra zlatnim standardom dijagnostike alergija na hranu. Ipak, ovakav test zahteva dosta vremena za pripremu, prisustvo stručnih lica i donosi mogućnost razvoja neželjenih reakcija tokom samog testa.<sup>4</sup>

*In vitro* IgE eseji se zasnivaju na inkubiranju specifičnih IgE antitela iz seruma pacijenta sa potencijalnim alergenima koji su imobilizovani na čvrstom nosaču.<sup>76</sup> Vezivanje alergen-specifičnih IgE antitela se prati dodatkom specifičnih anti- IgE antitela kojima se generiše signal i sistemom za detekciju generisanog signala. U ove eseje spadaju radioalergosorbentni test – RAST, koji više nije u širokoj upotrebi, međutim ostala je praksa da se u medicinskoj terminologiji pod ovim pojmom često označavaju i svi kasnije razvijeni *in vitro* testovi, poput modifikovanog radioalergosorbentnog testa – MAST, fluorescentnog alergosorbentnog testa – FAST i, u novije vreme, ImmunoCAP sistema.

*In vitro* metode pružaju neke prednosti u odnosu na *in vivo* metode, kao što su precizna kvantifikacija rezultata, apsolutna bezbednost testa, i postojanje mogućnosti dužeg skladištenja uzoraka za serološke analize. U mane *in vitro* testova spadaju vreme potrebno za njihovu izradu i cena, međutim napredovanje tehnologije utiče na smanjenje cene i automatizaciju ovih testova, što donosi i povećane mogućnosti, poput višestrukih simultanih analiza IgE antitela.<sup>75,77</sup>

#### 2.2.6. Terapija alergija na hranu

Kada se jednom uspostavi dijagnoza alergije na određenu namirnicu jedina do sada potpuno uspešna metoda terapije je strogo izbegavanje unosa alergene supstance. Ovo zahteva veoma pažljivo čitanje etiketa na hranljivim namirnicama, pažnju prilikom

konzumiranja hrane koju je pripremila neko drugo lice (npr. u restoranima) i izbegavanje kontaminacije hrane alergenom tokom pripreme. Studije pokazuju da se slučajno unošenje alergena dešava kod 40- 75 % pacijenata.<sup>7</sup> Razni medikamenti, poput antihistaminika, mogu pomoći u otklanjanju simptoma, a u slučaju anafilaktičke reakcije pacijentu se daje epinefrin.<sup>58</sup> Jedini, do sada, opisan i primenjen tretman alergija koji utiče na prirodnu regresiju bolesti je alergen-specifična imunoterapija. Konvencionalna imunoterapija podrazumeva potkožno injektovanje serije rastućih doza alergena ili alergenog ekstrakta pacijentatu.<sup>78</sup>

Potkožno injektovanje nativnih alergena u terapiji alergija na hranu može izazvati anafilaktičke reakcije.<sup>79</sup> Prilikom svakog injektovanja alergena, a posebno tokom davanja visokih doza alergena pacijentima, postoji rizik od prepoznavanja injektovanih proteina od strane IgE ili T<sub>H</sub>2 ćelija i pojave ozbiljnih sporednih efekata.<sup>78</sup> Iz ovih razloga se nove strategije u imunoterapiji razvijaju u drugačijim pravcima.<sup>80</sup> Sublingvalna imunoterapija podrazumeva prezentovanje antigena na sluzokoži usne duplje, dok modifikovane proteinske vakcine sadrže hipoalergenske preparate sa izmenjenim IgE vezujućim epitopima na alergenima.<sup>81</sup> Strategija upotrebe plazmidnih DNK-kodiranih vakcina zasniva se na indukciji endogene proizvodnje antigena, sa nadom da bi to povećalo tolerancu kod domaćina.<sup>58</sup> Ispituje se i upotreba hemijski modifikovanih formi alergena (alergoidi), upotreba alergenijskih peptida, hibridnih alergena i alergena sa vezanim imunostimulatornim molekulima ili adjuvansima koji bi vodili pojačavanju T<sub>H</sub>1 imunog odgovora.<sup>82-85</sup>

Pristup koji se u ovom trenutku najviše ispituje je neinjektivna oralna imunoterapija prilikom koje pacijent ingestuje postepeno sve veće količine alergena do pojave desenzitizacije. Dosadašnja istraživanja, međutim, nisu utvrdila da li dolazi samo do desenzitizacije, ili se ovim putem može indukovati oralna toleranca, koja bi omogućila zaštitu od alergijskih reakcija i nakon dužeg odsustva kontakta sa alergenom.<sup>86-88</sup>

### 2.2.7. Značaj karakterizacije alergena hrane u dijagnostici i imunoterapiji

Prilikom utvrđivanja alergije na mnoge vrste voća i povrća i danas se koriste komercijalno pripremljeni ukupni proteinski ekstrakti ovih namirnica. Međutim, biološki ekstrakti su pre svega heterogena smeša alergenijskih i nealergenijskih komponenti. Alergeni

molekuli u samom ekstraktu mogu činiti minornu frakciju ukupnog sadržaja ekstrakta. Većina alergeni izvora (npr. breza, dlake životinja, grinje, kivi itd.) imaju barem nekoliko glavnih i sporednih alergena, a neki alergeni se teško ekstrahuju ili su, pak, labilni i dolazi do njihove potpune ili delimične degradacije tokom ekstrakcije. Nadalje, biološki materijal je inherentno heterogen po pitanju alergnog sadržaja. Sastav proteina u smeši može zavisi od klimatskih uslova tokom rasta biljke, ili perioda u kojem su ubrani plodovi. Dodatan problem predstavlja i činjenica da biološki materijal može biti kontaminiran supstancama stranog porekla. Tako, ekstrakti voća i povrća mogu sadržati gljivice ili herbicide. Na kraju, mnoge namirnice sadrže ukršteno reaktivne alergene, što može dati lažne pozitivne rezultate.<sup>58,89</sup>

U imunoterapiji tretiranje pacijenta smešom alergena može da bude neuspešno (kada ekstrakt sadrži male količine molekula na koji je pacijent alergičan), ili može da izazove senzitivaciju pacijenta na neku drugu komponentu primenjene smeše. Da bi se izbegli ovi neželjeni efekti, teži se ka što češćoj primeni čistih proteina u imunoterapiji. Efektivna i specifična terapijska vakcina može biti kreirana samo na osnovu poznavanja strukture prirodnog alergena. Zato se pribegava njihovoj karakterizaciji, određivanju sekvence, sekundarne i tercijarne strukture, kao i mapiranju alergeni epitopa.<sup>8</sup>

Upotrebom pojedinačnih alergena moguće je utvrditi koji protein alergnog izvora izaziva reakciju, kao i predvideti moguće reakcije izazvane ukrštenom reaktivnošću. Na kraju, poznavanje proteinske strukture prirodnog alergena otvara mogućnost za proizvodnju njegovog rekombinantnog homologa i dalji razvoj dijagnostike i terapije u pravcu proizvodnje hipoalergena i alergena kuplovanih za adjuvanse, kao i razvijanje profilaktičke vakcine u budućnosti.<sup>90</sup>

## **2.3. Alergija na plod kivija**

### **2.3.1. Kivi**

Kivi je prvi put opisan 1847. i tada mu je dodeljeno latinsko ime *Actinidia chinensis*.<sup>91</sup> Ova biljka je poreklom iz oblasti u dolini reke Jangcekjang i oduvek je predstavljala popularnu namirnicu u ishrani lokalne populacije, koja i danas prikuplja divlji plod kivija.

Transformacija malog i tvrdog, bobičastog divljeg ploda u mesnatiji i ukusniji kivi kakav poznajemo danas otpočela je početkom dvadesetog veka prenosom nekoliko biljaka iz Kine na severno ostrvo Novog Zelanda. Kiviju je godila topla, vlažna klima i vulkansko zemljište, i u naredne tri decenije loze su pažljivo selekcionisane i kalemljene. Do popularizacije ovog voća dolazi tokom Drugog svetskog rata kada su vojnici stacionirani na Novom Zelandu zavoleli ukus ovog ploda. Kada je Novi Zeland tokom 1962. otpočeo izvoz ovog voća u SAD dodeljeno mu je komercijalno ime kivi, po nacionalnoj ptici Novog Zelanda.<sup>92</sup> Biljka kivi raste kao visoka, lozama slična struktura, i često dostiže visinu od preko 9 metara. Za uzgoj joj je potrebna duga sezona od preko 200 dana godišnje bez mraza.<sup>13</sup>

Kivi pripada većem rodu *Actinidia*, koji sadrži mnoge vrste i mnoge varijetete. Sama vrsta *Actinidia chinensis* koja se tradicionalno uzgajala na Novom Zelandu se smatrala polimorfnom i pronađeno je više varijeteta (var. *chinensis*, var. *hispida* i var. *setosa*). Godine 1986. zaključeno je da postoji dovoljno razlika između *A. chinensis* var. *chinensis* i *A. chinensis* var. *hispida* da bi se kivi reklasifikovao u odvojene vrste. Kivi koji se danas najviše komercijalno uzgaja je nazvan *Actinidia deliciosa* (A.Chev) C.F. Liang et A.R. Ferguson var. *deliciosa*.<sup>93</sup> U novije vreme, osim zelenog kivija, na tržištu je sve popularniji i zlatni kivi koji se razlikuje od zelenog po ukusu, ali i po sadržaju proteina.<sup>94</sup>

### 2.3.2. Alergeni kivija

Do danas je identifikovano i opisano 11 alergeni proteina prisutnih u plodu kivija (tabela 2.1).<sup>15</sup> Alergija na kivi se najčešće povezuje sa alergijama na polen trava i breze, a takođe i sa lateks-voće sindromom, i smatra se da 12% do 39% pojedinaca alergičnih na lateks pokazuje alergijske simptome i na kivi.<sup>95</sup> Ukrštena reaktivnost je ustanovljena i između kivija i maslina, smokvi, avokada, banana, kestena, dinje, semenki susama, lešnika, i raži. Ipak, većina ovih ukrštenih reakcija ima mali klinički značaj.<sup>15,96,97</sup>

I dok su alergeni Act d 3, Act d 8 i Act d 9 indikativni za tipične reakcije ukrštene reaktivnost, Act d 1 (aktinidin) se smatra markerom monosenzitizacije na kivi, jer ne pokazuje ukrštenu reaktivnost sa alergenima polena i trava.

Tabela 2.1. Alergeni proteini kivija

<b>Alergen</b>	<b>Identifikacioni broj u bazi podataka</b>	<b>Molekulska masa, kDa (SDS-PAGE)</b>	<b>Proteinska familija/ Biohemijsko ime</b>	<b>Ukrštena reaktivnost</b>
<b>Act d 1</b>	UniProt P00785	27	Aktinidin	Nema
<b>Act d 2</b>	UniProt Q5ND92	24	Protein sličan taumatinu	Polen trava
<b>Act d 3</b>	UniProt P85063	42	Glikoprotein nepoznate funkcije	Polen trava i breze, lateks
<b>Act d 4</b>	UniProt Q6TPK4	11	Fitocistatin	Neutvrđeno
<b>Act d 5</b>	UniProt P84527	26	Kivelin	Neutvrđeno
<b>Act d 6</b>	UniProt P83326	18	Pektin metilesterazni inhibitor	Neutvrđeno
<b>Act d 7</b>	UniProt P85076	50	Pektin metilesteraza	Neutvrđeno
<b>Act d 8</b>	GenBank AM489568	17	Protein povezan za patogenezu	Polen breze
<b>Act d 9</b>	Genbank FG438715	14	Profilin	Polen breze i trava, lateks
<b>Act d 10</b>	UniProt P85205	10	nsLTP1	Neutvrđeno
<b>Act d 11</b>	UniProt 85524	17	Glavni lateks protein	Neutvrđeno

Utvrđeno je da je 21% do 51% od ukupnog broja kivi alergičnih pacijenata monosenzitivisano na kivi, i kod ovih pacijenata je učestalija pojava ozbiljnijih kliničkih simptoma u odnosu na simptome pacijenta koji su pored kivija alergični i na polen ili lateks.<sup>15</sup> Aktinidin je u većini studija detektovan kao glavni alergen kod pacijenata alergičnih na kivi. Izuzetak ovome je *in vitro* testiranje kojim je utvrđeno da se Act d 1 ne može smatrati glavnim alergenom kivija u Velikoj Britaniji.<sup>18</sup>



### 2.3.3. Učestalost i simptomi alergije na kivi

Kivi je dobar primer posledica koje mogu nastati uvođenjem nove namirnice u ljudsku ishranu. Od njegove prve pojave 60-tih godina prošlog veka postao je veoma popularan u ljudskoj ishrani usled prijatnog ukusa i visokog sadržaja vitamina C (84-216 mg askorbinske kiseline/100 g ploda).<sup>98</sup> Prva alergijska reakcija na kivi je dokumentovana 1981. godine, a u narednih trideset godina kivi je dospao do samog vrha liste namirnica sa najvećom učestanošću izazivanja alergijske reakcije na hranu.<sup>13,59</sup>

U nedavno obavljenoj studiji na studentskoj populaciji u Finskoj, od 286 pacijenata sa atopijskim dermatitisom ili astmom, 38.6% je imalo alergijsku reakciju na kivi, čime je kivi dospao na prvo mesto od 25 testiranih namirnica.<sup>14</sup> U Švedskoj studiji iz 2003. godine skoro polovina (47%) pacijenata sa alergijom na polen breze prijavilo je i alergijske simptome na kivi, čime je dospao na prvo mesto od 66 različitih ispitivanih namirnica.<sup>15</sup> U francuskoj školskoj populaciji, prema studiji iz 2005. kivi je treći najčešći izazivač alergijskih reakcija, odmah iza mleka i jaja, ostavivši time na listi iza sebe tradicionalne alergene izvore poput kikirikija, ribe, škampa i orašastih plodova.<sup>16</sup>

Oralni alergijski sindrom (OAS) i urtikarija (koprivnjača) su najčešće manifestacije alergija na kivi. Simptomi 65% - 73% pacijenata su ograničeni samo na OAS, često dokumentovan kod pacijenata sa polen - voće alergijom. Ipak, između 18% i 28% slučajeva alergije na kivi su sistemske reakcije. Sistemske reakcije se češće javljaju kod pacijenata koji nisu alergični na polen.<sup>10,14,94,99</sup> U dokumentovane simptome spadaju i disfagija, mučnine i povraćanje, zatim kihanje i drugi respiratorni simptomi, kao i slučajevi anafilaktičkih reakcija.<sup>13, 100-102</sup>

Dijagnoza alergije na kivi se najčešće zasniva na kožnim probama u kojima se koristi ekstrakt kivija, ili detekcijom i kvantifikacijom specifičnog IgE-a komercijalnim kitovima. Biohemijska varijabilnost alergenog izvora i relativno visoka učestalost lažnih pozitivnih rezultata predstavljaju ograničavajuće faktore u ispravnoj dijagnozi alergije na kivi.<sup>10,97</sup> Takođe, pretpostavlja se da degradacija drugih alergena proteolitičkom aktivnošću aktinidina utiče na dijagnostičku osetljivost komercijalnih ekstrakata, i da ova degradacija počinje još od trenutka oslobađanja enzima prilikom ekstrakcije, i zatim se nastavlja u

periodu skladištenja ekstrakta.<sup>5</sup> Relativna količina proteinskih komponenti kivijsa zavisi i od faze zrelosti prilikom branja, kao i od uslova skladištenja i daljeg tretmana plodova nakon branja.<sup>103</sup>

## 2.4. Cistein peptidaze

Velika proteinska familija peptidaza može se podeliti na endopeptidaze i egzopeptidaze, na osnovu toga gde seku peptidnu vezu. Ovi enzimi se dalje mogu klasifikovati na osnovu reaktivnih grupa u aktivnom mestu koje učestvuju u katalizi na serin, cistein i aspartat peptidaze, zatim metalopeptidaze, treonin peptidaze i peptidaze sa glutaminskom kiselinom u aktivnom mestu.<sup>104</sup>

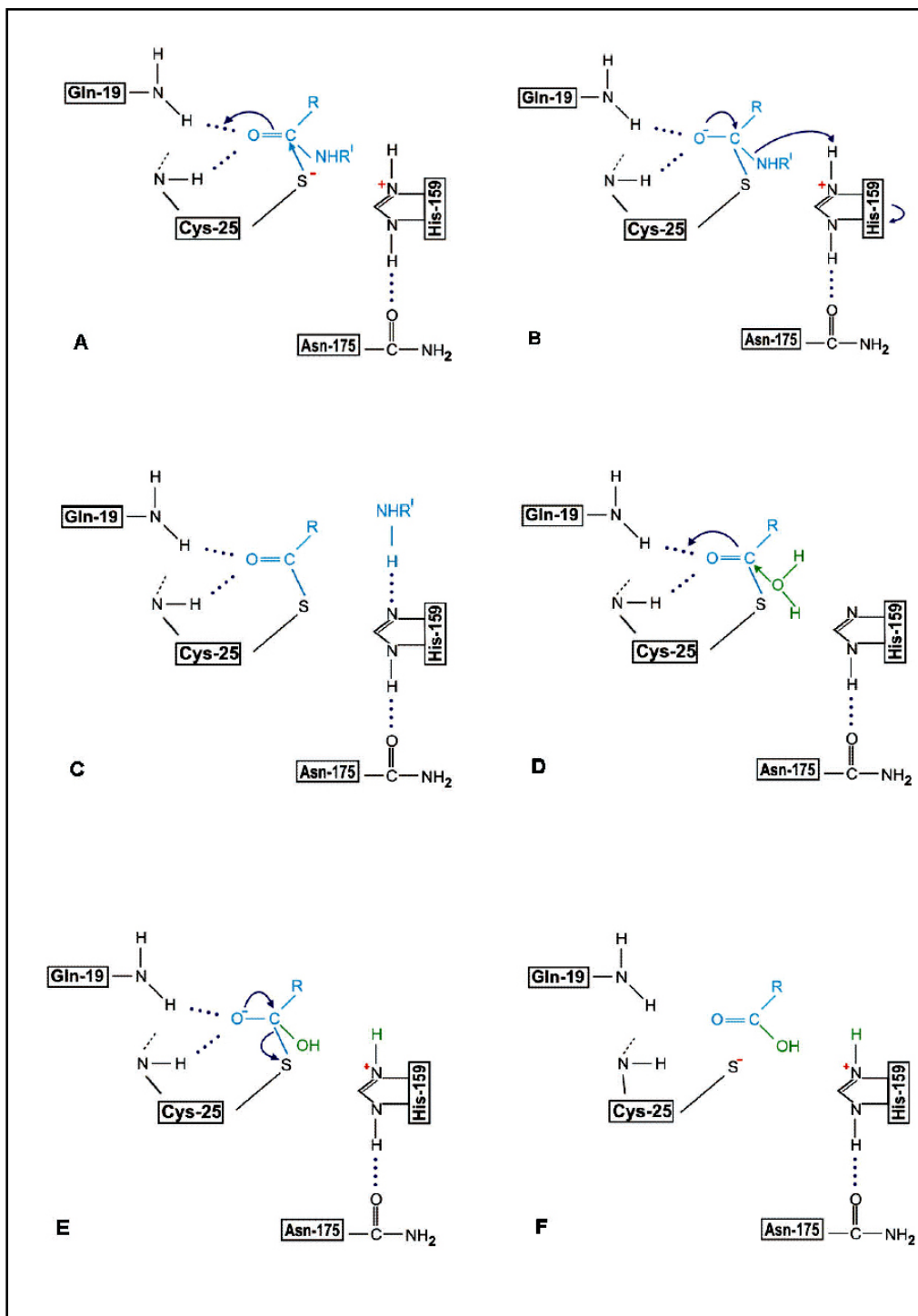
Cistein peptidaze, koje se u starijoj literaturi nazivaju i tiol peptidazama, su pronađene u virusima, bakterijama, protozoama, gljivama, biljkama i životinjama.<sup>22</sup> *Rawlings i Barrett* (1993) su klasifikovali peptidaze u familije i klanove na osnovu strukturne i evolutivne povezanosti, pri čemu klan sačinjava grupa familija sa evolutivnom povezanošću.<sup>105</sup> Cistein peptidaze uključuju preko 40 familija peptidaza, grupisanih u najmanje 6 superfamilija, tj. klanova. Većina cistein peptidaza pripada papajnskoj ili legumajnskoj familiji. Ostale klanove čine kaspaze, kalcijum-zavisni kalpaini, ubikvitin C terminalne hidrolaze i ubikvitin-specifične peptidaze.<sup>104,106</sup>

Visok nivo konzerviranosti sekvence kod cistein peptidaza ukazuje na mogućnost da su evoluirale iz zajedničkog predačkog proteina. Predloženo je da su peptidaze papajnske familije prvobitno funkcionisale u digestivnim vakuolama protozoa, što bi objasnilo i njihovu današnju povezanost sa intracelularnim odeljcima, poput, npr. lizozoma životinjskih ćelija.<sup>107</sup>

### 2.4.1. Mehanizam katalitičke aktivnosti cistein peptidaza

Prvi korak u katalitičkom procesu cistein peptidaza podrazumeva formiranje reaktivnog tiolatnog/ imidazolijum jonskog para ( $\text{Cys-S}^-/\text{His-Im}^+$ ), koji nastaje kao rezultat transfera protona između Cys25 i His159 (numeracija je po sekvenci papajna). Jonskim sparivanjem ove dve grupe otpočinje katalitički mehanizam. Tiolatni anjon napada karbonilnu grupu

peptidne veze koja se nalazi pored one koja će biti raskinuta i dvostruka veza između ugljenika i kiseonika se konvertuje u jednostruku (slika 2.3 A).



Slika 2.3. Mehanizam katalitičke aktivnosti cistein peptidaza na primeru papaina.<sup>20</sup>

Kiseonik sada ima negativnu ukupnu šaržu što omogućava stvaranje prvog tetraedarskog tranzicionog stanja. Oksi-anjon je stabilizovan vodoničnim vezivanjem za NH grupu R-ostataka Gln19 i za NH grupu kičme u mestu Cys25, čime se najverovatnije formira oksianjonska grupa (Slika 2.3 B). Sledi rotacija His ostataka, koja omogućava transfer protona sa imidazolovog katjona na azot peptidne veze koja se seče i dolazi do hidrolize. Novoformirani suspratni amin je vodonično vezan za His159 enzima, dok je karboksilni deo supstrata vezan sa Cys 25 preko tioestarske veze, time formirajući acil-enzim (Slika 2.3 C). U sledećem koraku dolazi do disocijacijeaminskog dela supstrata i on se zamenjuje molekulom vode. Imidazolov azot doprinosi polarizaciji molekula vode, koji za uzvrat napada karbonilni atom acil-enzima (Slika 2.3 D). Ovo je praćeno formacijom drugog tetraedarskog intermedijera (Slika 2.3 E). U poslednjem koraku, tioestarska deacilacija dovodi do regeneracije karboksilne grupe hidrolizovanog supstrata i oslobađanja aktivnog enzima (Slika 2.3 F).<sup>20,22,108</sup>

#### 2.4.2. Papainska familija cistein peptidaza

Papain, enzim iz lateksa papaje (*Carica papaya*) je najproučavaniji enzim ove familije. Njega karakteriše struktura sa dva domena i aktivnim mestom smeštenim između domena. Enzimi ove familije se sintetišu u neaktivnoj ili manje aktivnoj formi prekursora, koji sadrže prosekvencu i N-terminalnu signalnu sekvencu. Aktivacija se odigrava intra- ili intermolekulskom proteolizom.<sup>109</sup> Osim cisteina u aktivnom mestu na poziciji 25 (Cys 25) i Histidina na poziciji 159 (His 159) za ovu familiju cistein peptidaza je katalitički važan i asparagin na poziciji 175, koji omogućava ispravnu orijentaciju His 159. Osim toga, ustanovljeno je da ove peptidaze preferencijalno seku peptidne veze kada je arginin na poziciji P1 ili kada su Phe, Ile ili Leu na poziciji P2.<sup>21</sup>

Enzimi iz papainske familije koji imaju najveći stepen homologije sa papainom su ostali enzimi papaje (karikain, himopapain A i B) i proteini drugih viših biljaka, kao što su bromelain iz ananasa (*Ananas comosus*), ficin iz smokve (*Ficus glabrata*), i aktinidin iz kivija (*Actinidia deliciosa*). Uprkos postojanju divergencije u aminokiselinskim sekvencama između ovih enzima, aminokiselinski ostaci bitni za strukturu i aktivnost su visoko konzervirani i ukazuju na sličnost tercijarnih struktura. Ovo je pokazano na primeru

papaina i aktinidina, čije polipeptidne kičme se skoro mogu sasvim preklopiti, bez obzira što im je identičnost aminokiselinske sekvence svega 52%.<sup>17</sup> Ipak, skorije publikacije ukazuju i na razlike u hemijskoj okolini aktivnog mesta papaina i aktinidin, a poznato je da postoji i značajna razlika u pI vrednosti ova dva protein (papain 8.75, aktinidin 3.4).<sup>110-114</sup>

## 2.5. Aktinidin

Arcus je prvi 1959. godine opisao grubo izolovanje enzima iz ploda kivija (*Actinidia deliciosa*) koji je odgovoran za proteolitičko dejstvo soka kivija na želatin.<sup>115</sup> Nazvan aktinidin, ovaj enzim su *McDowall et al.* 1970. prečistili u kristalnom obliku i pokazali da po svojoj aktivnosti prema sintetičkim estarskim supstratima liči na papain. Tretmanom sa jod-acetamidom i drugim poznatim sulfhidrilnim blokirajućim agensima utvrđeno je da je ovom enzimu potrebna intaktna sulfhidrilna grupa za aktivnost i autori su predložili da aktinidin pripada grupi cistein peptidaza.<sup>116</sup>

*Boland et al.* su 1972. ultracentrifugiranjem procenili molekulsku masu aktinidina na oko 26 kDa i potvrdili da supstratna specifičnost aktinidina odgovara specifičnosti papaina i ficina.<sup>117-118</sup>

Molekulska struktura aktinidina rasvetljenja je kristalografijom X-zracima, prvo do rezolucije od 2.8 angstrema, a zatim i do rezolucije od 1.7 angstrema.<sup>119-120</sup> Uz aminokiselinsko sekvenciranje koje su 1978. izveli *Carne i Moore*, kristalografske studije su potvrdile homologiju aktinidina sa papainom i njegovu klasifikaciju u papainsku familiju cistein peptidaza. *Podivinsky et al.* su 1989. sekvencirali nukleotidnu sekvencu aktinidina, a trodimenzionalnu strukturu su rasvetlili *Varughese et al.* 1992.<sup>113,121-122</sup>

*Lewis* i saradnici su 1987 detektovali da je aktivnost aktinidina najviša u pulpi zrelog ploda i iznosi 27 600 U/kg ploda, dok se u koži kivija može detektovati aktivnost od samo 7 200 U/kg. *Nieuwenhuizen* je imunohistološkim metodama pokazao da aktinidina ima najviše u perikarpu, gde je prisutan u malim ćelijama, ali ne i u velikim ćelijama perikarpa zrelog ploda *A. deliciosa* u periodu branja. Unutar malih ćelija, aktinidin je difuzno lokalizovan unutar vakuola i asociran sa plazminom membranom ili je prisutan kao sloj unutar plastida, u blizini granula skroba.<sup>23,123</sup>

Nekoliko biljaka akumulira izuzetno visoke koncentracije cistein peptidaza u specifičnim organima ili vrstama ćelija. Papaja proizvodi više vrsta cistein peptidaza – papain, himopapain, karikain; smokve akumuliraju veliku količinu ficina u plodu, dok ananas proizvodi bromelain i u plodu i u stabljici. Aktinidin je najzastupljeniji protein u plodu kivi, gdje sačinjava 60% ukupnih proteina, ali nije prisutan u drugim tkivima kivi.<sup>17,19</sup>

Funkcija peptidaza koje su prisutne u ovako visokim količinama još uvek nije poznata, ali pretpostavlja se da imaju ulogu kao skladišteni protein, ili da doprinose odbrani od insekata, biljnih oboljenja i raznih oblika stresa.<sup>124</sup>

### 2.5.1. Molekulska struktura aktinidina

Aktinidin se sintetizira u obliku preproteina sa signalnim peptidom koji ga usmerava u endoplazmatični retikulum i N- i C-terminalnim propeptidima. Ovaj enzim se sintetizira kao zimogen i zatim obrađuje u aktivnu formu sekrecijom ili sekvestracijom u ćeliji.<sup>123</sup>



*Slika 2.4. Struktura aktinidina.*<sup>122</sup>

Zreli oblik molekula aktinidina se sastoji od jednog polipeptidnog lanca sa 220 aminokiselinskih ostataka i sadrži 7 cisteina, od kojih 6 učestvuju u formiranju 3 disulfidna

mosta i time stabilizuju njegovu strukturu (C22-C65, C56-C98, C156-C206), a sedmi se nalazi u aktivnom mestu.<sup>113,125</sup> Polipeptidni lanac je savijen u dva domena, prvi domen se sastoji od aminokiselinskih ostataka 19-115 i 214-218, a drugi od ostataka 1-18 i 116-213. Udubljenje između domena se nalazi na površini enzima koja je polarna, dok u unutrašnjosti preovlađuju nepolarne aminokiseline. Između domena pri uvijanju proteina ostaju zarobljeni molekuli vode, za koje se smatra da aktinidinu daju veću fleksibilnost i elastičnost.

U strukturi molekula su primetna tri regiona prvog domena u kojima preovlađuju sekundarne strukture u oblika  $\alpha$ -heliksa (25-42, 69-81, 120-129), dok je drugi domen molekula pretežno uvijen u oblik  $\beta$ -pločica. Prvi domen uglavnom sadrži aminokiselinske ostatke iz prve polovine aminokiselinskog lanca, dok, u skladu sa tim, drugi domen sadrži ostatke iz druge polovine sekvence. Ipak, interesantno je da i N-terminalni i C-terminalni krajevi prelaze na suprotne strane, tj. vezani su vodoničnim vezama za domene II i I, respektivno, i stoga deluju kao „kaiševi” i pomažu u uspostavljanju kompaktne strukture (slika 2.4).

Pozicija i orijentacija bočnih ostataka u aktivnom mestu aktinidina je skoro identična kao kod papaina, ali neki bočnih ostaci u obodu nepolarnog vezujućeg džepa su različiti.<sup>119</sup> Aminokiselinski ostaci Cys25 (I domen) i His162 (II domen) koji se nalaze sa dve strane interdomenske brazde sačinjavaju katalitički jonski par, a za aktivnost enzima su bitne i aminokiseline Gln19, Asn182 i Trp184.<sup>125</sup>

U aminokiselinskoj sekvenci aktinidina postoje tri potencijalna mesta glikozilacije, ali odsustvo gliko- komponente je potvrđeno lektin- vezujućim esejima i perjodatnim Šifovim bojenjem.<sup>17,112,114</sup>

Molekulska masa aktinidina koja se može naći u literaturi se razlikuje zavisno od metode koju su autori koristili za određivanje. *Carne i Moore* prijavljuju 23.5 kDa preračunatih iz rezultata aminokiselinskog sekvenciranja, *Boland i Hardman* su ultracentrifugiranjem dobili  $26 \pm 0.5$  kDa, dok su *Pastorello, Teo sollis i Lucas* redukujućom SDS-PAGE metodom dobili 30 kDa, 27 kDa i 25 kDa, respektivno.<sup>18,112,113,117,126</sup> pI vrednost aktinidina je 3.5, što ga svrstava u kisele proteine.<sup>112,114</sup>

*Yamaguchi* je 1982. pokazao da prilikom korišćenja kazeina kao supstrata aktinidin ima temperaturni optimum aktivnosti od 58-62°C i 98% termalne stabilnosti na 60°C tokom 10 minuta. Isti autori su pokazali da je aktinidin stabilan u rasponu pH između 7 i 10.<sup>127</sup> *McDowall* je koristeći benzoil-L-arginin etil- estar kao supstrat pokazao širok pH optimum aktinidina od 5 do 7, dok je *Arcus* koristeći želatin kao supstrat došao do pH optimuma između 4-5.<sup>115,116</sup> *Lewis* je pokazao da se aktivnost prema BAEE supstratu rapidno gubi pri pH vrednostima ispod 3 i iznad 10.3.<sup>128</sup>

Studije supstrate specifičnosti pokazuju da aktinidin preferira aromatične (generalno nepolarne) bočne ostatke na mestu koje je prvo pored peptidne veze koju će hidrolizovati, što je objašnjeno postojanjem mesta odgovarajuće veličine za vezivanje aromatičnog ostatka u brazdi između domena, nešto niže od aktivnog mesta.<sup>117-119</sup>

Identifikovano je 10 različitih iRNK koje kodiraju zrele oblike aktinidina sličnih masa (~24 kDa), ali sa pretpostavljenim pI vrednostima u opsegu od kiselog (pI 3.9) do baznog (9.3). U slučaju *A. deliciosa* var. Hayward (zeleni kivi) i *A. chinensis* var. Hort 16A i EM4 (zlatni kivi), iRNK aktinidina za bazne i kisele izoforme su eksprimirane u približno istim odnosima tokom sazrevanja ploda. Dvodimenzionalnom gel elektroforezom, u kombinaciji sa imunoblotom i masenom spektrometrijom, identifikovane su male količine nove bazne izoforme aktinidina u zrelih plodovima *A. deliciosa* i *A. chinensis*. Izuzetno visoke količine kisele izoforme aktinidina su pronađene u *A. deliciosa* i EM4 kultivaru zlatnog kivija, ali ova izoforma nije bila prisutna u Hort16A, najzastupljenijem komercijalnom kultivaru zlatnog kivija. Analizom na nativnoj gel elektroforezi potvrđeno je da su i bazna i kisela izoforma aktinidina aktivne cistein peptidaze.<sup>123</sup>

### 2.5.2. Industrijska primena aktinidina

Iako se kivi relativno skoro pojavio na tržištu, sve veća popularnost ovog ploda je povećala potrebu za proširenjem industrije procesovanja kivija, sa namerom da se iskoriste i oni plodovi koji su neprihvatljivi za upotrebu kao sveži.<sup>129</sup> Godišnje se odbacuje preko 300 000 tona svežih plodova kivija, pulpe i ljuske koji preostanu nakon procesovanja ovog voća.<sup>130</sup> Aktinidin kao agens za omekšavanje mesa se dobija direktnom ekstrakcijom iz



svežeg ploda, kao sporedni proizvod prilikom pripreme smrznute ili konzervirane pulpe ili ekstrakcijom iz soka kivija tokom ultrafiltracije.<sup>129</sup>

U poslednjih nekoliko godina se pominje i moguća primena enzimskog ekstrakta kivija u industriji mleka.<sup>131, 132</sup> Koagulacija mleka je jedan od prvih koraka u proizvodnji sira. Tokom ovog procesa molekuli kazeina formiraju gruševinu, trodimenzionalnu mrežu u kojoj ostaju zarobljeni deo tečnosti i mast iz mleka. Nezgrušani deo mleka se naziva surutka i sadrži laktozu, laktalbumine i minerale.<sup>133</sup> U ovom postupku se najčešće koristi himozin, enzim koji se izoluje iz želudca mladih preživara, svega nekoliko nedelja nakon njihovog rođenja.<sup>134</sup> Potreba za većim količinama sira na svetskom tržištu, zajedno sa sve manjom dostupnošću i sve većom cenom himozina životinjskog porekla, dovela je do intenzivne potrage za alternativnim koagulacionim enzimima.<sup>135, 136</sup> Upotreba životinjskog himozina sa sobom nosi i ograničenja religijske (Judaizam, Islam) i dijetetske (vegeterijanstvo) prirode, što je dovelo do povećanog interesovanja za enzimima biljnog porekla.<sup>137</sup> Enzimi koji koagulišu mleko su identifikovani u brojnim biljnim vrstama, međutim, većina njih se pokazala nepogodnim za upotrebu u industriji mleka jer dovode do nastanka izuzetno gorkih sireva. Ukus, kao i tekstura sira zavise od proteolitičke aktivnosti enzima koji se koristi za koagulaciju kazeina. Visokoa proteolitička aktivnost većine biljnih peptidaza dovodi do nastanka kratkih peptida, odgovornih za gorak ukus sira. Dodatan problem predstavlja i toksičnost mnogih biljnih ekstrakata za koje je pronađeno da dovode do koagulacije kazeina.<sup>138</sup>

U nedavnoj publikaciji, *Lo Pierro et al.* su proučavali mogućnost primene aktinidina kao biljnog koagulanta. Utvrdili su da dejstvom aktinidina na kravlje mleko nastaju gruševina i surutka sličnih proteinskih profila kao i prilikom upotrebe himozina.<sup>131</sup> *Saha et al.* su primetili da upotreba aktinidina, za razliku od drugih biljnih peptidaza (papaina ili ficina), ne dovodi do pojave gorkih peptida u proizvodu.<sup>132</sup>

## 2.6. Inhibitori cistein peptidaza

Cistein peptidaze učestvuju u raznim fiziološkim procesima i njihova povećana aktivnost može predstavljati ozbiljan problem za organizam. Priroda je razvila nekoliko strategija da zaštiti kako ćelije, tako i cele organizme od nepoželjne proteolize, kao i da

precizno kontroliše proteolitičke procese. Ovo se postiže kontrolom na mnogim nivoima, od regulacije ekspresije, sekrecije i sazrevanja peptidaze, do specifične degradacije aktivnih enzima ili blokiranja aktivnosti enzima inhibitorima.<sup>20</sup>

Mehanizmi inhibicije cistein peptidaza su predmet detaljnih istraživanja usled mogućnosti upotrebe selektivnih peptidaznih inhibitora u terapiji brojnih humanih oboljenja. S obzirom da su biljne cistein proteaze znatno dostupnije od humanih, mnoga istraživanja su fokusirana na prvobitnom rasvetljavanju mehanizama inhibicije i pronalaženju novih inhibitora upotrebom biljnih peptidaza, nakon čega se dobijeni rezultati proveravaju na humanim peptidazama.<sup>20-22</sup>

### 2.6.1. Endogeni inhibitori cistein peptidaza

Endogeni inhibitori papainske familije cistein peptidaza su proteinske prirode i većinom pripadaju cistatinskoj superfamiliji. Ova superfamilija proteina se na osnovu homologija u sekvenci može podeliti na 3 familije: stefine, cistatine i kininogene. Ono što je zajedničko svim ovim proteinima, osim specifičnosti za cistein peptidaze, je i otpornost na visoke temperature i stabilnost na ekstremnim pH vrednostima.<sup>139</sup>

Na primeru papaina i humanog stefina B rasvetljen je mehanizam inhibicije ovim proteinima. Cistatinski molekul ima oblik polumeseca i uklapa se u supstrat-vezujuću brazdu na papainu. Ivicu polumeseca sačinjavaju dve petlje sa visoko konzerviranim ostacima i N terminalni kraj. Ove dve petlje interaguju sa površinom enzima na S1 do S4 vezujućim mestima. Iako se polipeptidni niz vezuje poput supstrata, na P1 mestu je usmeren na suprotnu stranu, i time izbegava proteolitičko sečenje. Na ovaj način cistatinski molekul ostaje intaktan, ali sprečava vezivanje supstrata.<sup>20</sup>

Pored cistatina, u novije vreme su otkrivene još tri familije endogenih inhibitora cistein peptidaza: čagasini, tiropini i stafostatini. Iako imaju sasvim različitu sekvencu i način uvijanja od cistatina, mehanizam inhibicije kod tiropinina i čagasina je vrlo sličan mehanizmu cistatina. Ipak, Tiropini imaju drugačiju ukupnu strukturu od cistatina i to im omogućava da uspostave više kontakata sa površinom enzima, što ih za uzvrat čini specifičnijim inhibitorima od relativno neselektivnih cistatina.<sup>140</sup> Iz kristalografskih studija čagasina izolovanog iz *Trypanosoma cruzi*, parazita koji izaziva čagasovo oboljenje, i po

kojem je ova familija dobila ime, utvrđeno je da i čagasini imaju karakterističan oblik polumeseca sa tri konzervirane petlje i verovatno veoma sličan mehanizam inhibicije kao i tirocini.<sup>141</sup> Stafostatini imaju sasvim drugačiji mehanizam inhibicije od ostalih familija, a naziv su dobili po visokoj specifičnosti ka stafopainima, bakterijskim cistein peptidazama papainske familije.<sup>20</sup>

## 2.6.2. Sintetički inhibitori cistein peptidaza

Postoje brojna sintetička jedinjenja različitih organskih klasa koja su se pokazala kao jači ili slabiji inhibitori cistein peptidaza. Inicijalna klasifikacija ovih jedinjenja se zasniva na tome da li inhibitor interaguje sa aktivnim mestom ili napada neko drugo mesto na enzimu (alosterni efektori). Inhibitori koji napadaju aktivno mesto se dalje mogu odrediti prema tipu interakcije na kovalentne i nekovalentne, kao i na reverzibilne i ireverzibilne. Reverzibilni i ireverzibilni inhibitori se mogu razlikovati smanjenjem koncentracije inhibitora razblaživanjem ili dijalizom. U slučaju reverzibilnog inhibitora doći će do porasta enzimske aktivnosti nakon odstranjivanja inhibitora. U većini slučajeva, reverzibilni inhibitori se nekovalentno vezuju, dok se ireverzibilni inhibitori uvek kovalentno vezuju za enzim.<sup>22</sup>

Većina sintetisanih inhibitora prati uobičajenu strukturnu šemu za razvijanje peptidaznih inhibitora: postojanje peptidnog segmenta od dve ili više aminokiseline koji enzim prepoznaje, a koji odgovara segmentu sekvence dobrog supstrata. Peptidni segment se vezuje za grupu koja je podložna nukleofilnom napad ili supstituciji i koja će reagovati sa cisteinskom grupom u aktivnom mestu enzima.<sup>22</sup> U novije vreme, osim ovog pristupa, koristi se i brzo skeniranje biblioteka postojećih malih molekula, kao i kreiranje novih kombinatornih biblioteka malih molekula.<sup>142</sup>

Raznoliki inhibitori cistein peptidaza se mogu klasifikovati u dve grupe prema mehanizmu inhibicije:<sup>142</sup>

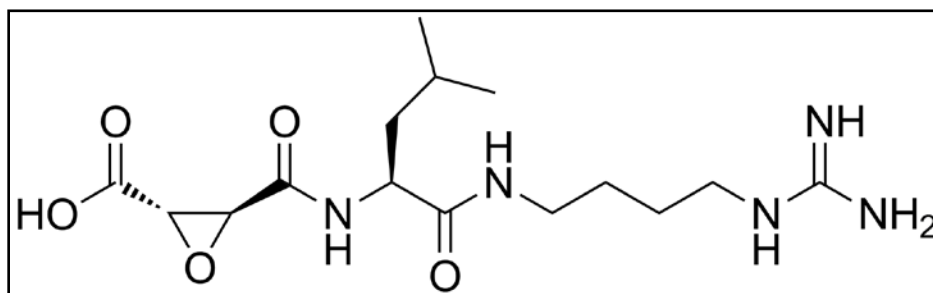
- 1) alkilujućim agensima (fluorometil ketoni, hlorometil ketoni, aciloksimetil ketoni, epoksidi, vinil sulfoni i drugi Majklovi akseptori)
- 2) acilujućim agensima (aza-peptidi, acil hidroksamati)

### 2.6.3. E-64

Prvi epoksisukcinilni peptid koji je otkriven je E-64, prvobitno izolovan iz *Aspergillus japonicus*, i predstavlja prirodni inhibitor cistein peptidaza. Hemijska struktura ovog jedinjenja, utvrđena optičkom rotacijom, NMR, IR, MS analizom, elementarnom analizom i aminokiselinskom analizom je *N*-(*N*-(*L*-3-*trans*-karboksioksiran karboksioksiran- 2-karbonil)-*L*-leucil)agmatin (Slika 2.5).

Nakon što su *Hanada* i saradnici 1978. pokazali da E-64 inaktivira biljne cistein peptidaze papain, ficin i bromelain, druge istraživačke grupe su otkrile inhibitorski potencijal ovog jedinjenja i na katepsinima B, H, F, K, L, O, V i X, kalpainu, kruzainu i aktinidinu.<sup>142-143</sup>

Za razliku od mnogih drugih mikrobnih inhibitora, E-64 je jak i specifičan inhibitor cistein peptidaza i koristi se kao dijagnostički reagens u identifikaciji ovih enzima. E-64 derivati su predloženi kao terapijski agensi i korišćeni su u mnogim biološkim studijama.

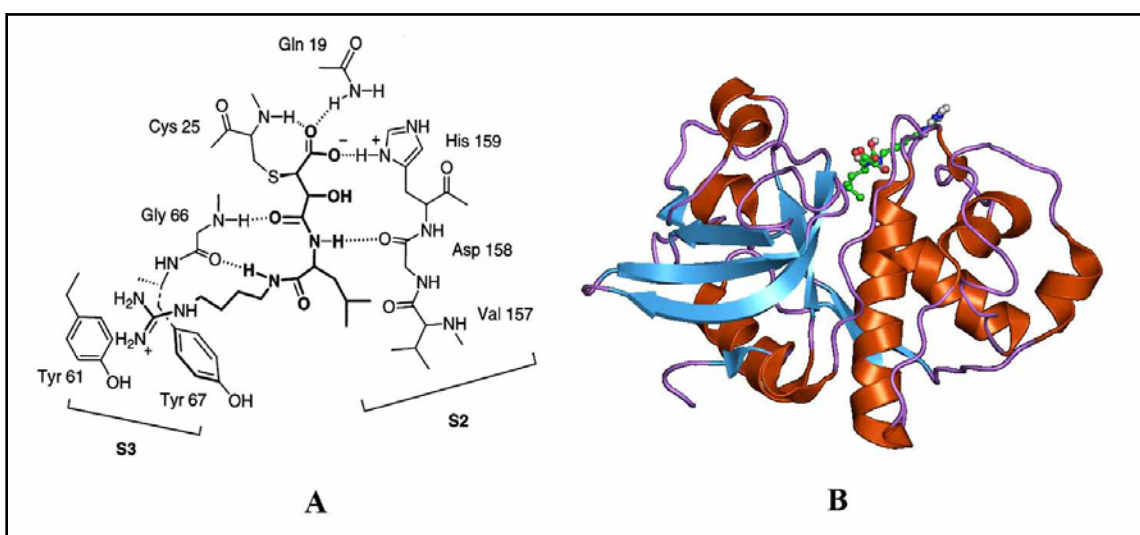


Slika 2.5. Struktura E-64 cistein peptidaznog inhibitora

U skorije vreme su se pojavili i derivati obeleženi biotinom, radioaktivnim jodom i fluorescentnim bojama, koji predstavljaju afinitetne obeleživače za cistein peptidaze.<sup>144-146</sup> E-64 ne inhibira serin, aspartat ili metalo peptidaze. E-64 ne inhibira i sve cistein proteaze, naime nema dejstvo prema proteazama koje ne pripadaju papainskom klanu (legumain, kaspaze).<sup>147</sup>

E-64 i njegovi analozi inhibiraju papainsku familiju cistein peptidaza putem S-alkilovanja cisteina u aktivnom mestu, što kao posledicu ima otvaranje epoksidnog prstena inhibitora. Tioestarska veza se stvara nukleofilnim napadom cisteina na C2 ugljenikov atom oksiranskog prstena inhibitora. Tom prilikom se menja stereochemija enzim-inhibitor adukta

na reakcionom mestu usled nukleofilnog napada tiolatne grupe u SN2 reakciji. E-64 koji je bio 2S, 3S- konfiguracije pre nukleofilnog napada postaje 2R, 3R nakon formiranja tioestarske veze između cisteinskog ostatka i C2 atoma oksiranskog prstena. Korak koji ograničava brzinu inhibicije je brzina kojom se E-64 usidrava u aktivno mesto enzima pre formiranja kovalentnog kompleksa.<sup>148-149</sup> Kod papaina i aktinidina karboksilna grupa na C2 poziciji E-64 orijentiše epoksid za alkilaciju od strane Cys25 putem vodoničnog vezivanja sa His159 i Gln19 (slika 2.6).<sup>150</sup>



Slika 2.6. Vezivanje E-64 za aktinidin, A) šematski prikaz reakcionog mesta<sup>142</sup> B) kristalna struktura prikazana kao računarski generisani trodimenzionalni model.<sup>122</sup>

### 3. Cilj istraživanja

Pošavši od postojećih literaturnih podataka da inhalatorne alergene peptidaze proteolitičkim dejstvom mogu dovesti do povećane propustljivosti plućnog epitela, postavljena je radna hipoteza da peptidaze hrane mogu na sličan način djelovati na intestinalni epitel, pod uslovom da im inherentne osobine omogućavaju preživljavanje uslova gastrointestinalnog trakta. Cilj istraživanja u okviru ove doktorske teze bio je ispitivanje strukturnih i imunoloških karakteristika aktinidina, u kontekstu rasvetljivanja puta oralne senzitivacije, poboljšanja dijagnostike alergije na kivi i optimizaciji uslova za upotrebu aktinidina u industriji hrane.

U ovoj doktorskoj tezi ispitivani su:

- sadržaj proteolitički aktivnog aktinidina u ekstraktu kivija,
- uticaj proteolitičke aktivnosti aktinidina na *in vivo* i *in vitro* vezivanje IgE,
- digestibilnost aktinidina u uslovima simuliranog želudačnog i crevnog soka,
- očuvanost proteolitičke aktivnosti aktinidina nakon digestije,
- imunogenost aktinidina nakon digestije,
- upotreba ekstrakta kivija kao biljnog koagulanta u postupku proizvodnje sira i
- termalna stabilnost aktinidina.

## 4. Rezultati

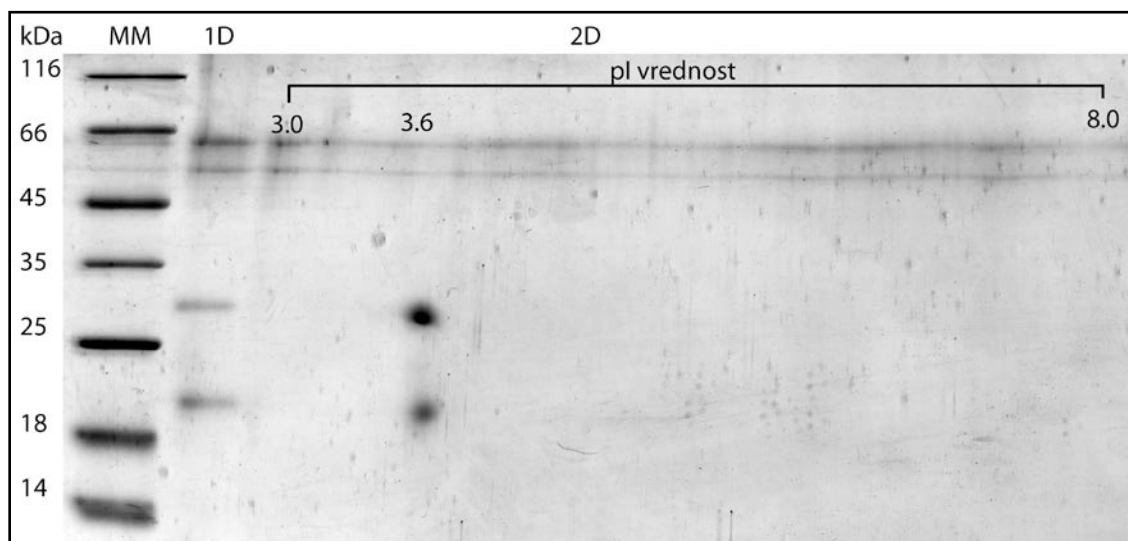
### 4.1. Ispitivanje homogenosti izolovanog preparata aktinidina

Aktinidin (Act d 1) je izolovan i prečišćen u nativnim uslovim iz svežih plodava zelenog kivija (*Actinidia deliciosa*, cv Hayward). Tokom samog postupka nisu dodavani peptidazni inhibitori, što je inače česta praksa prilikom pripreme proteinskog ekstrakta kivija za istraživački rad, kako bi se sprečila proteolitička degradacija alergena kivija.

Za prečišćavanje aktinidina je korišćena kombinacija anjonske i katjonske jonoizmenjivačke hromatografije na QAE-Sephadex A-50 i SP-Sephadex C-50 kolonama. Iz 200 g svežeg kivija je dobijeno oko 40 mg preparata aktinidina. Homogenost dobijenog preparata aktinidina je procenjena 1D i 2D-PAG elektroforezom u redukujućim uslovima, N-terminalnim sekvenciranjem i masenom analizom.

#### 4.1.1. SDS- PAGE i 2D- PAGE

Analizom SDS-PAGE rađene u redukujućim uslovima uočljiva je pojava dve proteinske trake u prečišćenom preparatu aktinidina, jedne koja ima elektroforetsku pokretljivost od približno 30 kDa, i druge sa pokretljivošću od približno 22 kDa (slika 4.1. 1D). Analizom istog uzorka na dvodimenzionalnoj PAGE potvrđena je pojava dve proteinske trake sa molekulskim masama koje odgovaraju vrednostima dobijenim u SDS-PAGE, i dodatno je uočeno da obe proteinske trake imaju skoro identičnu pI vrednost (~3.5) koja se nalazi u kiselom region i odgovara literaturnim podacima za aktinidin.<sup>112,114</sup>



Slika 4.1. Analiza preparata aktinidina: 1D i 2D PAGE, MM- molekularni markeri

#### 4.1.2. N-terminalno sekvenciranje

Dve proteinske trake prisutne u preparatu aktinidina su nakon SDS-PAGE elektrotransferom prebačene na PVDF membranu i podvrgnute N-terminalnom sekvenciranju u cilju utvrđivanja identiteta prisutnih proteinskih traka. Rezultati sekvenciranja su pokazali da obe trake sadrže protein sa N-terminalnom sekvencom LPSYVD, koja odgovara aminokiselinama 127-132 kompletne sekvence zrele forme molekula aktinidina (UniProtKB A5HII1).

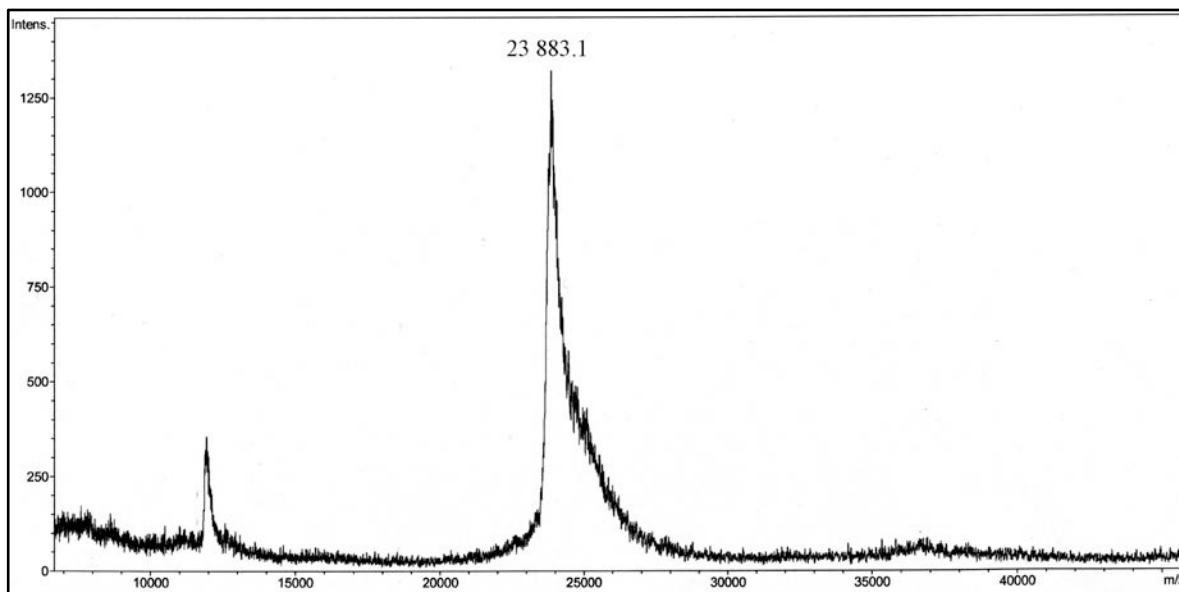
#### 4.1.3. Masena analiza preparata aktinidina

Proteinske trake od 30 kDa i 22 kDa dobijene analizom preparata aktinidina su isečene iz SDS- gela, obezbojene i digestovane tripsinom. Fragmenti dobijeni nakon tripsinske digestije su dalje analizirani. U oba uzorka su detektovani peptidi  $^1\text{LPSYVDWR}^8$  i  $^9\text{SAGAVVDIK}^{17}$ , koji predstavljaju prvih 17 aminokiselina zrelog aktinidina, kao i peptidi  $^{182}\text{NSWDTTWGEEGYMR}^{195}$  i  $^{241}\text{DGPVGVDDGQR}^{251}$  koji pripadaju C-terminalnom kraju primarne strukture aktinidina (UniProtKB A5HII1). Peptid  $^{59}\text{TQNTR}^{63}$  je detektovan u traci od 30 kDa, a peptid  $^{226}\text{PYSSLINPPAFSMSK}^{240}$  je detektovan u traci od 22 kDa. Masenom analizom je utvrđena i molekulska masa od 23883.01 Da za molekul zrelog



aktinidina (slika 4.2.)

*Ovim je potvrđeno da obe proteinske trake uočljive na SDS-PAGE redukujućem gelu pripadaju zrelom obliku molekula aktinidina i da imaju istu molekulsku masu.*



*Slika 4.2. Maseni spektar zrelog oblika kisele izoforme aktinidina*

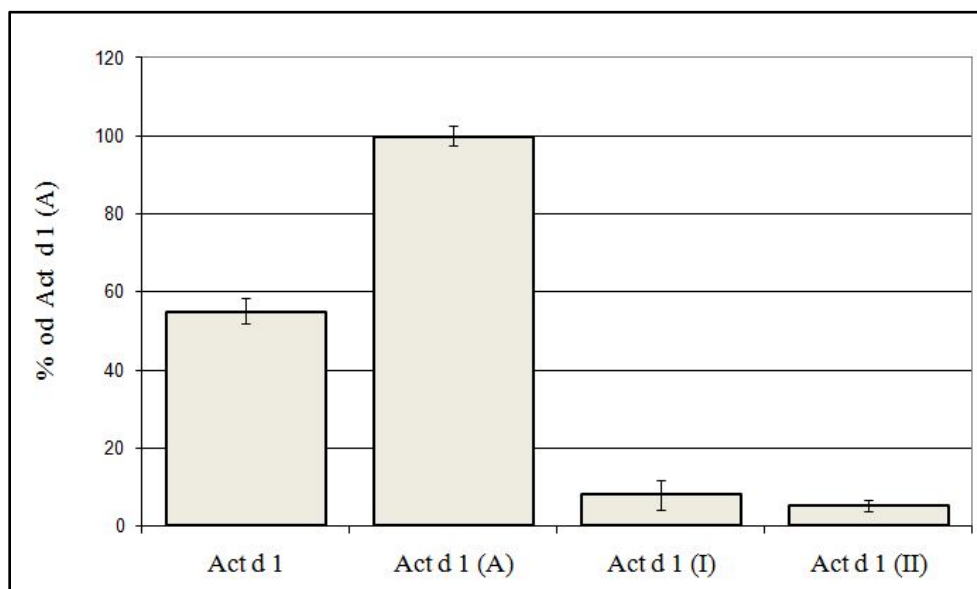
## **4.2. Proteolitička aktivnost komponenti prisutnih u preparatu aktinidina**

U cilju određivanja proteolitičke aktivnosti dve komponente aktinidina pristupljeno je ili aktivaciji ili inhibiciji aktinidinskog preparata, a zatim i analizi indukovanih promena u elektroforetskom profilu preparata. Proteolitička aktivnost komponenti je dodatno procenjena zimogramom sa želatinom

### **4.2.1. Aktivacija i inhibicija preparata aktinidina**

Preparat aktinidina je aktiviran inkubacijom u fosfatnom puferu, sa optimalnom pH vrednošću za aktivnost aktinidina od 6.5, i sa dodatim 26 mm L-cisteinom, za koji je poznato da optimizuje aktivnost cistein-peptidaza.<sup>151</sup>

Inhibicija preparata rađena je na dva načina: termalno (kuvanjem preparata 5 min na 95°C) ili inkubacijom sa koktelom peptidaznih inhibitora (Sigma-Aldrich) u odnosu 1:1 v/v. Uspešnost aktivacije ili inhibicije aktinidina je proverena kazeinolitičkim esejem, poređenjem sa enzimskom aktivnošću netretiranog preparata (slika 4.3).

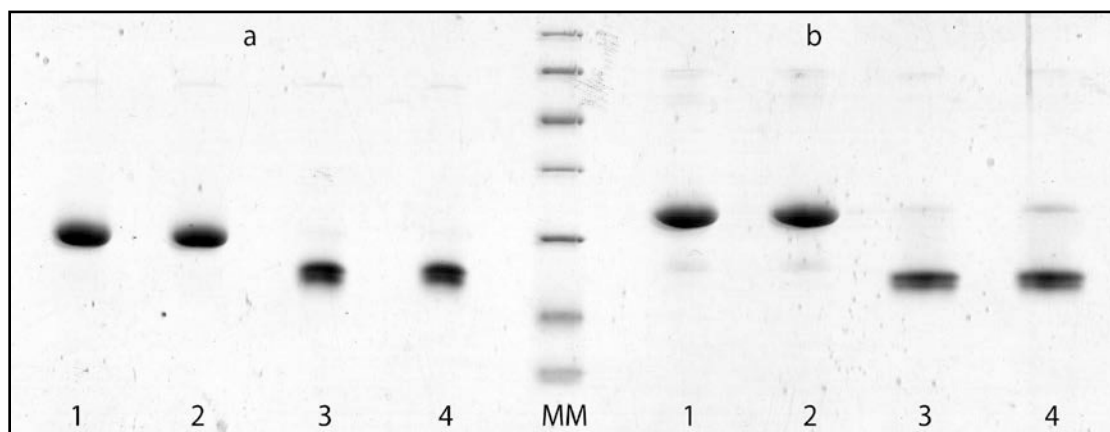


Slika 4.3. Histogram kazeinolitičke aktivnosti preparata aktinidina: Act d 1- netretirani aktinidin, Act d 1(A)- aktinidin aktiviran dodatkom L-Cys, Act d 1(I)- Aktinidin inhibiran dodatkom koktela peptidaznih inhibitora, Act d 1 (II)- termalno inhibiran aktinidin. Relativne enzimске aktivnosti su izražene kao procenat u odnosu na aktiviranog preparata (100%).

Netretiran uzorak aktinidina je pokazao 55% kazeinolitičke aktivnosti u poređenju sa aktiviranim preparatom. Nakon tretmana koktelom inhibitora, aktivnost se spustila na 7.9%, dok je nakon termalnog tretmana uzorak pokazivao svega 5.2% aktivnosti u odnosu na aktivirani enzim.

#### 4.2.2. SDS-PAGE i želatinski zimogram aktiviranog i inhibiranog preparata aktinidina

Pripremljeni preparati aktinidina su analizirani SDS-PAG elektroforezom u redukujućim i neredukujućim uslovima.

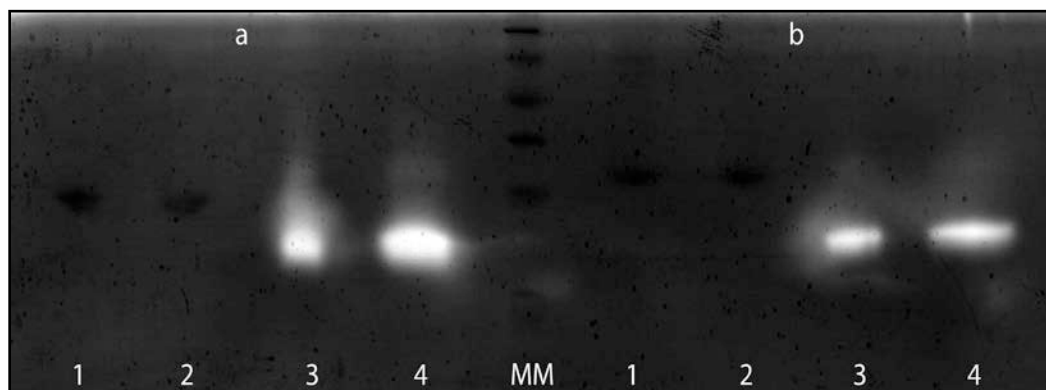


*Slika 4.4. SDS-PAGE analiza preparata aktinidina nakon aktivacije ili inhibicije u a) neredukujućim i b) redukujućim uslovima. 1- Act d 1 inhibiran termalnim tretmanom, 2- Act d 1 inhibiran koktelom peptidaznih inhibitora, 3- netretirani Act d 1, 4- Act d 1 aktiviran sa L-cisteinom, MM- molekularni markeri (od vrha ka dnu: 116 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 18 kDa, and 14 kDa).*

Inhibirani preparati Act d 1 (termalno inhibiran i inhibiran koktelom peptidaznih inhibitora) su pokazali jednu intenzivnu traku na otprilike 30 kDa, dok su netretirani i L-cisteinom aktivirani aktinidin migrirali kao dve trake koje se razlikuju po brzini migracije na gelu i intenzitetu (slika 4.4). Viša i slabija traka od 30 kDa odgovara traci inhibiranog preparata, dok niža traka od 22 kDa verovatno odgovara aktivnom enzimu. U neredukujućim uslovima oba uzorka inhibiranog Act d 1 imaju jednu traku na nešto nižoj poziciji u odnosu na redukovane uzorke. Ovo je posledica neraskinutih disulfidnih mostova koji utiču na veću kompaktnost molekula. Da bismo potvrdili pretpostavku da donja traka pripada aktivnom enzimu, urađen je zimogram sa istim uzorcima koji su analizirani i na

SDS-PAGE (Slika 4.5).

U zimogramu sa želatinom su jasno uočljiva prosvetljenja u gelu nastala želatinolitičkom aktivnošću proteina koji migrira u SDS- gelu kao niža traka od 22 kDa, dok se istovremeno vidi i odsustvo aktivnosti proteina koji migrira kao viša traka od približno 30 kDa.



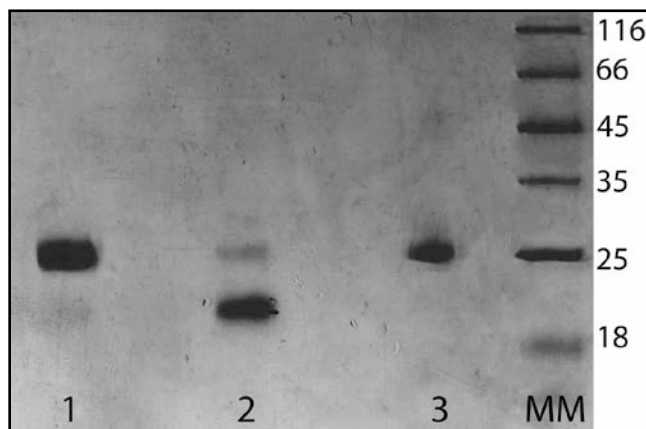
Slika 4.5. Detekcija proteolitičke aktivnosti aktiviranog i inhibiranih preparata aktinidina zimogramom u a) neredukujućim i b) redukujućim uslovima. 1- Act d 1 inhibiran termalnim tretmanom, 2- Act d 1 inhibiran koktelom peptidaznih inhibitora, 3- netretirani Act d 1, 4- Act d 1 aktiviran sa L-cisteinom, MM- molekularni markeri ( 116 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 18 kDa, and 14 kDa).

Netretirani aktinidin je pokazao proteolitičku aktivnost i u redukujućim i u neredukujućim uslovima. Ipak, uočljivo je u SDS-PAGE, a i po intenzitetu prosvetljenja u zimogramu u poređenju sa onim kod aktiviranog aktinidina, da netretirani preparat aktinidina prirodno sadrži i jedan deo inhibiranog enzima.

U cilju provere da li protein od 22 kDa potiče od proteolitičke aktivnosti aktinidina od 25 kDa osmišljen je sledeći eksperiment: Nakon završetka SDS-PAGE i bojenja gela niža proteinska traka od 22 kDa koja pripada aktivnom enzimu je isečena iz gela i inkubirana sa koktelom inhibitora (1h na 37°C), i uzorak je zatim ponovo razdvojen na SDS-PAGE.

U slučaju da je došlo do proteolitičke obrade, očekivano je da aktivni protein i nakon inhibicije zadrži nižu molekularnu masu. Ipak, rezultati ovog eksperimenta su pokazali da

uzorak nakon ovog tretmana ima elektroforetsku pokretljivost proteina od 25 kDa u neredukujućim uslovima (slika 4.6). Stoga, nije moglo doći do proteolitičke obrade aktinidina prilikom njegove aktivacije.



*Slika 4.6. SDS-PAGE u neredukujućim uslovima: 1- Act d 1 inaktiviran koktelom inhibitora, 2- Act d 1 aktiviran L-cisteinom, 3- aktivirani Act d 1 koji je isečen iz gela nakon prethodne SDS- elektroforeze, inhibiran i zatim ponovo razdvojen na SDS-PAGE*

### **4.3. Strukturna analiza aktivnog i inhibiranog aktinidina**

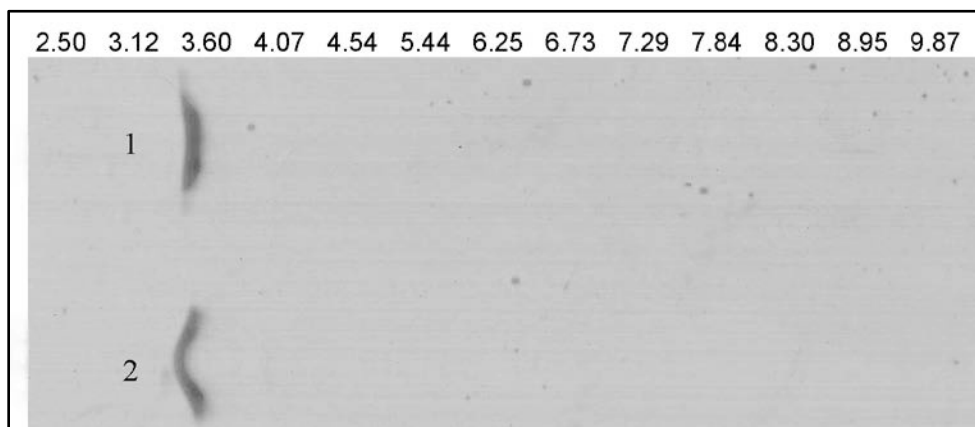
Nakon što je potvrđeno da preparat aktinidina izolovan pod nativnim uslovima u sebi sadrži aktivan i neaktivan enzim koji imaju različitu elektroforetsku pokretljivost, pristupljeno je strukturnoj karakterizaciji ova dva oblika aktinidina. S obzirom da je poznato da proteini sa visokom negativnom šaržom mogu pokazati elektroforetsku pokretljivost koja se razlikuje od njihove molekulske mase i do 30 kDa usled anomalija u vezivanju SDS-a<sup>152</sup>, ispitana je pI vrednost aktivnog i inhibiranog aktinidina. Sekundarne i tercijarne strukture aktivnog i inhibiranog aktinidina ispitane su pomoću CD spektroskopije i fluorimetrije.

U eksperimentima strukturne karakterizacije, za inaktivaciju aktinidina je korišćen jak, ireverzibilan i specifičan inhibitor cistein peptidaza, E-64. Ovim je izbegnut multikomponentni sistem koji bi se uveo dodatkom koktela peptidaznih inhibitora, kao i

promene u strukturi aktinidina koje bi mogle nastati kao posledica termalnog tretmana.

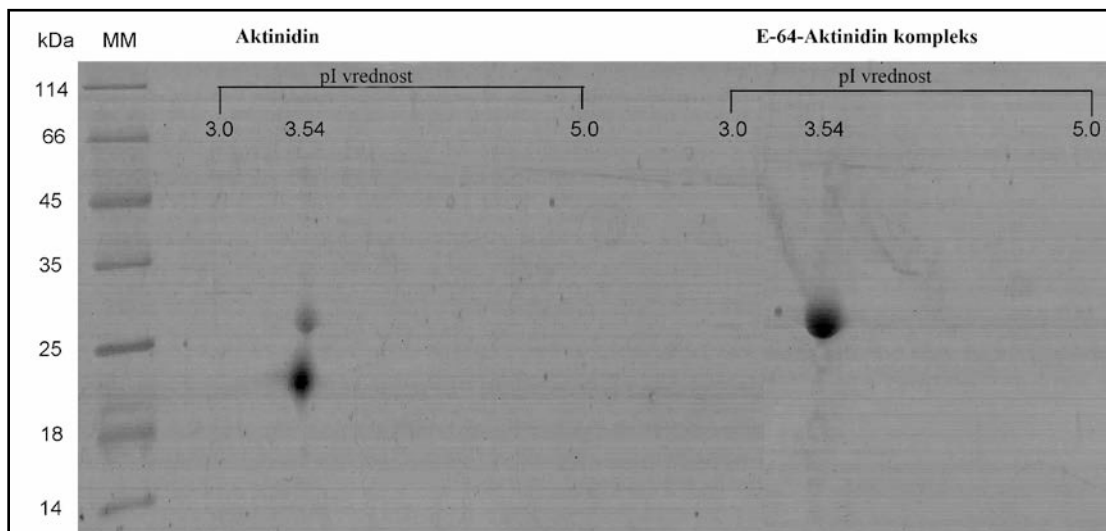
#### 4.3.1. IEF i 2D- PAGE aktivnog i aktinidin-E-64 kompleksa

U cilju provere da li dolazi do promene ukupnog naelektrisanja molekula aktinidina prilikom inaktivacije, uzorci netretiranog i aktinidin-E-64 kompleksa su prvo razdvojeni izoelektrofokusanjem, nakon čega im je procenjena pI vrednost poređenjem sa vrednostima pI markera, kao i merenjem pH vrednosti u delovima IEF gela. Za 2D-PAGE u prvoj dimenziji je uzorak razdvojen IEF, a zatim su individualne trake isečene, ekvilibrisane u redukujućim uslovima i razdvojene u drugoj dimenziji na istom SDS-PAGE gelu. Izoelektrofokusanje je pokazalo da aktivni i aktinidin-E-64 kompleks imaju istu pI vrednost od 3.5 (slika 4.7).



*Slika 4.7. Izoelektrofokusanje aktiviranog i aktinidin E-64 kompleksa. 1- aktivirani Act d 1, 2- Act d 1- E-64 kompleks. Vrednosti ispisane na gornjem rubu slike predstavljaju pH vrednosti izmerene u delovima gela.*

Rezultati dobijeni u ovim eksperimentima nedvosmisleno pokazuju da ne dolazi do promene naelektrisanja na molekulu prilikom vezivanja E-64 inhibitora i da ovo nije razlog postojanja razlike u elektroforetskoj pokretljivosti između ova dva oblika (slika 4.8). U 2D-PAGE je još jednom jasno vidljivo da u uzorku aktivnog aktinidina postoji i određeni deo inhibiranog enzima.



*Slika 4.8. 2D-PAGE aktivnog aktinidina i aktinidin E-64 kompleksa*

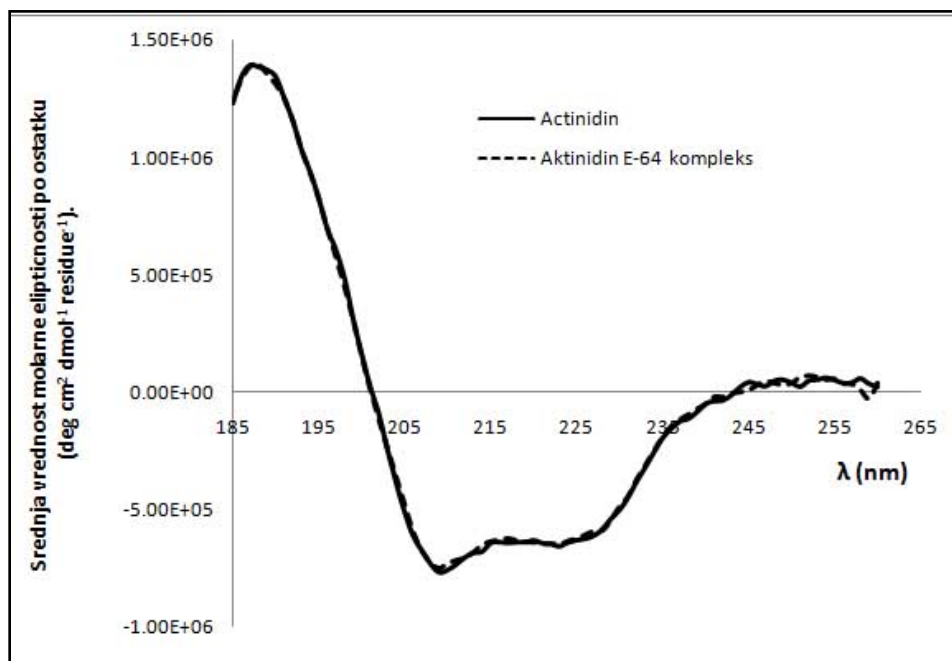
#### 4.3.2. CD spektrometrija

U cilju poređenja konformacije aktivnog i E-64 inhibiranog aktinidina, snimljeni su CD spektri ova dva oblika u dalekoj i bliskoj ultraljubičastoj oblasti. Metoda se zasniva na propuštanju cirkularno polarizovane svetlosti kroz optički aktivan rastvor, koji apsorbuje različite količine desno ili levo polarizovane komponente svetlosti. Cirkularni dihiroizam predstavlja razliku u apsorpciji ove dve komponente. Količina apsorbovanog svetla je funkcija talasne dužine i CD signal se pojavljuje samo na talasnim dužinama koje optički aktivna supstanca može da apsorbuje. Karakterističan CD spektar pokazuje sekundarne strukture polipeptidnog niza i aromatične aminokiselinske ostatke proteina, stoga je CD spektrometrija vrlo pouzdana metoda za praćenje promena u konformaciji proteina.

CD spektri u dalekoj UV oblasti za aktinidin i aktinidin inhibiran sa E-64 se u potpunosti preklapaju i oba pokazuju negativne maksimume na talasnim dužinama karakterističnim za aktinidin (slika 4.9).<sup>126</sup>

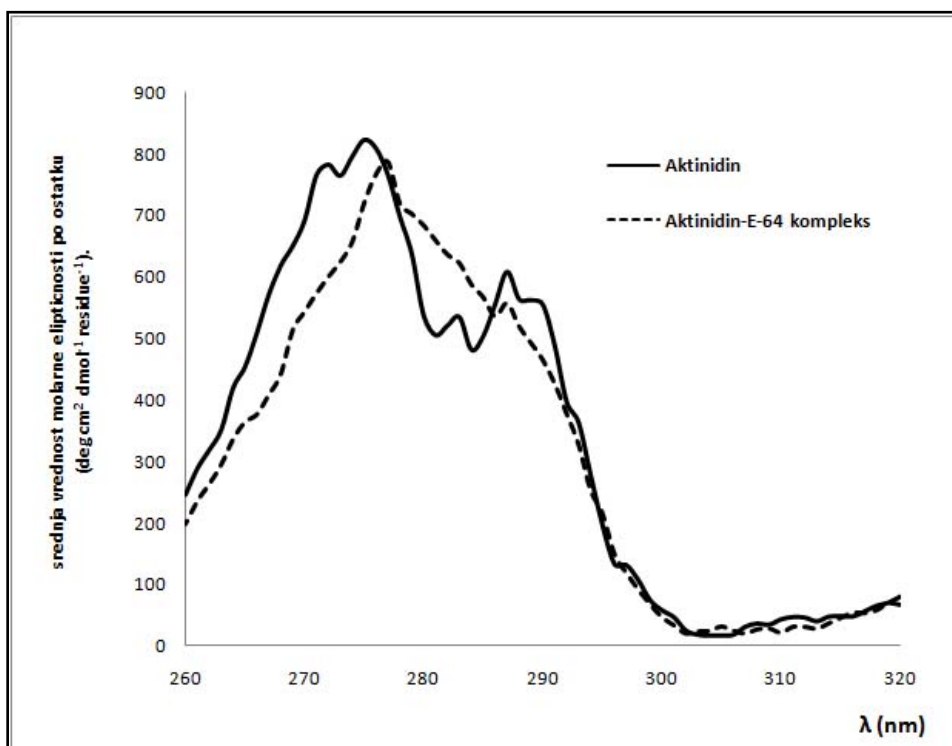
S obzirom da CD signal u spektralnoj oblasti od 185-260 nm uglavnom potiče od sekundarnih struktura proteina, očigledno je da vezivanjem inhibitora ne dolazi do promena na ovom nivou proteinske strukture aktinidina. Nakon toga, snimljeni su CD spektri u

bliskoj UV oblasti. U poređenju sa aktivnim enzimom, spektar aktinidina u kompleksu sa E-64 pokazao je gubitak izraženosti triptofanskog pika na 287 nm, kao i blago pomeranje tirozinskog pika sa 275 nm na 277 nm (slika 4.10). Ove razlike u spektrima nastaju kao posledica promene u okruženju aromatičnih aminokiselina proteina prilikom inhibicije, tj. promena u terciarnoj konformaciji proteina.



Slika 4.9. CD spektar aktivnog aktinidina i aktinidin-E-64 kompleksa u dalekom UV regionu

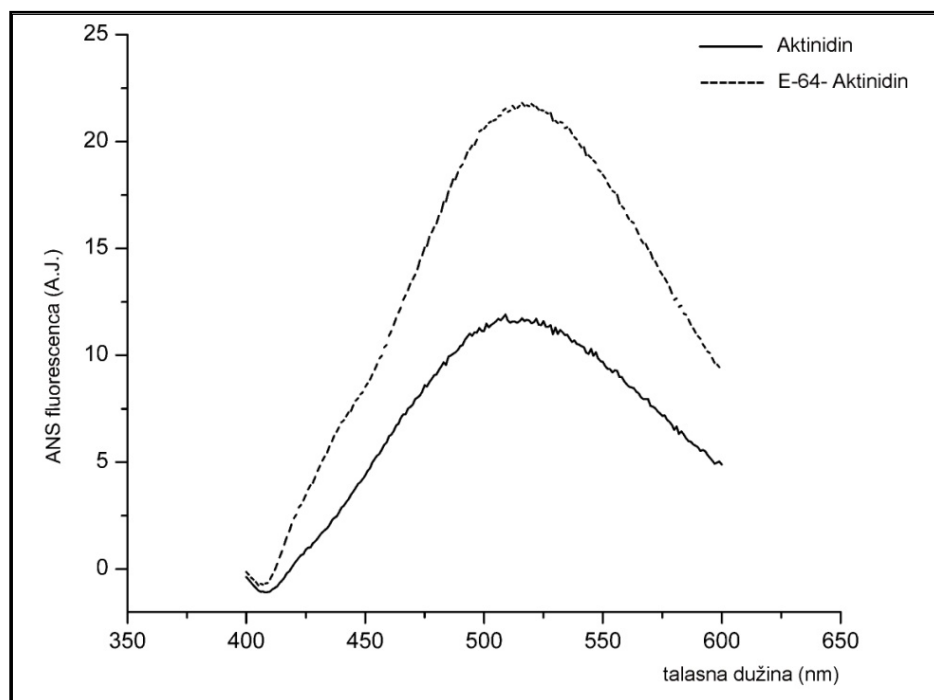




Slika 4.10. CD spekter aktivnog aktinidina i aktinidin-E-64 kompleksa u bliskom UV regionu

#### 4.3.3. Fluorimetrija

Razlika u konformaciji između aktivnog i inhibiranog aktinidina ispitana je i merenjem fluorescentnog spektra vezanog ANS-a (8-anilino-1-naftalensulfonska kiselina). Prilikom vezivanja ANS-a za hidrofobne regione proteina dolazi do povećanja intenziteta fluorescence ove supstance. S obzirom da je dobijeni signal znatno veći u slučaju kada se ANS doda u rastvor aktinidina inhibiranog sa E64, najverovatnije dolazi do smanjenja kompaktnosti molekula aktinidina prilikom vezivanja inhibitora, što ANS-u omogućava pristupu dodatnim hidrofobnim regionima u odnosu na neinhibirani molekul (slika 4.11).



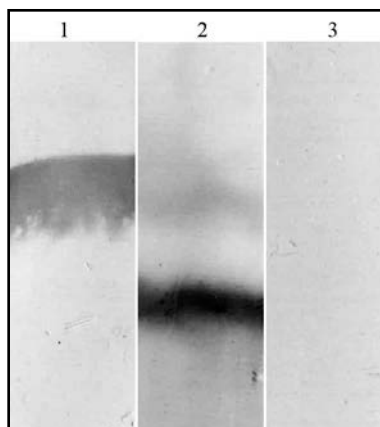
Slika 4.11 Fluorescentni spektar ANS-a vezanog za aktinidin i E64- aktinidin kompleks. Intenzitet fluorescence je prikazan u arbitrarnim jedinicama (A.J.)

#### 4.4. Imunološka karakterizacija aktivnog i inhibiranog aktinidina

Aktinidin se smatra dijagnostičkim biomarkerom alergije na kivi, usled odsustva ukrštene reaktivnosti sa alergenima trava, polena ili lateksa.<sup>5</sup> Prethodni eksperimenti su pokazali konformacione razlike između aktivnog i neaktivnog aktinidina, kao i njihovu različitu zastupljenost u proteinskim ekstraktima kivija koji se koriste u dijagnostičke svrhe pri utvrđivanju alergije na kivi. Stoga, u narednim eksperimentima ispitana su imunološka svojstva aktivnog i inhibiranog aktinidina. U eksperimentima vezivanja IgG je korišćen termalno inhibiran aktinidin umesto aktinidina inhibiranog koktelom peptidaznih inhibitora ili E-64 iz etičkih razloga, jer je deo ovih eksperimenata uključivao i kožne probe na pacijentima.

#### 4.4.1. *In vitro* vezivanje IgG

Vezivanje IgG od strane aktivnog i termalno inhibiranog aktinidina je ispitano u imunoblotu upotrebom zečijeg poliklonskog antiseruma na aktinidin.



*Slika 4.12. Imunoblot razvijen sa anti-act d 1 poliklonskim zečijim serumom. 1- termalno inhibirani aktinidin, 2- aktivan aktinidin, 3- kontrola sekundarnih antitela*

I aktivni i termalno inhibirani aktinidin su vezivali anti-Act d 1 zečija antitela (slika 4.12). Termalno inaktivirani Act d 1 je detektovan kao jedna intenzivna traka od 30 kDa, dok je aktivan Act d 1 detektovan kao dve trake, jedna intenzivna na 22 kDa, i jedna traka slabijeg intenziteta na oko 30 kDa, koja potiče od inhibiranog enzima.

#### 4.4.2. *In vivo* vezivanje IgE

Osam pacijenata sa potvrđenom kliničkom istorijom alergije na kivi i pozitivnim reakcijama u kožnim probama na ekstrakt kivija su podvrgnuti kožnim probama sa serijskim razblaženjima (500, 50 i 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) aktivnog i termalno inhibiranog aktinidina. Njihove kliničke karakteristike su dati u tabeli 4.1.

Od osam pacijenata, pet je imalo pozitivnu reakciju i na aktivan i na neaktivan aktinidin, dok su tri pacijenta pozitivno reagovala samo na aktivan ili samo na termalno inhibirani aktinidin (tabela 4.2). Pozitivnom reakcijom smatrala se pojava otoka na mestu nanošenja alergena čiji je prečnik najmanje 3 mm veći od prečnika negativne kontrole.

Tabela 4.1. Klinički podaci pacijenata koji su učestvovali u studiji sa kožnim probama

Inicijali	Godine/Pol	Simptomi	Druge alergije na hranu	Specifični IgE (KU/L)
<b>JU</b>	41/M	OAS	tropsko voće, celer	<0.35
<b>AT</b>	39/F	OAS	nema	4.31
<b>IM</b>	21/M	OAS, SG	riba	0.67
<b>AM</b>	2/F	OAS	svinjetina, mleko, kikiriki, soja	10
<b>MD</b>	74/F	OAS, SG	nema	<0.35
<b>FP</b>	10/M	AE	banana, paradajz	1.14
<b>JT</b>	27/F	OAS	nema	<0.35
<b>LK</b>	40/F	AE	nema	<0.35

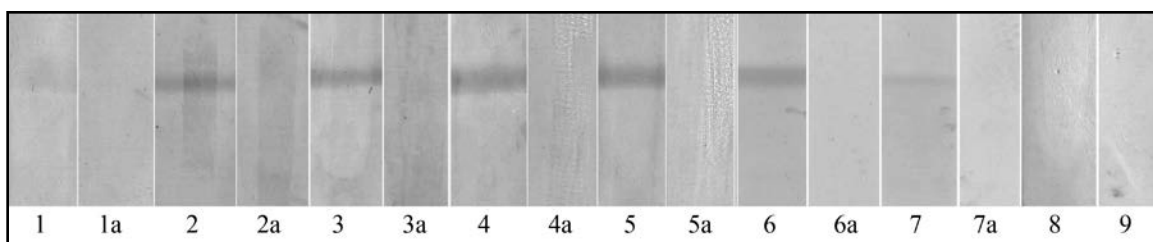
\* OAS- oralni alergijski sindrom, SG- stegnuto grlo, AE- angioedem

Tabela 4.2. Rezultati kožnih proba sa ekstraktom kivija i serijskim razblaženjima termalno inaktiviranog i aktivnog aktinidina. Kao pozitivna kontrola (His) korišćen je histamin fosfat.

Rezultati kožnih proba (prečnik otoka u mm)								
Inicijali	Ekstrakt	Inaktivirani Act d 1			Aktivni Act d 1			His
		500 µg mL <sup>-1</sup>	50 µg mL <sup>-1</sup>	5 µg mL <sup>-1</sup>	500 µg mL <sup>-1</sup>	50 µg mL <sup>-1</sup>	5 µg mL <sup>-1</sup>	
<b>JU</b>	5	3	0	0	3	3	0	5
<b>AT</b>	14		NT			NT		5
<b>IM</b>	8	10	3	0	12	5	3	4
<b>AM</b>	10		NT			NT		3
<b>MD</b>	6	5	0	0	7	3	0	3
<b>FP</b>	3	3	0	0	0	0	0	3
<b>JT</b>	3	0	0	0	3	0	0	3
<b>LK</b>	3	3	0	0	0	0	0	4

#### 4.4.3. *In vitro* vezivanje IgE

*In vitro* vezivanje IgE aktivnog i termalno inhibiranog aktinidina je testirano u imunoblotu sa pojedinačnim serumima sedam pacijenata.



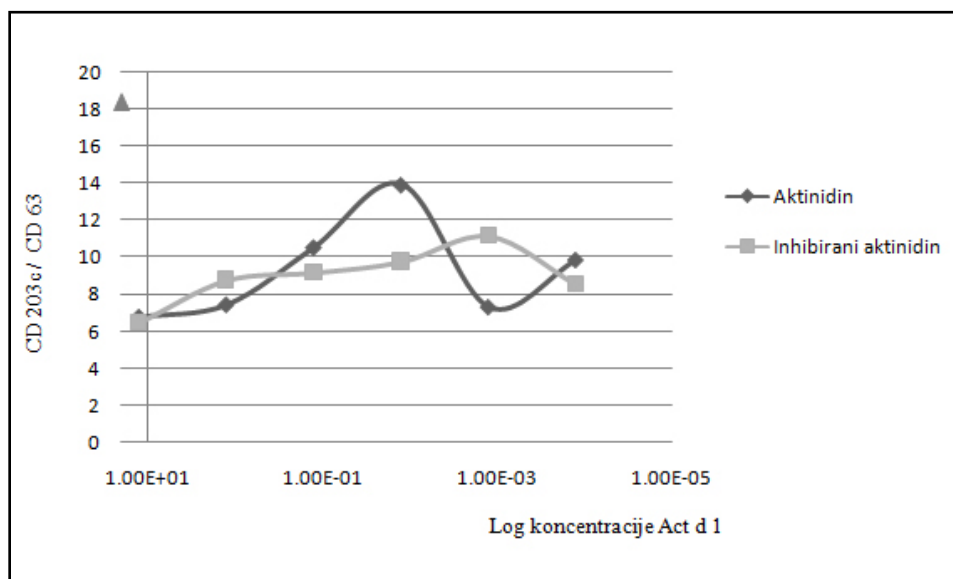
Slika 4.13. Detekcija IgE reaktivnosti seruma pojedinačnih pacijenata u imunoblotu: termalno inaktiviran Act d 1 (1-7), aktivan aktinidin (1a-7a), 8- kontrolni serum, 9- pufer

IgE reaktivnost je detektovana za termalno inaktivirani aktinidin kod svih pacijenata, dok IgE vezivanje aktivnog aktinidina nije detektovano ni kod jednog pacijenta (slika 4.13). Kao negativna kontrola je korišćen serum neatopične osobe.

#### 4.4.4. Test aktivacije bazofila

Test aktivacije bazofila rađen je na pacijentu sa prethodno utvrđenom kliničkom istorijom alergijske reakcije na kivi. Čelije krvi pacijenta stimulisane su sa serijskim razblaženjem aktivnog i termalno inhibiranog aktinidina ( $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $1.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $0.125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $0.0125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $0.00125 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $0.000125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) i praćena je aktivacija bazofila merenjem ekspresije CD63 i CD203c molekula na površini ćelija.

Aktivni i termalno inhibirani aktinidin pokazuju različite profile titracione krive. Maksimum aktivacije bazofila kod aktivnog proteina se dobija pri koncentraciji od  $0.0125 \mu\text{g mL}^{-1}$  (13.94%), dok se kod termalno inhibiranog aktinidina maksimalna vrednost postiže pri 10 puta manjoj koncentraciji od  $0.00125 \mu\text{g mL}^{-1}$  i iznosi 11,16 %. (slika 4.14).



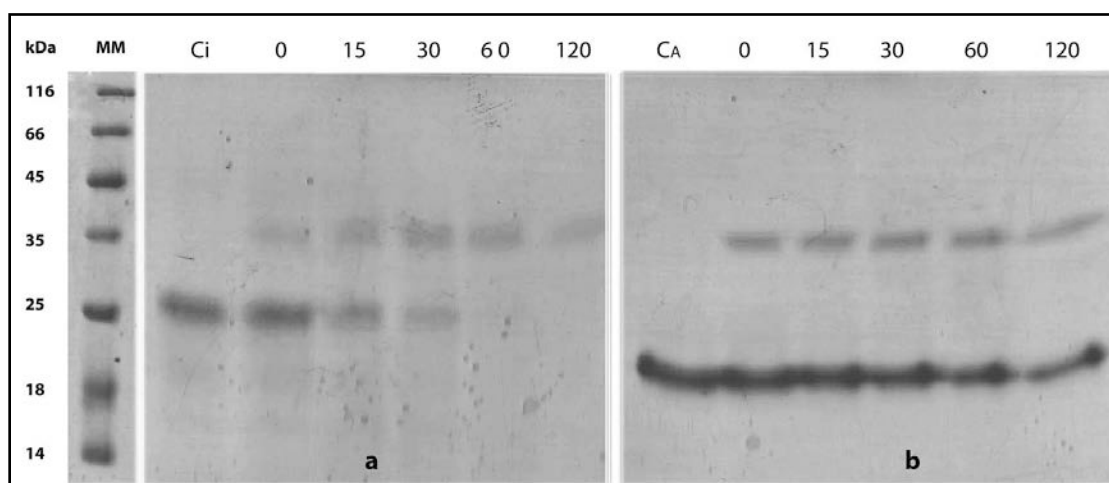
Slika 4.14. Zavisnost aktivacije bazofila od koncentracije aktivnog i termalno inhibiranog aktinidina. Negativna kontrola je imala vrednost 7.55, dok je pozitivna iznosila 18.41. Koncentracije aktinidina:  $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $1.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $0.125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $0.0125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $0.00125 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $0.000125 \mu\text{g mL}^{-1}$

#### 4.5. Ispitivanje stabilnosti aktinidina i inhibiranog aktinidina u uslovima GI trakta

Jedna od važnih osobina alergena hrane je sposobnost senzitivacije oralnim putem, u čemu presudnu ulogu igra stabilnost proteina u uslovima gastrointestinalnog trakta. U svrhu ispitivanja stabilnosti proteolitički aktivnog i E-64 inhibiranog aktinidina u uslovima gastrointestinalnog trakta, rađeni su *in vitro* testovi stabilnosti u simuliranim uslovima gastričnog fluida (SGF) i simuliranim uslovima intestinalnog fluida (SIF). Otpornost proteina na uslove GIT-a je praćena SDS elektroforezom i zimogramom sa želatinom, kao i masenom spektrometrijom.

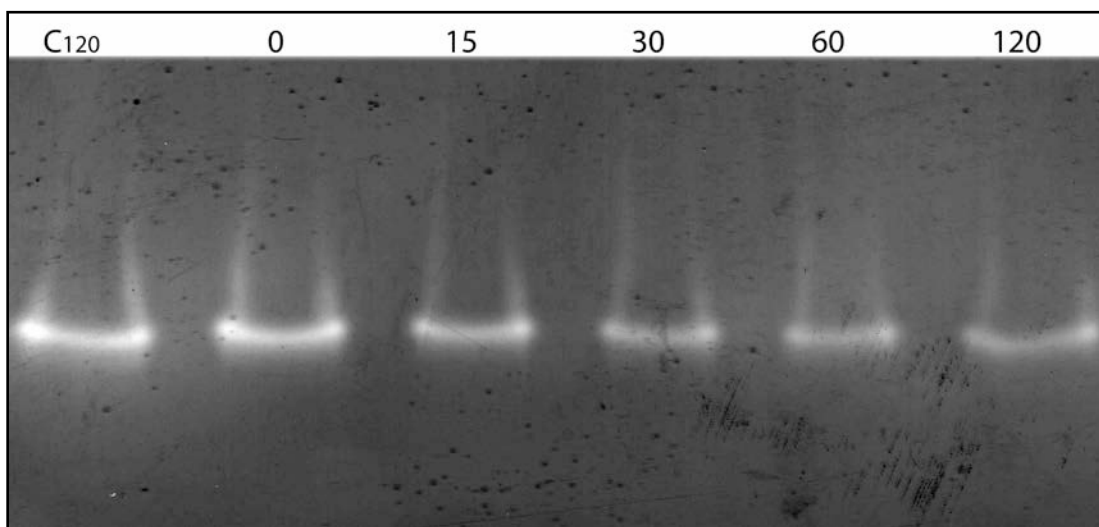
#### 4.5.1. Pepsinska digestija

Prilikom simulacije uslova kroz koji proteini prolaze u želudačnom soku aktivni aktinidin i aktinidin u kompleksu sa E-64 inhibitorom su inkubirani sa pepsinom na pH 2, optimalnoj vrednosti za dejstvo ove želudačne peptidaze. SDS-PAGE analiza uzoraka nakon tretmana je pokazala da je inhibirani aktinidin u potpunosti degradiran nakon 60 minuta inkubiranja, a značajno slabiji intenzitet trake u odnosu na kontrolni uzorak je uočljiv već nakon 15 minuta inkubiranja (slika 4.15 a). Nasuprot tome, aktivni aktinidin pokazuje otpornost na dejstvo pepsina i nakon 120 min inkubacije u u uslovima simuliranog želudačnog soka (slika 4.15 b).



Slika 4.15. Pepsinska digestija E-64 inhibiranog aktinidina (a) i proteolitički aktivnog aktinidina (b). Ci, C<sub>A</sub>- kontrolni uzorci nakon 120 min (u reakcionu smesu nije dodavan pepsin), Uzorci aktinidina nakon 0 min, 15 min, 30 min, 60 min i 120 min.

Zimogramom sa želatinom je ispitana proteolitička aktivnost uzoraka aktivnog aktinidina nakon pepsinske digestije. Intenzitet prosvetljenja nastalih peptidaznom aktivnošću aktinidina opada sa vremenom inkubacije, ali se peptidazna aktivnost aktinidina detektuje u svim vremenskim tačkama, uključujući i nakon 120 minuta u uslovima simulirane želudačne digestije (slika 4.16).



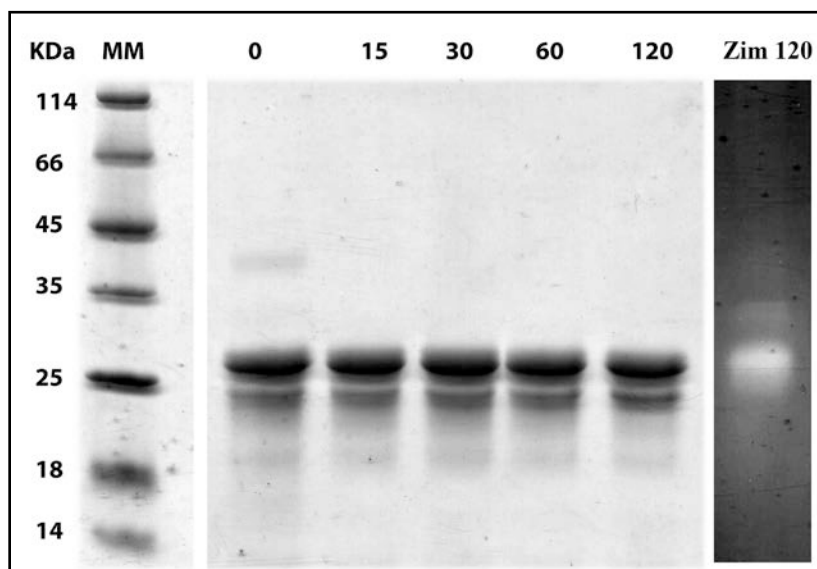
*Slika 4.16. Zimogram uzoraka aktivnog Act d 1 nakon pepsinske digestije. C<sub>120</sub> – kontrolni uzorak nakon 120 min (u reakcionu smesu nije dodavan pepsin), slede uzorci aktivnog Act d 1 nakon 0, 15, 30, 60 i 120 min pepsinske digestije.*

#### 4.5.2. Tripsinska digestija

Nakon što je ustanovljeno da aktivni aktinidin preživljava uslove simuliranog želudačnog soka, uzorak aktivnog aktinidina je nakon 120 min inkubiranja sa pepsinom dodatno inkubiran 120 minuta u uslovima simuliranog crevnog soka (tripsinska digestija).

U SDS- PAGE je proteinska traka koja pripada aktinidinu detektovana i nakon 120 min tripsinske digestije (slika 4.17). Zimogram uzorka nakon 120 min tretmana je pokazao da nakon 120 minuta pepsinske digestije, praćene sa 120 minuta tripsinske digestije, aktivni aktinidin još uvek zadržava svoju proteolitičku aktivnost (slika 4.17).



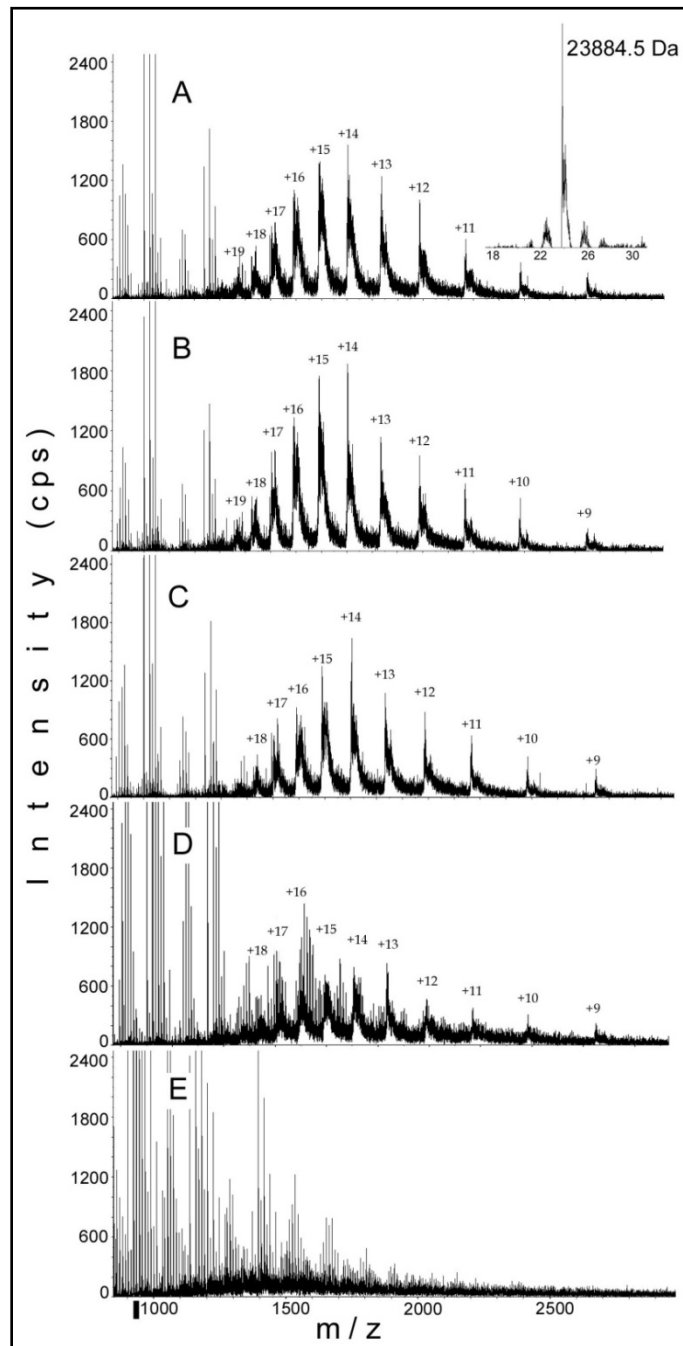


Slika 4.17. Tripsinska digestija aktivnog aktinidina. 0- Act d 1 nakon 0 min tripsinske digestije, zatim slede uzorci Act d 1 nakon 15, 30, 60, i 120 min tripsinske digestije.

Zim 120- zimogram sa želatinom uzorka Act d 1 nakon 2h pepsinske i 2h tripsinske digestije

#### 4.5.3. Masena spektrometrija uzoraka Act d 1 nakon digestije

Rezultati stabilnosti aktinidina na pepsinsku i tripsinsku digestiju dobijeni SDS-PAGE elektroforezom su dodatno potvrđeni ESI-TOF analizom. Masena spektrometrija uzoraka aktivnog aktinidina pokazuje postojanje intaktne primarne strukture i nakon 120 min digestije u uslovima simuliranog želudačnog soka (Slika 4.18 B). Relativni intenzitet pikova je ostao isti u odnosu na kontrolni uzorak koji je uzet nakon 0 min pepsinskog tretmana (Slika 4.18 A). Iako relativni intenzitet aktinidinskih pikova opada, oni su i dalje prisutni i nakon 120 min tripsinskog tretmana (slika 4.18 C). Sa druge strane, nasuprot rezultatima aktivnog aktinidina, maseni spektar inhibiranog aktinidina pokazuje značajan gubitak primarne strukture u uzroku negde između 0 min i 120 min pepsinske digestije (Slika 4.18 E). SDS-PAGE uzoraka nakon digestije (slika 4.15) pokazuje da se ovo dešava nakon 60 minuta digestije pepsinom.

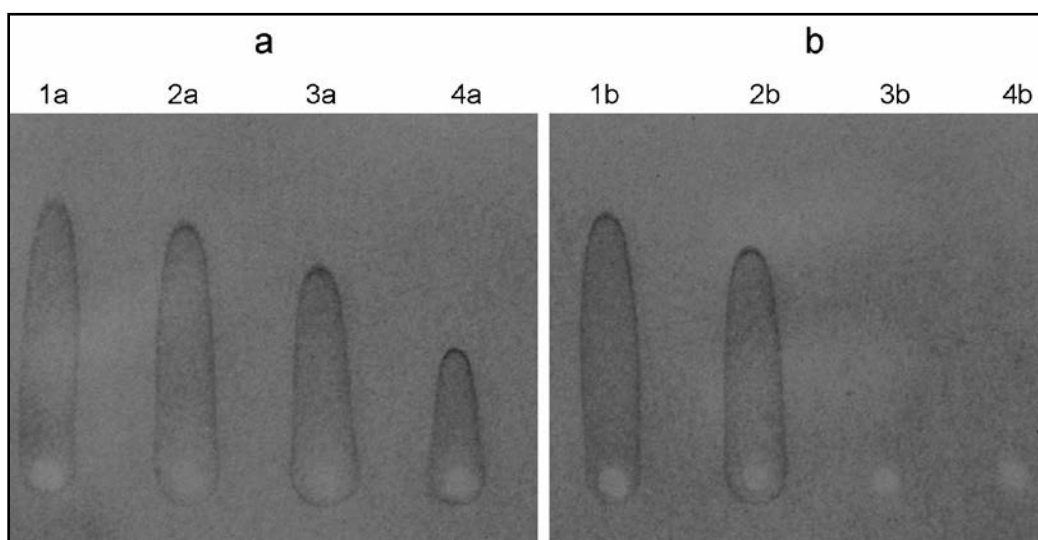


Slika 4.18. Masena spektrometrija uzoraka aktivnog aktinidina nakon 0 min pepsinskog tretmana (A), 120 min pepsinskog tretmana (B), i 120 min tripsinskog tretmana (C); i E-64 inhibiranog aktinidina nakon 0 min pepsinskog tretmana (D) i 120 min pepsinskog tretmana (E). Inset prikazuje dekonvulovan spektar.

#### 4.5.4. Imunogenost aktinidina nakon digestije u SGF i SIF

Nakon što se pokazalo da je aktivan aktinidin otporan na dejstvo pepsina tokom 2h, a zatim i na dejstvo tripsina u istom trajanju, i da pri tom zadržava svoju proteolitičku aktivnost, imunoreaktivnost aktinidina nakon ovih tretmana je ispitana raketnom imunoelktroforezom.

Uzorci aktivnog i neaktivnog aktinidina nanešeni su na agarozni gel u koji su inkorporirana anti-Act d 1 zečija antitela. Karakteristični imunoprecipitati su formirani sa uzorcima aktivnog aktinidina i nakon 120 min pepsinskog tretmana u uslovima simuliranog želudačnog soka, kao i nakon 120 min tripsinskog tretmana u uslovima simuliranog crevnog soka (slika 4.19).



*Slika 4.19. Raketa imunoelktroforeza uzoraka aktivnog (a) i E-64 inhibiranog (b) aktinidina nakon pepsinske i tripsinske digestije. 1 a/b- kontrolni uzorci (aktinidin inkubiran u uslovima želudačnog soka a zatim i u uslovima crevnog soka bez dodatka pepsina ili tripsina), 2a/b- 0 min tretmana u uslovima želudačnog soka, 3 a/b- aktinidin nakon 2 h inkubacije u simuliranom želudačnom soku, 4a/b- aktinidin nakon 2h inkubacije sa tripsinom.*

U slučaju aktinidina inhibiranog sa E-64, imunoprecipitati se ne formiraju u uzorku nakon 120 min pepsinske digestije, niti u uzorku nakon 120 min tripsinske digestije, što potvrđuje rezultate SDS-PAGE i masene analize da je došlo do degradacije inaktivnog proteina.

#### **4.6. Ispitivanje prisustva aktivnog i inhibiranog aktinidina u proteinskim ekstraktima kivija**

Prilikom eksperimenata sa aktiviranim i inhibiranim preparatima aktinidina, utvrđeno je da aktinidin izolovan u nativnim uslovima sadrži jedan deo enzima u inaktivnoj formi. Zavisnost odnosa aktivnog i neaktivnog aktinidina od načina pripreme proteinskog ekstrakta kivija je ispitana ekstrakcijom proteina jednog ploda kivija u tri različita ekstrakciona pufera. Ekstrakciona procedura se razlikovala samo u upotrebljenim puferima:

Kivi ekstrakt I: 0.1 M natrijum citratni pufer, pH 5.0

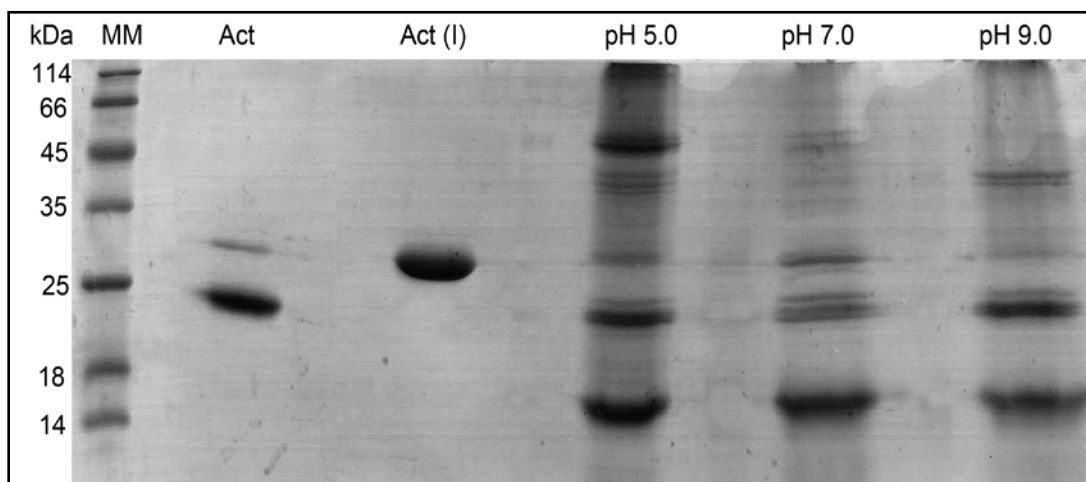
Kivi ekstrakt II: 0.1 M natrijum fosfatni pufer, pH 7.0

Kivi ekstrakt III: 0.1 M amonijum bikarbonatni pufer, pH 9.0

Dobijeni ekstrakti su analizirani SDS-PAGE elektroforezom, zimogramom sa želatinom i imunoblotom uz upotrebu specifičnih poliklonskih anti-aktinidin antitela. Ekstrakti su poređeni sa uzorcima prečišćenog aktinidina, od kojih je jedan prethodno aktiviran sa L-cisteinom, a drugi inhibiran koktelom peptidaznih inhibitora. Ukupna koncentracija proteina u svim ekstraktima je izjednačena razblaživanjem u odgovarajućem puferu i dovedena do vrednosti od  $1\text{ mg mL}^{-1}$ . SDS-PAGE analizom je utvrđeno da postoji različit odnos aktivnog i neaktivnog aktinidina u uzorcima proteinskog ekstrakta kivija zavisno od pH vrednosti ekstrakcionog pufera (slika 4.20).

Kod svih pripremljenih ekstrakata vidljive su obe proteinske trake koje odgovaraju aktivnom i inhibiranom aktinidinu. Traka nešto iznad 25 kDa odgovara elektroforetskoj pokretljivosti inaktiviranog aktinidina u neredukujućim uslovima. Traka molekulske mase

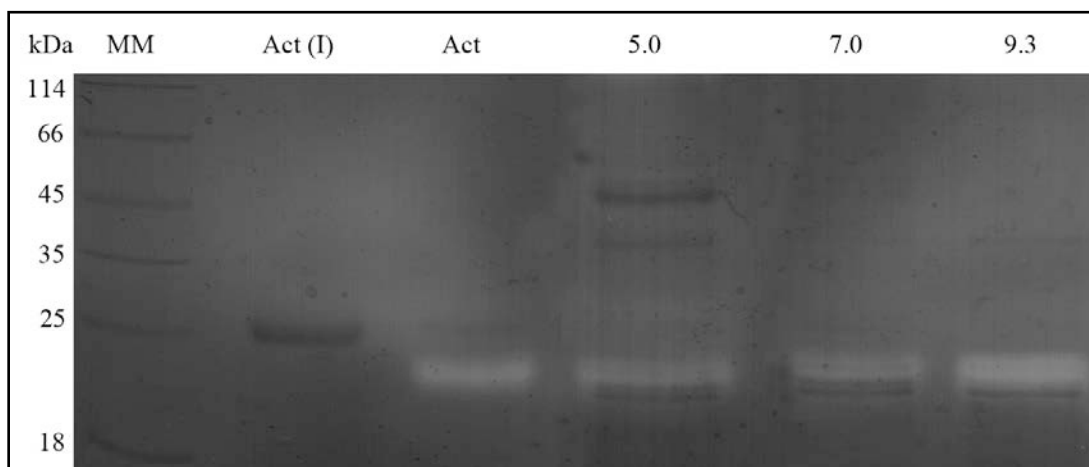
nešto ispod 25 kDa korespondira sa migracionim profilom prečišćenog i aktiviranog aktinidina.



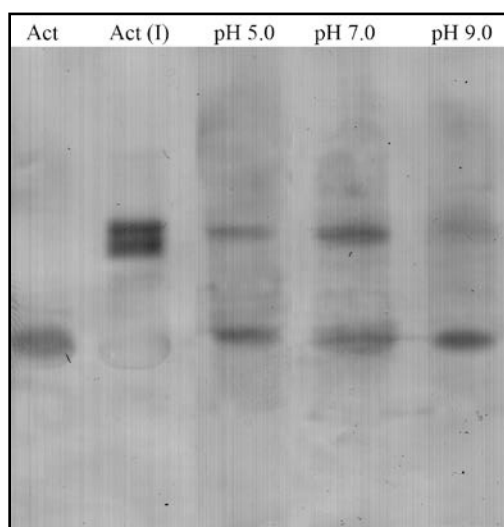
*Slika 4.20. SDS-PAGE (neredukujući) različitih ekstrakata kivija. MM- molekularni marker, Act- aktinidin aktiviran sa L-cisteinom, Act (I)- aktinidin inhibiran dodatkom ekvimolarne količine E-64, pH 5.0- kivi ekstrakt u citratnom puferu na pH 5.0, pH 7.0- kivi ekstrakt u fosfatnom puferu, pH 7.0, pH 9.0- kivi ekstrakt u bikarbonatnom puferu, pH 9.0*

Denzitometrijska analiza gela je pokazala da najveći intenzitet trake aktivnog aktinidina ima ekstrakt pripremljen na pH 9.0 (100%), zatim ekstrakt pripremljen na pH 5.0 (80.07%), a najmanji intenzitet trake je prisutan u ekstraktu pripremljenom na pH 7.0 (57.83%). Zimogramom sa želatinom kao supstratom je potvrđeno da sva tri ekstrakta sadrže aktivni aktinidin, koji migrira kao traka relativne molekulske mase od približno 22 kDa (slika 4.21).

U cilju potvrde da obe proteinske trake vidljive u SDS-PAGE pripadaju aktinidinu, proteini su nakon elektroforeze prebačeni na nitroceluloznu membranu. Imunoblot je razvijen upotrebom poliklonskog zečijeg seruma dobijenog nakon imunizacije zeca prečišćenim aktinidinom (slika 4.22). Denzitometrijska analiza traka aktivnog aktinidina na imunoblotu je pokazala da intenzitet traka približno odgovara vrednostima dobijenim analizom SDS-PAGE gela (kivi ekstrakt na pH 9.0 ima najveći relativni intenzitet – 100 %, zatim sledi ekstrakt na pH 5.0 – 87 %, in a kraju ekstrakt na pH 7.0 sa svega 44 %).



Slika 4.21. Zimogram sa želatinom (neredukujući) različitih ekstrakata kivija. MM- molekularski marker, Act (I)- aktinidin inhibiran dodatkom ekvimolarne količine E-64, Act- aktinidin aktiviran sa L-cisteinom, pH 5.0- kivi ekstrakt u citratnom puferu na pH 5.0, pH 7.0- kivi ekstrakt u fosfatnom puferu, pH 7.0, pH 9.0- kivi ekstrakt u bikarbonatnom puferu, pH 9.0



Slika 4.22. Imunoblot razvijen sa poliklonskim zečijim anti-act d 1 serumom, Act- aktinidin aktiviran sa L-cisteinom, Act (I)- aktinidin inhibiran dodatkom ekvimolarne količine E-64, pH 5.0- kivi ekstrakt u citratnom puferu na pH 5.0, pH 7.0- kivi ekstrakt u fosfatnom puferu, pH 7.0, pH 9.0- kivi ekstrakt u bikarbonatnom puferu, pH 9.0.

Određivanje količine proteolitički aktivnog aktinidina u različitim ekstraktima rađena je kvantifikativno kazeinolitičkim esejom. Pre kazeinolitičkog eseja, različiti ekstrakti kivija su dijalizovani naspram 20 mM kalijum- fosfatnog pufera, pH 6.5, i svedeni na istu koncentraciju od 1 mg mL<sup>-1</sup>. S obzirom da je aktinidin izuzetno zastupljena peptidaza u ekstraktu kivija, uzeto je da sva izmerena proteolitička aktivnost ekstrakta kivija potiče od aktinidina. Standardna prava je sačinjena merenjem kazeinolitičke aktivnosti za osam različitih koncentracija prečišćenog i aktiviranog aktinidina od 0.25 mg mL<sup>-1</sup> - 2 mg mL<sup>-1</sup>.

Rezultati kazeinolitičkog eseja se poklapaju sa procenama količine aktivnog aktinidina u ekstraktu iz denzitometrijske analize SDS-PAGE gela i imunoblota (Tabela 4.3). Kivi ekstrakt pripremljen na pH 9.0, koji je imao i najintenzivniju traku aktivnog aktinidina na gelu, istovremeno poseduje i najveću izmerenu koncentraciju aktivnog enzima, nakon njega sledi ekstrakt pripremljen na pH 5.0, dok ekstrakt pripremljen na pH 7.0 ima dva puta nižu koncentraciju aktivnog enzima u odnosu na ekstrakt na pH 9.0.

*Tabela 4.3. Koncentracija aktivnog aktinidina u različitim kivi ekstraktima*

<b>Kivi ekstrakt</b>	<b>Koncentracija aktivnog enzima (mg mL<sup>-1</sup>)</b>
Ekstrat pH 5.0	0.46
Ekstrat pH 7.0	0.28
Ekstrat pH 9.0	0.62

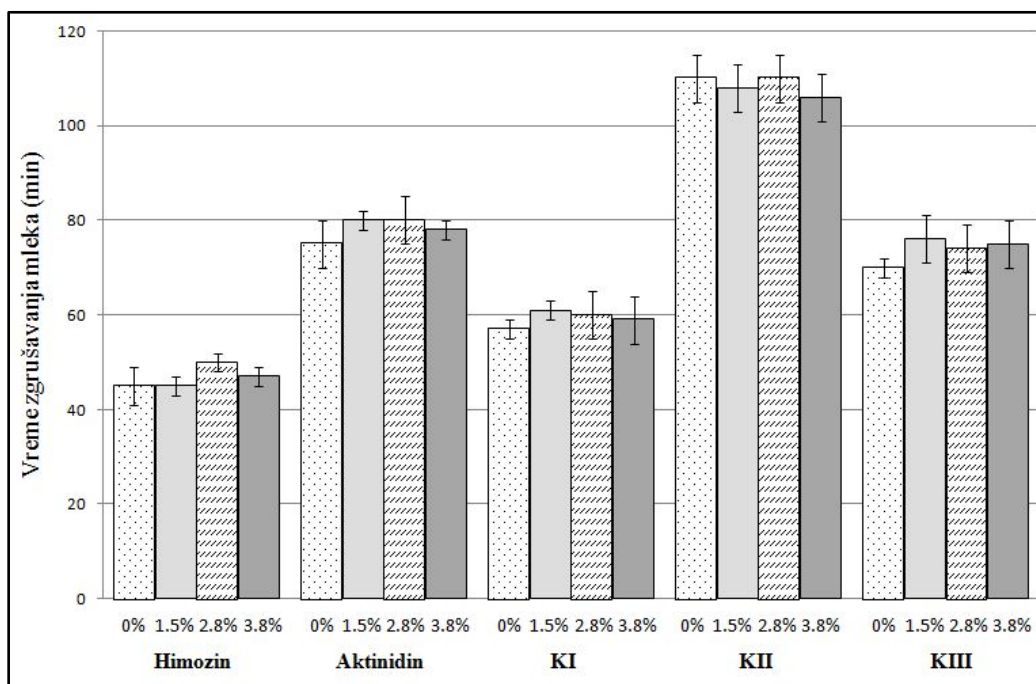
## **4.7. Upotreba proteinskog ekstrakta kivija kao agensa za koagulaciju mleka**

Nakon što je utvrđeno da koncentracija aktivnog aktinidina u proteinskom ekstraktu kivija zavisi od pufera koji se koristi kao ekstrakciono sredstvo, ispitana je mogućnost upotrebe ekstrakata kivija kao agensa za proizvodnju sira. Izmerena je koagulaciona aktivnost (C) ekstrakata prema uzorcima delimično obranog mleka različitih procenata

mlečne masti. Nakon toga izmerena je proteolitička aktivnost (P) ekstrakata prema proteinima delimično obranog mleka, i analiziran je elektroforetski profil proteina gruševine i surutke.

#### 4.7.1. Koagulaciona aktivnost ekstrakata

Koagulaciona aktivnost tri različita ekstrakta kivija poređena je sa aktivnošću prečišćenog aktinidina i aktivnošću komercijalno dostupnog životinjskog himozina. Dobijeni rezultati su pokazali da kivi ekstrakt I pripremljen na pH 5.0 ima veću koagulacionu aktivnost od ekstrakat pripremljenih na pH 7.0 (kivi ekstrakt II) i 9.0 (kivi ekstrakt III), iako ima manju koncentraciju aktivnog aktinidina u odnosu na ekstrakt III (slika 4.23). Kivi ekstrakt I je pokazao 18 % veću koagulacionu aktivnost nego ista količina prečišćenog aktinidina i 20 % nižu aktivnost nego ista količina komercijalnog himozina. Ustanovljeno je i da procenat mlečne masti u rasponu od 0.5 % do 3.8 % ne utiče na koagulacionu aktivnost ekstrakata, prečišćenog aktinidina ili himozina.

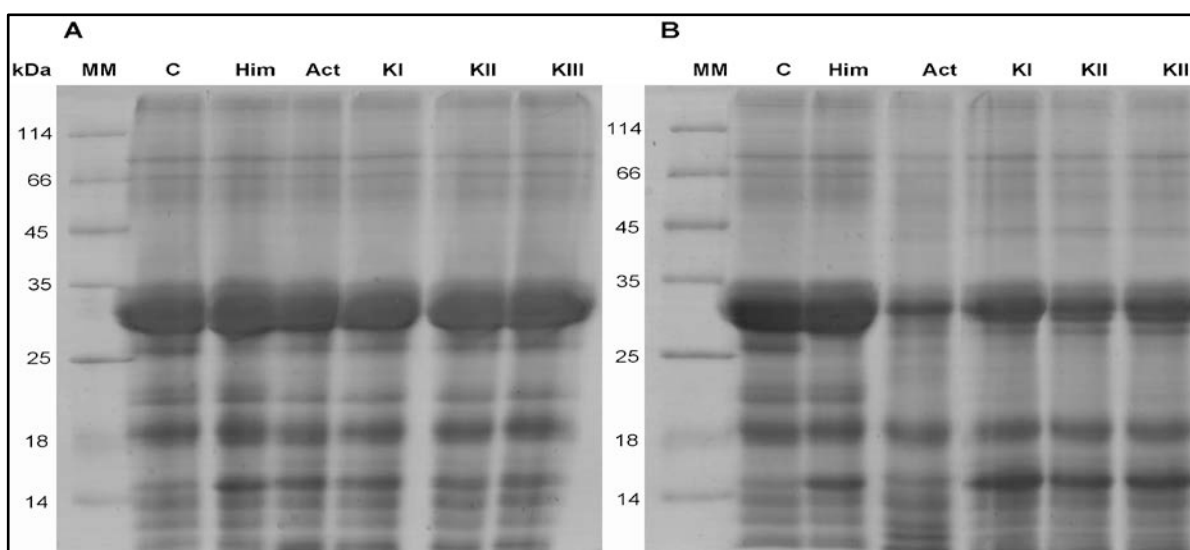


Slika 4.23. Zavisnost brzine zgrušavanja mleka od procenta mlečne masti u mleku. KI- kivi ekstrakt pH 5.0, KII- kivi ekstrakt pH 7.0, KIII- kivi ekstrakt pH 9.0.



#### 4.7.2. Proteolitička aktivnost prema mleku

Proteolitička aktivnost ekstrakata prema delimično obranom mleku sa 0.5 % mlečne masti merena je sa i bez dodatka L-cisteina. S obzirom da je L-cistein poznat aktivator cistein peptidaza, rezultati su očekivano pokazali da svi ekstrakti, kao i prečišćeni aktinidin, pokazuju znatno manju kazeinolitičku aktivnost kada se u reakcinu smešu ne dodaje cistein u višku. Uticaj L-cisteina na aktivnost aktinidina je jasno vidljiv na slici 4.24 koja prikazuje SDS- PAGE proteolitičke aktivnosti ekstrakata, aktinidina i himozina prema mleku (A- bez dodatka L-cisteina, B- sa 17 mM L-cisteinom).



Slika 4.24. Proteolitička aktivnost aktinidina, himozina i tri kivi ekstrakta prema mleku bez dodatog L-cisteina (A) i sa dodatim 17 mM L-cisteinom (B). MM- molekularni marker, C- netretirano mleko, Him- komercijalni himozin, Act- prečišćeni aktinidin, KI- kivi ekstrakt pH 5.0, KII- kivi ekstrakt pH 7.0, KIII- kivi ekstrakt pH 9.0.

Proteinski profil dobijen proteolitičkom aktivnošću aktinidina i sva tri kivi ekstrakta bez dodatka L-cisteina u reakcinu smešu skoro je identičan profilu koji je dobijen dejstvom himozina. Nijedan od tretiranih uzoraka mleka nije pokazao vidljivu degradaciju  $\alpha$ - ili  $\beta$ - kazeina (33 i 31 kDa). Prilikom dodatka 17 mM L-cisteina došlo je do očigledne degradacije  $\beta$ - kazeina i (u nešto manjoj meri)  $\alpha$ - kazeina u uzorku mleka tretiranog

prečišćenim aktinidinom. Tri kivi ekstrakta (svedena na istu koncentraciju aktivnog enzima) su pokazala manju proteolitičku aktivnost prema frakcijama kazeina nego prečišćeni aktinidin.

Smanjena aktivnost aktinidina prema kazeinu u odsustvu većih koncentracija L-cisteina doprinosi mogućnosti upotrebe aktinidina u industriji sira. Izračunavanjem odnosa koagulacione i proteolitičke aktivnosti (C/P vrednosti) i poređenjem sa vrednošću dobijenom za komercijalni himozin dobija se bolja slika o upotrebljivosti preparata kao agensa za koagulaciju mleka (Tabela 4.4). Proteinski ekstrakt kivija pripremljen na pH 5.0 ima dva puta bolji C/P odnos od ekstrakta pripremljenog na pH 7.0, i najbliži je vrednosti dobijenoj za himozin.

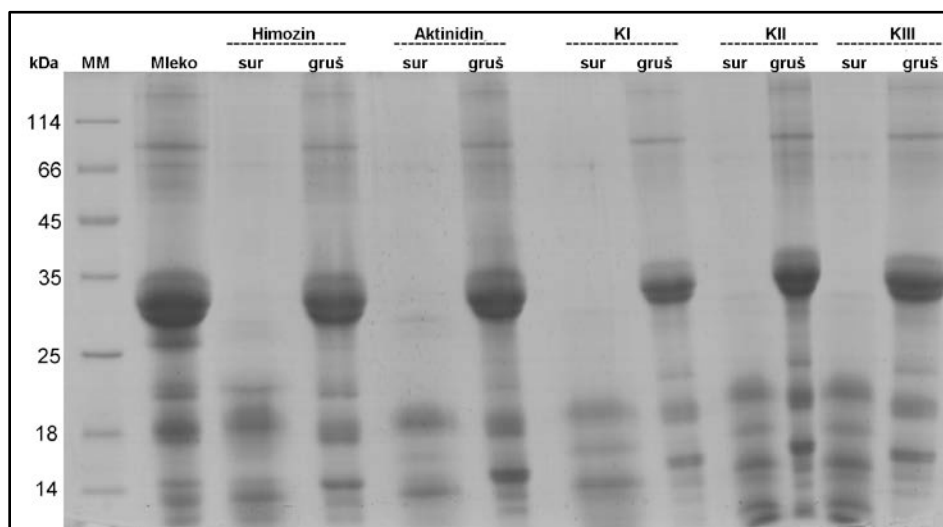
*Tabela 4.4. Poređenje odnosa koagulacione aktivnosti (C) sa proteolitičkom aktivnošću (P) prečišćenog aktinidina, tri različita kivi ekstrakta i komercijalnog himozina.*

	aktivni enzim (mg mL <sup>-1</sup> )	% kazeinolitičke aktivnosti <sup>a</sup>	% vremena zgrušavanja mleka <sup>b</sup>	C/P vrednost
<b>Himozin</b>	0.50 ± 0.01	100	100	1.00
<b>Aktinidin</b>	0.50 ± 0.03	110 ± 2	51 ± 3	0.46 ± 0.05
<b>Ekstrakt pH 5.0</b>	0.46 ± 0.08	100 ± 3	69 ± 2	0.69 ± 0.05
<b>Ekstrakt pH 7.0</b>	0.28 ± 0.04	105 ± 2	36 ± 2	0.34 ± 0.04
<b>Ekstrakt pH 9.0</b>	0.62 ± 0.04	110 ± 2	50 ± 2	0.45 ± 0.05

<sup>a</sup> % aktivnosti himozina, mereno bez dodatka L-cys, <sup>b</sup> % vremena zgrušavanja mleka za himozin.

#### 4.7.3. Proteinski profili gruševine i surutke

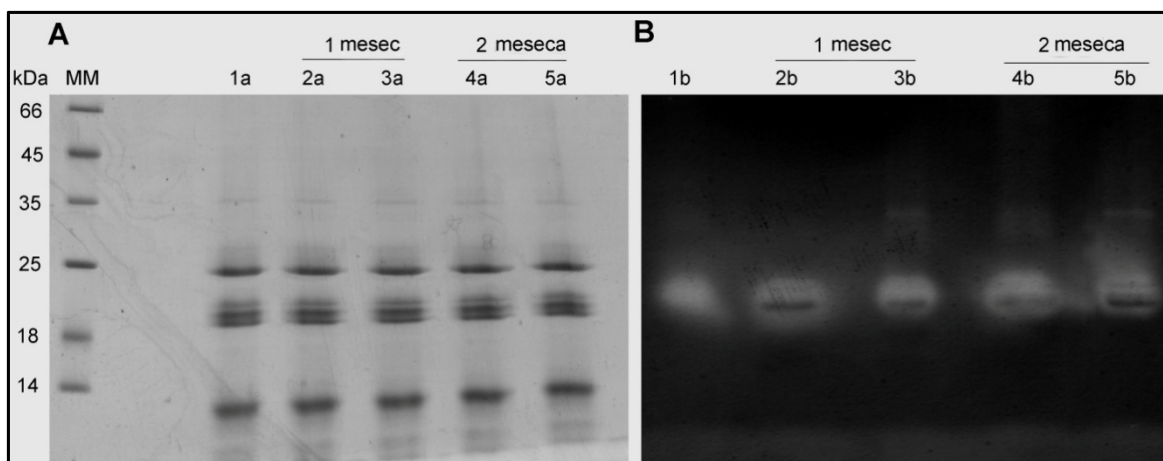
Sastav gruševine i surutke koje se dobijaju koagulacionim dejstvom aktinidina i kivi ekstrakata na mleko poređeni su sa gruševinom i surutkom koje se dobijaju dejstvom himozina. U sve uzorke mleka je dodata jednaka količina aktivnog enzima. Proteinski profili dobijeni u SDS-PAGE u redukujućim uslovima su pokazali da ne postoje vidljive razlike u sastavu gruševine i surutke dobijenih tretiranjem mleka preparatima kivija i himozinom.



4.25. Proteinski sastav surutke (*sur*) i gruševine (*gruš*) dobijenih koagulacionim dejstvom himozina, aktinidina i kivi ekstrakata KI, KII i KIII. Mleko – netretirani uzorak delimično obranog mleka.

#### 4.7.4. Stabilnost proteinskog ekstrakta kivija pripremljenog na pH 5.0.

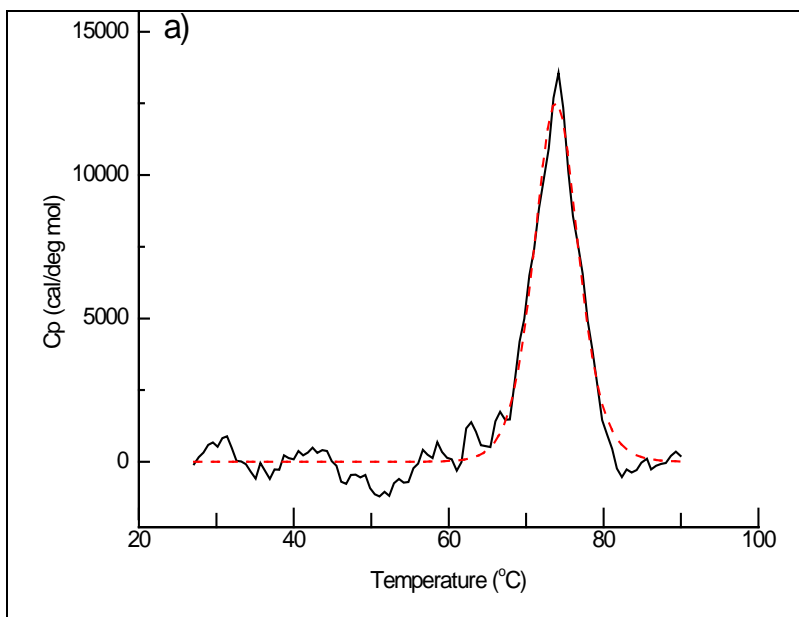
Bitnu osobinu za moguću upotrebu ekstrakta kivija kao agensa za koagulaciju u industriji mleka predstavlja i stabilnost proteinskog ekstrakta. Kivi ekstrakt koji je pokazao najbolji C/P odnos (KI) je analiziran tokom 2 meseca stajanja na sobnoj temperaturi i na +4°C. Dobijeni rezultati pokazuju da se proteinski profil ekstrakta ne menja tokom ovog vremenskog perioda (slika 4.26 A). Zimografija sa želatinom kao supstratom je potvrdila i očuvanost proteolitičke aktivnosti aktinidina nakon ovog perioda (slika 4.26 B).



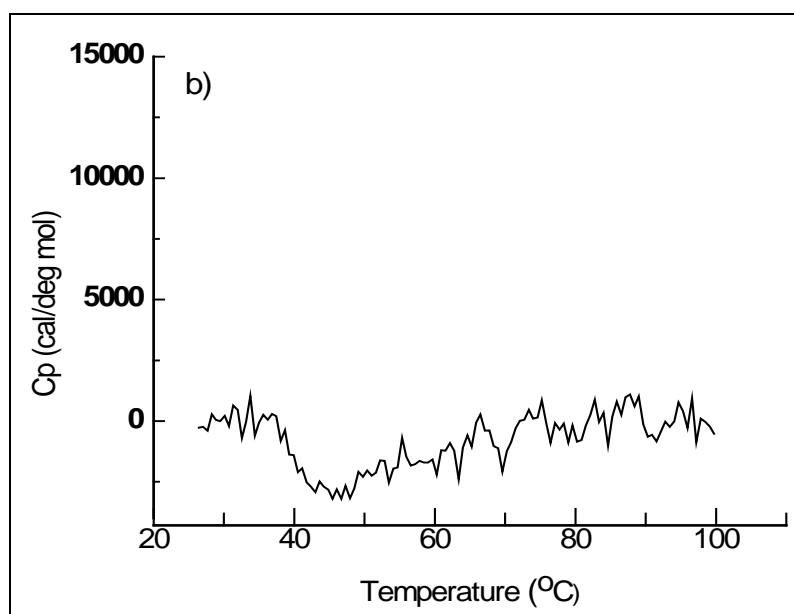
Slika 4.26. Analiza stabilnosti proteinskog ekstrakta kivija pripremljenog na pH 5.0.: A) SDS-PAGE: 1a, proteinski profil odmah nakon ekstrakcije; 2a, nakon 1 meseca na +4 °C; 3a, nakon 1 meseca na sobnoj temperaturi; 4a, nakon 2 meseca na +4 °C; 5a, nakon 2 meseca na sobnoj temperaturi. (B) Zimogram sa želatinom kao substratom: 1b, odmah nakon ekstrakcije; 2b, nakon 1 meseca na +4 °C; 3b, nakon 1 meseca na sobnoj temperaturi; 4b, nakon 2 meseca na +4 °C; 5b, nakon 2 meseca na sobnoj temperaturi.

#### 4.8. Ispitivanje termalne stabilnosti aktivnog aktinidina

Za identifikaciju strukturnih faznih prelaza koristi se metoda diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC). Naime, kod strukturnih faznih prelaza dolazi do apsorpcije ili emisije određene količine toplote. Ako se ispitivani i referentni uzorak greju konstantnom brzinom u kontrolisanoj atmosferi, povećanje temperature u oba uzorka treba da je jednako osim ako u ispitivanom uzorku ne dolazi do izvesnih promena prouzrokovanih zagrevanjem. U tom slučaju temperatura uzorka može biti viša ili niža u odnosu na referentni materijal, zavisno od karaktera procesa koji se odvija (egzoterman ili endoterman) i ova promena u protoku toplote se manifestuje kao pik na grafiku. Površina ispod pika je direktno proporcionalna entalpijskoj promeni, dok je na osnovu karaktera pika moguće razlikovati egzotermne od endotermnih procesa. Ova metoda je korišćena za ispitivanje termalne stabilnosti aktivnog aktinidina.



Slika 4.27. DSC endoterma aktivnog aktinidina u temperaturnom region od 20 do 100°C



Slika 4.28. DSC termalno denaturisanog aktinidina nakon brzog hlađenja

Detektovani su sledeći termodinamički parametri razvijanja proteina:  $T_m=73.9^\circ\text{C}$  (temperature tranzicionog maksimuma),  $\Delta H^{\text{cal}}=94.90$  kcal/mol (kalorimetrijska entalpija), i  $\Delta H^{\text{VH}}=126.77$  kcal/mol (van't Hoffova entalpija). Termalno razvijanje aktiviranog aktinidina (slika 4.27) je visoko kooperativan proces ( $H^{\text{cal}}/H^{\text{VH}}=0.75$ ) u temperaturnom region od  $65^\circ\text{C}$  to  $85^\circ\text{C}$ . Ovo ukazuje na činjenicu da oba domena aktinidina termodinamički prolaze kroz isti proces. Termalna denaturacija aktinidina je ireverzibilni process, što se vidi po odsustvu endoternog efekta prilikom drugog skeniranja uzorka nakon brzog hlađenja. (slika 4.28).

## 5. Diskusija

Prisustvo proteolitičkih enzima u biljnim proteinskim ekstraktima koji se koriste za dijagnozu alergija na hranu može dovesti do degradacije drugih alergeni proteina u ekstraktu i time uticati na validnost uspostavljene dijagnoze. Iz ovog razloga se često optimizuje ekstrakciona procedura sa namerom da se aktivnost peptidaze suzbije tokom ekstrakcije, kao i da se spreči degradacija ekstrakta tokom vremena njegovog čuvanja i upotrebe. S obzirom da je već duže vreme poznato da plod kivija sadrži velike količine solubilne cistein peptidaze aktinidina, tokom pripreme ekstrakta kivija se često dodaje koktel peptidaznih inhibitora, ili specifični, ireverzibilni inhibitor cistein peptidaza papainske familije - E-64.<sup>112,154</sup> Osim upotrebe peptidaznih inhibitora, prethodno je pokazano da na aktivnost aktinidina u ekstraktu kivija može uticati i period branja ploda kivija kao i tretman ploda u periodu između branja i prosleđivanja ovog voća na tržište.<sup>155</sup> U cilju ispitivanja strukturnih i imunoloških karakteristika nativnog aktinidina ovaj enzim je izolovan i prečišćen iz svežih plodova zelenog kivija (*Actinidia deliciosa*, cv Hayward), bez dodatka peptidaznih inhibitora.

U literaturi postoje oprečni podaci vezani za molekulska masu aktinidina i autori prijavljuju različite vrednosti, u rasponu od 23.5 kDa do 30 kDa, u zavisnosti od metode koja je korišćena za određivanje molekulske mase, a najveće razlike se javljaju prilikom određivanja mase putem SDS-PAGE.<sup>18,112,113,117,126</sup>

Analizom homogenosti preparata na 1D i 2D PAGE uočeno je prisustvo dve proteinske trake sa različitim elektroforetskom pokretljivošću i u redukujućim (30 kDa/ 22 kDa) i u neredukujućim uslovima (25 kDa/22 kDa). Edmanovom degradacijom i masenom analizom je utvrđeno da obe trake pripadaju zrelom obliku molekula aktinidina koji ima molekulska masu od 23 883.1 Da. Ustanovljeno je da aktivacijom izolovanog preparata enzima (dodatkom L-cisteina) dolazi do smanjenja intenziteta više trake na SDS-PAGE elektroforezi i da protein tada migrira kao jedna traka od 22 kDa. Nasuprot tome, inaktivacijom enzimske aktivnosti preparata, bilo termalnim tretmanom ili dodatkom inhibitora, dolazi do gubitka niže trake, i protein migrira kao traka od 30 kDa u redukujućim, tj. 25 kDa u

neredukujućim uslovima. Zimogramom sa želatinom je pokazano da samo niža traka od 22 kDa predstavlja proteolitički aktivan aktinidin. Masenom analizom i eksperimentom sa isecanjem aktivnog aktinidina iz gela i ponovnim puštanjem na elektroforezu nakon inaktivacije, pokazano je da traka od 22 kDa nije produkt autoproteolitičke aktivnosti proteina sa trakom od 30 kDa.

U literaturi je opisano više slučajeva proteina koji poseduju abnormalnu elektroforetsku pokretljivost u SDS-PAGE, tj. pokazuju molekulsku masu koja je različita od one potvrđene kroz aminokiselinsku sekvencu i masenu analizu.<sup>152,156-161</sup> Ovaj fenomen nastaje kada protein ne vezuje uobičajenih 1.4g SDS po gramu proteina u konvencionalnim uslovima pripreme uzorka za SDS-PAGE analizu, i stoga ne putuje samo na osnovu mase, već delom i na osnovu šarže ili oblika. Među najpoznatije primere abnormalne migracije na SDS-PAGE spadaju proteini koji različito putuju u redukujućim i neredukujućim uslovima, usled prisustva nelinearnih oblika nastalih nepotpunim raskidanjem intralančanih disulfidnih mostova.<sup>156-158</sup> Ovim se objašnjava i razlika u pokretljivosti neaktivnog aktinidina u redukujućim (30 kDa) i neredukujućim (25 kDa) uslovima. U literaturi se takođe navode i slučajevi abnormalne migracije veoma hidrofobnih proteina, izrazito kiselih ili baznih proteina, kao i glikoproteina.<sup>156, 159-161</sup>

Izoelektrofokusanjem je ustanovljeno da ne postoji razlika u šarži između aktivnog i inhibiranog aktinidina, i da oba oblika pokazuju pI vrednost od 3.5 koja odgovara literaturnim podacima za aktinidin.<sup>112,114</sup> Takođe, poznato je da aktinidin nema glikoproteinsku komponentu koja bi mogla da utiče na elektroforetsku pokretljivost.<sup>17,112,114</sup> Stoga, uočena razlika u elektroforetskoj pokretljivosti između aktivnog i neaktivnog aktinidina se najverovatnije objašnjava razlikom u konformaciji između ova dva oblika. CD spektroskopija aktivnog i E-64 inhibiranog aktinidina u bliskoj i dalekoj UV oblasti je upotrebljena u cilju poređenja konformacija ova dva oblika. Iz spektara u dalekoj UV oblasti očigledno je da inaktivacijom enzima ne dolazi do promena u konformaciji na nivou sekundarnih struktura proteina. Sa druge strane, u spektrima bliske UV oblasti, koji se koriste pri proceni promena u tercijarnoj strukturi proteina, prisutno je nekoliko razlika između aktivnog i inhibiranog proteina. S obzirom da CD spektar proteina u oblasti talasnih dužina između 260 i 320 nm zavisi od broja i okruženja aromatičnih aminokiselina,



verovatno je da dolazi do delimičnog gubitka kompaktnosti aktinidina prilikom vezivanja inhibitora, što bi dalje uticalo na lakšu linearizaciju molekula prilikom pripreme za SDS-PAGE i drugačiju elektroforetsku pokretljivost u odnosu na aktivan molekul. Fluorimetrijskom analizom vezivanja ANS-a je dodatno potkrepljena hipoteza o razlici u konformaciji dva oblika aktinidina.

S obzirom da je tokom eksperimenata aktivacije i inhibicije preparata aktinidina primećeno da u nativnom uzorku postoji određen deo enzima koji je od početka inhibiran, pripremljeni su proteinski ekstrakti kivija sa tri ekstrakciona pufera različitih pH vrednosti (bazni, neutralni i kiseli ekstrakt). SDS-PAGE analiza, zajedno sa zimogramom, imunoblotom i kazeinolitičkim esejom, je pokazala da međusobni odnos sadržaja aktivnog i neaktivnog oblika aktinidina varira u zavisnosti od upotrebljenog ekstrakcionog pufera. Poznato je da sastav ekstrakcionog pufera može imati znatan uticaj na konformacionu stabilnost proteina,<sup>162</sup> i nije neobično da se postigne različit stepen ekstrakcije biljnih proteina u zavisnosti od pH vrednosti i korišćene soli u ekstrakcionom sredstvu.<sup>163</sup>

Komercijalno dostupni proteinski ekstrakti kivija se upotrebljavaju u kliničkom dijagnostifikovanju alergije na kivi, dok se sam aktinidin smatra biomarkerom alergije na kivi i korsiti u *in vitro* IgE vezujućim esejima,<sup>5</sup> pa je iz ovih razloga bilo važno utvrditi da li postoje imunološke razlike između aktivnog i inaktiviranog oblika aktinidina.

Aktivni i inaktivirani aktinidin su vezivali IgG antitela u imunoblotu sa poliklonskom zečijim serumom na aktinidin. Međutim, u imunoblotu sa pojedinačnim serumima sedam pacijenata sa prethodnom istorijom alergije na kivi, samo je inaktivirani oblik vezivao IgE, dok nijedan pacijent nije pokazao reaktivnost sa aktivnim aktinidinom, što ukazuje na moguću razliku u epitopima koje vezuju IgG i IgE antitela. U literaturi postoje primeri promene u IgE reaktivnosti alergena u imunoblotu, u zavisnosti od primene uslova koji mogu uticati na konformaciju proteina. Tako, na primer, IgE reaktivnost za alergen jabuke Mal d 2 u imunoblotu je detektovana tek u redukujućim uslovima, tj. nakon raskidanja disulfidnih mostova, dok nijedan od ispitanih seruma pacijenata nije pokazao pozitivnu reakciju u neredukujućim uslovima.<sup>164</sup> Promena u IgE reaktivnosti između aktivnog i inaktiviranog aktinidina je najverovatnije uzrokovana promenom u dostupnosti IgE vezujućih epitopa koji su skriveni u unutrašnjosti molekula.<sup>165</sup>

U kožnim probama pet od osam pacijenata je imalo pozitivnu reakciju i na aktivan i na neaktivan aktinidin, dok su tri pacijenta pozitivno reagovala samo na aktivan ili samo na termalno inhibirani aktinidin. Uočena razlika u *in vivo* reaktivnosti ova dva oblika aktinidina ukazuju i na postojeće varijacije u površinskoj topografiji epitopa, što je dodatno implicirano i razlikama u koncentraciji aktivnog i inhibiranog aktinidina koja izaziva maksimalnu aktivaciju bazofila.

U dijagnostici alergija na hranu je poznato da *in vitro* metode određivanja specifičnog IgE, kožne probe i oralni (provokacioni) testovi vrlo često ne daju iste rezultate, nemaju istu biološku i kliničku relevantnost i nisu međusobno izmenjivi.<sup>166</sup>

Imunoblot je jedan od čestih dijagnostičkih pristupa u određivanju obrasca senzitivacije kod pacijenata alergičnih na kivi, dok su kožne probe osnovni pristup u dijagnozi alergije na kivi. Rezultati dobijeni u testovima IgE reaktivnosti *in vitro* i *in vivo*, kao i prethodno utvrđena razlika u odnosu aktivnog i neaktivnog aktinidina u ekstraktima kivija, ukazuje na potrebu za obazrivošću prilikom dijagnoze alergije na kivi usled mogućnosti nepreciznih rezultata koji bi nastali kao posledica razlike u imunološkim osobinama aktivnog i inhibiranog aktinidina. Testovi IgE vezivanja sa prečišćenim alergenima bi trebalo da pruže pouzdanu detekciju/kvantifikaciju alergen-specifičnih IgE antitela, ali očigledno je neophodno dublje poznavanje fizičkih i hemijskih osobina alergernih proteina da bi se unapredio dijagnostički process.

Jedan od pristupa u uspostavljanju eseja za razlikovanje alergernih od nealergernih proteina hrane su i testovi digestibilnosti proteina u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta. Smatra se da protein hrane može da izazove senzitivaciju oralnim putem samo ako očuva svoju strukturu prilikom prolaska kroz gastrointestinalni trakt.<sup>12</sup> U testovima simulirane želudačne i intestinalne digestije je pokazana još jedna razlika u osobinama aktivnog i inhibiranog aktinidina. Enzim inhibiran sa E-64 je degradiran nakon 60 minuta tretmana sa pepsinom, dok aktivni enzim opstaje nakon 120 min pepsinskog tretmana praćenog sa dodatnih 120 minuta tripsinskog tretmana. Očuvanost intaktne primarne strukture aktivnog aktinidina je pokazana u SDS-PAGE i masenom analizom digestovanih uzoraka. Zimogramom sa želatinom je ustanovljeno da aktivni aktinidin, osim što preživljava pepsinsku i tripsinsku digestiju, takođe poseduje i proteolitičku aktivnost

nakon ovih tretmana, dok je raketnom imunoelektroforezom pokazano da nakon digestija ima i sposobnost vezivanja IgG, tj. očuvanu imunoreaktivnost.

Kod inhalatornih peptidaznih alergena je primećeno da izazivaju promene u propustljivosti plućnog epitela, što se smatra mogućim mehanizmom senzitivizacije na ove alergene.<sup>165</sup> Nedavna studija na ćelijskim linijama je pokazala da aktinidin utiče na morfologiju i adheziju intestinalnih ćelija.<sup>166</sup> Rezultati naših istraživanja pokazuju da aktinidin može dospeti u strukturno stabilnom i proteolitički aktivnom obliku, sa očuvanim imunogenim svojstvima, do intestinalne mukoze. Ovo bi mu potencijalno omogućilo da proteolitičkom aktivnošću dovede do promena na intestinalnom epitelu i na taj način senzitivise organizam oralnim putem.

Aktinidin, kao cistein peptidaza, ima i primenu u industriji procesovanja hrane.<sup>24-26, 128-129</sup> U ovoj disertaciji je ispitana mogućnost primene ekstrakata kivija kao biljnog agensa za proizvodnju sira, kao i optimalni uslovi za ekstrakciju koji će dati preparat sa maksimalnom koagulacionom aktivnošću. Odnos koagulacione i proteolitičke aktivnosti (C/P) se smatra ključnom prilikom određivanja korisnosti enzimskog preparata u proizvodnji sira.<sup>169</sup> Rezultati naših istraživanja su pokazali da proteinski ekstrakt kivija pripremljen na pH 5.0 poseduje C/P vrednost za kravlje mleko od 0.7, što je znatno bolja vrednost od one koju pokazuje prečišćeni aktinidin (0.46), a poredbeno sa odnosom izmerenim za himozin poreklom iz želuca preživara (1). Niska proteolitička aktivnost preparata kivija prema mleku je posledica činjenice da kravlje mleko prirodno ne sadrži dovoljnu količinu L-cisteina koja je potrebna za optimalnu aktivnost aktinidina prema  $\alpha$ - i  $\beta$ - kazeinu. U literaturi postoje opisi upotrebe ficina (peptidaze iz smokve koja je homolog aktinidina) u tradicionalnoj proizvodnji sira u pojedinim regionima Turske,<sup>170</sup> iako je poznato da ovaj enzim ima 4 puta veću specifičnu proteolitičku aktivnost prema kazeinu nego aktinidin.<sup>171</sup> Analiza proteinskog profila surutke i gruševine koje se dobijaju upotrebom ovog preparata pokazala je identični sastav sa profilima dobijenim upotrebom himozina. Takođe, utvrđeno je da procenat mlečne masti u opsegu od 0.5 – 3.8 % nema uticaja na koagulacionu aktivnost aktinidina, što je u skladu sa literaturnim podacima o uticaju mlečne masti na aktivnost himozina.<sup>172</sup>

S obzirom da je aktinidin pokazao stabilnost i proteolitičku aktivnost i nakon 2 meseca na sobnoj temperaturi, kao i, sa druge strane, sposobnost termalno inhibiranog enzima da izazove IgE vezivanje u *in vivo* i *in vitro* esejima, bilo je važno odrediti i termalnu stabilnost aktinidina. Eksperimenti termalne denaturacije su pokazali da aktinidin predstavlja kompaktnu proteinsku strukturu, sa temperaturom tranzicionog maksimuma od 73.9°C. S obzirom na prethodno ukazane razlike u dostupnosti i površinskoj topografiji epitopa kod aktivnog i termalno inhibiranog aktinidina, ovaj podatak bi mogao biti od važnosti prilikom procene bezbednosti namirnica u kojim se nalazi procesovani aktinidin.

## 6. Zaključak

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivane su strukturne i imunološke osobine aktivnog i inhibiranog aktinidina, cistein peptidaze kivija i uočeno je da:

- aktinidin prečišćen iz svežeg kivija u nativnim uslovima predstavlja smešu aktivnog i neaktivnog enzima,
- između aktivnog i inhibiranog oblika ovog enzima postoji razlika u elektroforetskoj pokretljivosti,
- aktivni i E-64 inhibirani aktinidin imaju različite CD i fluorescentne spektre, što ukazuje na promene u tercijarnoj strukturi enzima prilikom vezivanja inhibitora,
- relativni odnos količine aktivnog i inhibiranog proteina u ekstraktu kivija zavisi od njegove pripreme,
- aktivan i inhibiran enzim pokazuju razlike u imunološkim osobinama. Samo je inhibiran enzim sposoban da vezuje IgE u imunoblotu sa serumima pacijenata, dok u kožnim probama pacijenti pokazuju različite obrasce reagovanja na ova dva oblika,
- samo aktivni enzim preživljava 2h digestije u uslovima simuliranog želudačnog fluida, praćeno dvočasovnom digestijom u uslovima simuliranog intestinalnog fluida,
- nakon digestije aktivni aktinidin pokazuje očuvanu imunogenost i proteolitičku aktivnost i
- proteinski ekstrakt kivija pripremljen u citratnom puferu, pH 5.0, dovodi do zgrušavanja kravljeg mleka. Ovaj ekstrakt ima povoljan odnos koagulacione i proteolitičke aktivnosti prema mleku.

## 7. Eksperimentalni deo

### 7.1. Priprema proteinskog ekstrakta kivija

Plodovi zelenog kivija (*Actinidia deliciosa*) kupljeni u lokalnoj radnji, korišćeni su kao polazni materijal. Za ekstrakciju su korišćeni: 100 mM natrijum citratni pufer pH 5,0, 100 mM natrijum fosfatni pufer, pH 7.0 i 100 mM amonijum bikarbonatni pufer, pH 9.0. U ekstrakcione pufere nisu dodati inhibitori peptidaza. Iseckani i oljušteni plodovi kivija se homogenizuju u blenderu u ekstrakcionom sredstvu (1:2 wt/vol) 1 minut, a zatim se koriguje pH suspenzije i ekstrakcija izvodi 2 sata, uz mešanje, na 4 °C. Nakon toga se ekstrakt centrifugira 30 minuta na 3000 g. Uzorak se zatim stavi u celulozno crevo za dijalizu i dijalizuje naspram 4 L ekstrakcionog pufera, uz mešanje i tri izmene pufera u toku 24 h. Zatim se pH ekstrakta podesi na početnu vrednost ekstrakcionog pufera i odredi koncentracija proteina u njemu Bradford-ovom metodom.<sup>173</sup>

### 7.2. Određivanje koncentracije proteina

#### 7.2.1. Bradford-ova metoda

Najčešće korišćena metoda za određivanje koncentracije proteina je Bradford-ova metoda.<sup>173</sup> Bradford-ova metoda je zasnovana na merenju pomeranja apsorbancije slobodne boje Comassie Brilliant Blue u odnosu na vezanu, sa 470 nm na 595 nm.

Test je rađen u mikrotitar pločicama (F tip), a apsorbancija je očitavana ELISA čitačem (LKB Micro plate reader 5060-006), upotrebom filtera talasne dužine od 595 nm. Boja se rastvori u etanolu uz mešanje na magnetnoj mešalici, zatim se dodaju kiselina i voda do potrebne zapremine. Pre upotrebe, boja se razblaži pet puta vodom i filtrira. U 200 µL rastvora boje se odmeri 5 µL uzorka (za makro esej), odnosno 20 µL uzorka (za mikro esej) i nakon 5 minuta se očitava apsorbancija.

Rastvor boje:

CBB G-250	250 mg
95% etanol	50 mL
fosforna kiselina, 96%	100 mL
destilovana voda do	200 mL

Za konstruisanje kalibracione prave se koristi rastvor govedeg serum albumina koncentracije 1,0 mg/mL, razblažen vodom do finalnih koncentracija od 0,75 mg/mL, 0,50 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,10 mg/mL. Za mikro metode, štok koncentracije 0,1 mg/mL se razblaži vodom do finalnih koncentracija 0,075 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,025 mg/mL, 0,010 mg/mL.

Koncentrat BSA (1 mg BSA/mL)

BSA	10 mg
destilovana voda do	10 mL

Koncentrat BSA (0,1 mg BSA/mL)

BSA	1 mg
destilovana voda do	10 mL

Pripremanje standardnih rastvora BSA u opsegu koncentracija 0,1-1 mg/mL (makro esej)

BSA 1mg/mL ( $\mu$ L)	vode ( $\mu$ L)	finalna koncentracija BSA (mg/mL)
100	0	1,0
75	25	0,75
50	50	0,50
25	75	0,25
10	90	0,10

Pripremanje standardnih rastvora BSA u opsegu koncentracija 0,01-0,1 mg/mL (mikro esej)

BSA 0,1mg/mL ( $\mu$ L)	vode ( $\mu$ L)	finalna koncentracija BSA (mg/mL)
100	0	0,10
75	25	0,075
50	50	0,05
25	75	0,025
10	90	0,01

Vrednosti za koncentraciju proteina su izračunate iz jednačine prave:



Apsorbancija = f(koncentracija proteina (mg/ml)), dobijene metodom linearne regresione analize.

### 7.2.2. Određivanje koncentracije proteina spektroskopskom metodom

Koncentracija čistog proteina (Act d 1) određivana je spektroskopskom metodom<sup>174</sup>. Apsorbancija na 280 nm rastvora proteina merena je u standardnoj 1 cm kvarčnoj kiveti na spektrofotometru WPA Lightwave S2000 UV/Vis spectrophotometer. Teorijski ekstinkcioni koeficijent je izračunat na osnovu publikovane sekvence Act d 1, koristeći formulu:

$$A^{280\text{ nm}} (1\text{ mg/ml}) = (5690nw + 1280ny + 120nc)/M,$$

Gde su nw, ny i nc broj Trp, Tyr i Cys aminokiselinskih ostataka, redom, a M je masa polipeptida.

Izračunati ekstinkcioni koeficijent za Act d 1 je 1.7

## 7.3. Prečišćavanje aktinidina iz sirovog ekstrakta kivija

### 7.3.1. Prečišćavanje Act d 1 na SP-Sephadex C-50

Aktinidin je prečišćen iz proteinskog ekstrakta kivija pripremljenog u 100 mM natrijum citratnom puferu, pH 5.0. Jonoizmenjivač SP-Sephadex (GE Healthcare, Upsala, Švedska) je pripremljen bubrenjem u radnom puferu (100 mM natrijum-citratnom puferu, pH 5.0) tokom 24h. Nabubrela matriks je naliven u kolonu dimenzija 100 mm × 27 mm i ekvilibrisan propuštanjem 5 zapremina radnog pufera kroz kolonu.

Na kolonu je nanešeno 400 mL kivi ekstrakta i pri protoku od 1 mL min<sup>-1</sup> eluirani su nevezani proteini radnim puferom. Dobijena frakcija nevezanih proteina (delimično prečišćen Act d 1) je dijalizovana naspram 20 mM TRIS-HCl pufera, pH 8.0 tokom 48 h.

### 7.3.2. Prečišćavanje Act d 1 na QAE-Sephadex A-50

Uzorak dobijen prethodnom hromatografijom (400 mL) je nanešen na prethodno pripremljen QAE-Sephadex matriks (GE Healthcare, Upsala, Švedska) koji je ekvilibrisan radnim puferom (20 mM TRIS-HCl, pH 8.0.). Dimenzije korišćene kolone su bile 125 mm × 15 mm. Nakon što je radnim puferom eluirana nevezana frakcija, vezani protein su eluirani gradijentom soli u rasponu od 0.1M NaCl do 1M NaCl, pri brzini protoka od 0.8 mL min<sup>-1</sup>

Frakcije u kojima je elektroforezom dokazano prisustvo aktinidina su spojene i koncentrovane ultrafiltracijom. Oko 40 mg Act d 1 je izolovano iz polaznih 400 mL proteinskog ekstrakta kivija.

## 7.4. Elektroforetske tehnike

### 7.4.1. Natrijum dodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Elektroforetska razdvajanja proteina su rađena na Hoeffer SCI aparaturi po instrukcijama proizvođača. SDS-PAGE je rađena po modifikovanoj Laemmli-jevoj proceduri.<sup>175</sup>

Rastvori:

A: monomerni rastvor akrilamida (30%)

akrilamid	58.4 g
bisakrilamid	1.6 g
destilovana voda do	200 ml

B: Pufer za razdvajajući gel (1.5 M Tris HCl, pH 8.8)

Tris	36.3 g
destilovana voda do	200 ml

\*pH se podešava dodatkom 4M HCl

C: Pufer za koncentrujući gel (0.5 M Tris HCl, pH 6.8)

Tris	6.0 g
destilovana voda do	100 ml

\*pH se podešava dodatkom 4M HCl

D: 10 % rastvor SDS-a

SDS	10 g
destilovana voda do	10 ml

E: 10 % rastvor APS-a

APS	0.1 g
destilovana voda do	1.0 ml

\*poželjno je rastvor inicijatora polimerizacije napraviti pre upotrebe

F: Pufer za nadslojavanje gela pri polimerizaciji

-n-butanol zasićen vodom

G: Pufer za elektroforezu (0.25 M Tris, 0.192 Gly, 0.1% SDS, pH 8.3)

Tris	3.0 g
Gly	14.4 g
SDS	1.0 g
destilovana voda do	1000 ml

H: Pufer za pripremu uzorka (5× koncentrovan)

Reagens	zapremina (mL)
0,5 M Tris, pH 6,8	1.2
98 % glicerol	5.0
10 % SDS	2.0
2-merkaptetanol*	0.5
1 % bromfenol plavo	1.0
Destilovana voda do	10.0

\*Rastvor H za neredukujuću elektroforezu ne sadrži 2-merkaptetanol, tako da se u ovom koraku dodaje destilovana voda.

I: Rastvor boje za Poliakrilamidne gelove (0.1 % CBB, 50 % metanol, 10 % sirćetna kiselina)

CBB G ili R 250	0.5 g
metanol	100 ml
sirćetna kiselina	10 ml
destilovana voda do	200 ml

J: Rastvor za fiksiranje (50 % metanol, 10 % sirćetna kiselina)

metanol	500 ml
sirćetna kiselina	100 ml
destilovana voda do	1000 ml

K: Rastvor za obezbojavanje (25 % metanol, 5 % sirćetna kiselina)

metanol	250 ml
sirćetna kiselina	50 ml
destilovana voda do	1000 ml

Pripremanje gelova:

*Tabela 7.1. Priprema 10 mL 14% poliakrilamidnog gela za razdvajanje*

rastvor	V ( $\mu$ L)
A	4660
B	2500
H <sub>2</sub> O	2670
TEMED	4
D	100
E	75

*Tabela 7.2. Priprema 7.5 mL 4% poliakrilamidnog gela za koncentrovanje*

rastvor	V ( $\mu$ L)
A	1000
C	1880
H <sub>2</sub> O	4500
TEMED	4
D	100
E	60

Postupak:

Prema Tabeli 7.1. se napravi gel za razdvajanje i dezaeriše. Nakon dezaeracije se dodaju rastvori SDS-a i APS-a. Dezaerisani rastvor se sipa između staklenih ploča (10x8 cm) i nadsloji rastvorom n-butanola. Nakon polimerizacije, vodom se ispere površina gela i nalije se (na isti način pripremljen prema Tabeli 7.2.) rastvor gela za razdvajanje. U gel se uroni češalj. Ploče se nakon polimerizacije gela za koncentrovanje i nalivanja uzoraka u bunare urone u kadu sa puferom (rastvor G).

Uzorci se pripremaju zagrevanjem 1h na 45°C u rastvoru H vodeći računa o razblaženju (5×), centrifugiraju i nakon hlađenja do sobne temperature nanese se u bunare.

Elektroforeza je rađena na konstantnoj struji od 25 mA (dok BFP ne stigne na oko 0.5 cm od donje ivice gela). Nakon završetka elektroforeze, ploče se pažljivo razdvoje i gel prebaci u odgovarajuću posudu. Nakon brzog ispiranja vodom, tretira se na sledeći način:

Fiksiranje (rastvor J)	15 min
Bojenje (rastvor I)	15 min
Obezbojavanje 1 (rastvor J)	30 min
Obezbojavanje 2 (rastvor K)	do potpunog obezbojavanja

#### 7.4.2. Izoelektrično fokusiranje (IEF)

Poliakrilamidni gel sa inkorporiranim amfolitima se nalije između ploča dimenzija 8 × 13 cm, debljine 0.75 mm i ostavi da polimerizuje. Elektrode se natope u katodnom i anodnom rastvoru, višak rastvora se pokupi presovanjem između slojeva papirne vate i elektrode se pažljivo nameste na krajeve gela, vodeći računa da se postave paralelno. Nakon prefokusiranja gela 30 min na 800 V nanese se uzorci. Elektroforeza traje 1 h i 45 min pri uslovima: maksimalna jačina struje 50 mA, maksimalni napon 2000 V i

maksimalna snaga 10 W. Nakon završetka elektroforeze, gel se pažljivo skloni sa staklene ploče, ispere vodom i fiksira. Po završetku fiksiranja gel se ostavi preko noći u 200 mL 1% TCA i boji rastvorom za bojenje gelova.

30% akrilamid	3.75 mL
Amfoliti širokog opsega	1.25 mL
voda	9.9 mL
TEMED	10 $\mu$ L
APS	100 $\mu$ L

Katodni rastvor (150 mM NaOH)

NaOH	0.6 g
vode	100 mL
dezaeracija	15 min

Anodni rastvor (75 mM sumporna kiselina)

sumporne kiseline	0.42 mL
destilovana voda	100 mL



#### Rastvor za fiksiranje (30 % TCA)

TCA	60 g
destilovana voda do	200 mL
vreme	1 h

#### 7.4.3. Dvodimenzionalna poliakrilamid gel elektroforeza (2D PAGE)

U prvoj dimenziji proteini se razdvajaju prema pI vrednosti (IEF), a u drugoj dimenziji prema njihovoj molekularnoj masi (redukujuća SDS-PAGE). Traka gela nakon završenog IEF u kojoj su razdvojeni proteini se kratko inkubira u redukujućem puferu za ekvilibraciju i zatim se pažljivo prenese na površinu gela u bunar odgovarajućih dimenzija (bira se prema dužini trake). Nakon 40 min inkubacije u puferu, elektroforeza se radi prema opisanoj proceduri za SDS-PAGE.

Pufer za ekvilibraciju (redukujući):

$\beta$ -merkapto etanol	0.5 mL
0.5 M TRIS pH 6.8	1.25 mL
Glicerol	1 mL
10% SDS	2.3 mL
1% bromfenol plavo	nekoliko kapi
destilovana voda do	5 mL

## 7.5. Određivanje proteolitičke aktivnosti aktinidina

### 7.5.1. Aktivacija aktinidina

Prečišćeni aktinidin je aktiviran inkubiranjem u 20 mM kalijum-fosfatnom puferu, pH 6.5 u koji su dodati 52 mM L-cistein i 2 mM EDTA. Aktinidin i aktivacioni puffer su mešani u odnosu 1:1, v/v. Smeša je zagrevana 1 sat na 45 °C.

### 7.5.2. Inaktivacija aktinidina

Aktinidin je inaktiviran na jedan od 3 načina:

1. Termalnim tretmanom (inkubacija aktinidina na 95 °C tokom 5 minuta)
2. Dodatkom P2714 koktela peptidaznih inhibitora (Sigma-Aldrich) aktinidinskim uzorcima u odnosu 1:1 v/v i inkubiranjem 30 minuta
3. Dodatkom E-64 inhibitora uzorku aktinidina u ekvimolarnoj količini i inkubiranjem 30 minuta

### 7.5.3. Zimogram sa želatinom

Prilikom pripreme poliakrilamidnih gelova, u smešu se dodaje 1 mL prethodno pripremljenog rastvora 1 % želatina (Sigma-Aldrich) na 10 mL gela za razdvajanje (0,1 % želatina u gelu finalno). Rastvor želatina se priprema kuvanjem na 70 °C, i nakon kraćeg hlađenja se dodaje u smešu. Elektroforeza se izvodi na prethodno opisan način, a nakon razdvajanja proteina želatinozni gel se inkubira u 100 mM kalijum fosfatnom puferu pH 6.5 sa 26 mM L-cisteinom i 1 mM EDTA preko noći. Narednog dana se gel boji rastvorom boje za gelove (0.1 % CBB-R, 50 % metanol, 10 % sirćetna kiselina) 30 minuta na sobnoj temperaturi i zatim obezbojava 7% rastvorom sirćetne kiseline.

### 7.5.4. Kazeinolitički esej

Proteolitička aktivnost prečišćenog aktinidina i aktivnost ekstrakata kivija je kvantifikovana enzimskim esejom sa kazeinom (Sigma-Aldrich) kao supstratom.<sup>176</sup>

Za izvođenje eseja se pripremi sledeća reakciona smesa:

Rastvori	Zampremina ( $\mu\text{L}$ )
2 % rastvor kazeina u 0,1 M kalijum fosfatnom puferu pH 7,6	400
250 mM L-cisteina	40
1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7,0	120
250 mM EDTA	40
250 mM NaOH	40
$\text{dH}_2\text{O}$	80

Reakciona smeša se ekvilibriše na 37 °C, nakon čega se doda 80  $\mu\text{L}$  ispitivanog uzorka proteina i smeša inkubira 1 sat na 37 °C. Enzimska reakcija se prekida dodavanjem 1,2 mL 5 % trihlorsirćetne kiseline (TCA) i smeša inkubira još sat vremena na 37 °C. Nakon centrifugiranja ( $13\,000 \times g$ , 15 min) meri se  $A_{280}$  supernatanta, naspram slepe probe.

Slepa proba je pripremljena mešanjem prvo kazeina sa TCA i zatim naknadnim dodavanjem rastvora enzima u smešu. Jedna jedinica proteolitičke aktinosti (U) je definisana kao količina enzima koja daje 0,1 jedinicu  $A_{280}$  po minutu. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija iz tri nezavisna eksperimenta. Rezultati su prikazani kao relativna proteolitička aktivnost (%) u odnosu na kazeinolitičku aktivnost aktiviranog aktinidina (100 % aktivnosti) ili ekstrakta kivija sa najvećom proteolitičkom aktivnošću (100 % aktivnost).

#### 7.5.5. Proteolitička aktivnost enzimskih preparata prema mleku

U reakcionu smešu koja sadrži 580  $\mu\text{L}$  mleka sa 0.5 % masti i 17 mM EDTA je dodato 250  $\mu\text{L}$  (50  $\mu\text{g}$ ) enzimskog preparata (prečišćenog aktinidina, kivi ekstrakta ili komercijalnog preparata himozina poreklom iz želuca teleta). reakciona smeša je

inkubirana 1 h na 37 °C, nakon čega je dodat pufer za pripremu uzoraka za SDS-PAGE (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2.0 % SDS, 5 % 2-merkaptoetanol, 10 % glicerol, 0.02 % bromfenol plavo). Nakon inkubacije od 5 min na 95 °C, uzorci su elektroforetski analizirani. Isti postupak je ponovljen u drugoj seriji reakcija, osim što je u reakcionu smešu dodat 17 mM L-cistein pre dodatka enzimskih preparata.

## **7.6. Dobijanje poliklonskog zečijeg antiseruma na aktinidin**

Antitela na aktinidin su pripremljena subkutanom imunizacijom zečeva pomoću 0,5 mL emulzije (1:2, v:v) aktinidina (1 mg/mL) u kompletnom ili nekompletnom Freund-ovom adjuvansu u četvoro-nedeljnom režimu.<sup>177</sup> Krvarenje je izvedeno 50 dana nakon prve imunizacije i svake dve nedelje nakon toga. Titar antitela u serumu je određen u imunoblotu.

## **7.7. Elektrotransfer proteina sa poliakrilamidnog gela na NC ili PVDF membranu**

Za potrebe detekcije proteina u imunoblotu upotrebom specifičnih antitela, neki uzorci su posle razdvajanja elektroforezom (SDS-PAGE) transferovani sa gela na nitroceluloznu membranu.<sup>178</sup>

Polu-suvi transfer proteina nakon SDS-PAGE elektroforeze na nitroceluloznu membranu se vrši pod dejstvom električne struje jačine 2 mA/cm<sup>2</sup> gela u sendviču od 3 sloja kvantitativnog filter papira odgovarajućih dimenzija. Nitroceluloza se postavlja prema pozitivnoj elektrodi. Polu-suvi uslovi podrazumevaju da sendvič mora dobro da bude oceden od pufera za blot. Elektrotransfer traje 40 min.

Pufer za polu-suvi transfer:

TRIS	2,900 g
Glicin	1,450 g
SDS	0,185 g
Metanol	100 mL
destilovana voda do	500 mL

Vizualizacija proteina na membrani postiže se petominutnim bojenjem u 0.2 % rastvoru Ponceau-S u 5 % sirćetnoj kiselinu uz naknadno ispiranje viška boje destilovanom vodom.

Za potrebe sekvenciranja proteina izvodi se transfer sa gela na PVDF membranu na isti način kao i za nitroceluloznu membranu. Proteini se nakon transfera vizuelizuju bojenjem sa 0.1 % CBB-om (Serva) u 50 % metanolom i zatim osuši na vazduhu.

## 7.8. Detekcija proteina u imunoblotu

### 7.8.1. Opšti protokol

Potrebni puferi:

1. Trisom puferisani fiziološki rastvor (TBS): 30 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.6.

TRIS	3.63 g
NaCl	9 g
destilovana voda	1 L

2. tTBS: 0,1 % Tween 20 u TBS-u.

3. Rastvor za blokiranje: 5 % odmašćeno mleko u tTBS-u.

4. Rastvor za razblaživanje antitela: 0.1 % rastvor odmašćenog mleka u tTBS-u.

5. Pufer za AP: 100 mM TRIS, pH 9,6, 50 mM MgCl<sub>2</sub>.

TRIS	1,21 g
MgCl <sub>2</sub> ×5H <sub>2</sub> O	10 mg
destilovana voda	100 mL

\* pH podesiti 3M NaOH.

Priprema supstrata:

Supstrat 1		Supstrat 2	
BCIP	50 mg	NBT	100 mg
pufer za AP	20 mL	pufer za AP	300 mL

Smeša supstrata se priprema neposredno pred upotrebu. Pomeša se 1 zapremina supstrata 1 sa 9 zapremina supstrata 2 i procedi. Produkt ima plavo-ljubičastu boju.

Protokol:

- Obezbojavanje NC membrane u tTBS, 10 min.
- Blokiranje membrane je u 5 % odmašćenom mleku (u tTBS-u), 1 h na ST uz mešanje.
- Ispiranje, tTBS 3 × 10 min.

- Inkubiranje sa prethodno optimizovanom količinom primarnog antitela, 2-4 h na ST uz mešanje.
- Ispiranje, tTBS 3 × 10 min.
- Inkubiranje sa sekundarnim antitelom, 1 h na ST uz mešanje.
- Ispiranje, tTBS 3 × 10 min.
- Inkubiranje sa tercijarnim antitelom obeleženim alkalnom fosfatazom, 1h na ST uz mešanje.
- Ispiranje, tTBS 3 × 10 min.
- Ispiranje, TBS 1 × 10 min.
- Detekcija: BCIP/NBT (precipitirajući supstrat alkalne fosfataze).

### 7.8.2. Detekcija aktinidina poliklonskim anti-Act d 1 zečijim antiserumom

Nakon elektrotransfera, immunoblot je razvijan prema opštem protokolu uz upotrebu sledećih antitela:

Primarna antitela: Poliklonska zečija anti-Act d 1 IgG (2h na ST uz mešanje, razblaženje 1: 20 000, v:v u tTBS puferu sa 0.1 % odmašćenim mlekom)

Sekundarna antitela: kozija anti-zečija IgG antitela (Sigma-Aldrich) (1h na ST uz mešanje, razblaženje 1: 20 000, v:v u tTBS puferu sa 0.1 % odmašćenim mlekom)

Tercijarna antitela: zečija anti-kozija IgG antitela obeležena alkalnom fosfatazom (Sigma-Aldrich) (1h na ST uz mešanje, razblaženje 1: 30 000, v:v, u tTBS puferu sa 0.1 % odmašćenim mlekom).

### 7.8.3. Detekcija aktinidina vezivanjem IgE iz seruma pacijenata

Nakon elektrotransfera, immunoblot je razvijan prema opštem protokolu uz upotrebu sledećih antitela:

Primarna antitela: pojedinačni serumi pacijenata alergičnih na kivi (4h na ST uz mešanje, razblaženje 1: 2.5, v:v u tTBS puferu sa 0.1 % odmašćenim mlekom)

Sekundarna antitela: kozija anti-humana IgG antitela (Sigma-Aldrich) (1h na ST uz mešanje, razblaženje 1: 100 000, v:v, u tTBS puferu sa 0.1 % odmašćenim mlekom)

Tercijarna antitela: zečija anti-kozija IgG antitela obeležena alkalnom fosfatazom (Sigma-Aldrich) (1h na ST uz mešanje, razblaženje 1: 30 000, v:v, u tTBS puferu sa 0.1 % odmašćenim mlekom)

## **7.9. Kožne probe**

Kožne probe su rađene na dobrovoljcima sa prethodnom kliničkom istorijom alergije na kivi. Pacijentima je dezinfikovana koža unutrašnjeg dela podlaktice i zatim naneta po kap 3 različita razblaženja termalno inhibiranog i aktiviranog aktinidina (5, 50 i 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  u rastvoru PBS pufer/glicerol, 1:2 v:v). Kao pozitivna kontrola naneta je kap histamin-fosfata (10  $\text{mg mL}^{-1}$ ), a kao negativna- kap fiziološkog rastvora (0.9 % rastvor NaCl). Nakon toga, koža na mestu nanošenja je blago probodena lancetom i posle 20 minuta izmeren je prečnik nastalog otoka. Pozitivnom reakcijom smatra se pojava otoka čiji je prečnik za više od 3 mm veći od onog koji nastaje na mestu nanošenja negativne kontrole.

## **7.10. Test aktivacije bazofila**

Za test aktivacije bazofila su korišćeni alikvoti od 100  $\mu\text{L}$  heparinizirane pune krvi pacijenta sa prethodnom kliničkom istorijom alergije na kivi. Uzorak krvi je stimulisan serijskim razblaženjem koncentracija prečišćenog aktinidina u rasponu od 0.000125 do 12.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Nestimulisane ćelije i ćelije stimulisane sa anti-humanim IgE su služile kao negativna, tj. pozitivna kontrola. Uzorci su inkubirani 20 min na 37 °C. Nakon toga 5  $\mu\text{L}$  FITC-konjugovanih anti CD63 i 5  $\mu\text{L}$  fikoeritrin-konjugovanih anti-CD203c antitela (Immunotech, Marseille, France) je dodato u svaki uzorak i uzorci su zatim inkubirani 20



min na 37 °C. Nakon lize eritrocita i centrifugiranja (400 g, 5 min) merenja su rađena na protočnom citometru (FACS Calibur, BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

## **7.11. Raketna imunoelektroforeza**

Raketna imunoelektroforeza je rađena po Laurelijevoj metodi.<sup>179</sup> Pripremi se 1% rastvor tečne agaroze u 50 mM natrijum barbituratnom puferu, pH 8.6, i zatim sačeka da se rastvor ohladi do 55 °C. U agarozni rastvor se zatim doda zečiji antiserum protiv Act d 1 do finalne koncentracije od 6.5 %.

Pre nego što agarozu očvrsne, pripremljeni rastvor se razlije preko čiste staklene pločice dimenzija 11×5 cm<sup>2</sup>. Neophodno je koristiti sasvim čiste pločice i raditi u urkavicama, jer otisci prstiju sprečavaju dobro prijanjanje gela za pločicu. Pre nalivanja gela pločica se postavi na sasvim ravnu podlogu, da bi dobijeni gel imao ravnomernu debljinu.

Nakon polimerizacije agaroze (3-5 minuta), na gelu se izbuše bunari prečnika 1.5 mm. Pločica se stavi u kadu za imunoelektroforezu. Kao katodni i anodni rastvor se korsiti 50 mM barituratni puffer, pH 8.6. Voltaža se podesi na vrednost 12 V po cm gela i zatim se pažljivo nanese po 6 µl uzoraka u svaki od bunara. Uzorci se nanose pod naponom da bi se sprečila difuzija. Elektroforeza se pušta tokom 16 h.

Nakon završene elektroforeze pločica sa gelom se potopi u mlak fiziološki rastvor (0.9 % NaCl) da bi se uklonila neizreagovana antitela. Nakon nekoliko izmena fizioločkog rastvora, gel se ispira u destilovanoj vodi i presuje između filter papira. Ispresovani gel se ostavi na vazduhu dok se potpuno ne osuči, ili se osuši fenom. Na kraju, gel se boji 5 minuta u 0.5 % CBB-u i zatim obezbojava u 7 % sirčetnoj kiselini.

## **7.12. Testovi digestije Act d 1 u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta**

Uzorci aktivnog i aktinidina inhibiranog dodatkom E-64 inhibitora su podvrgnuti testovima digestije u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta. Kao pozitivna kontrola u svim testovima je korišćen rastvor BSA (1 mg mL<sup>-1</sup>), dok su uzorci aktivnog i

inhibiranog aktinidina inkubiranih u SGF, a zatim i u SIF bez dodatka proteolitičkih enzimi (pepsina ili tripsina) služili kao kontrola stabilnosti aktinidina u reakcionim uslovima. Sakupljeni alikvoti su nakon digestije analizirani SDS-PAG elektroforezom, zimogramom, masenom spektroskopijom i raketnom imunoelektroforezom. Sve digestije su ponovljene dva puta, u nezavisnim ekperimentima.

#### 7.12.1. Digestije Act d 1 u simuliranom želudačnom soku

U 225  $\mu\text{L}$  ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) prečišćenog aktinidina dodata je hlorovodonična kiselina (HCl) do finalne pH vrednosti rastvora od 2.0. Pepsin (0.01 mg, P7012, Sigma-Aldrich), prethodno rastvoren u 0.7 % HCl, je dodat do finalne koncentracije od 1 % (w/v) reakciona smesa je inkubirana 2 h na 37 °C uz konstantno mešanje. Alikvoti su uzimani nakon 0, 15, 30, 60 i 120 minuta od dodatka pepsin. Digestija je zaustavljena inaktivacijom pepsin podizanjem pH vrednosti na 8.0 dodatkom 2M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  do finalne koncentracije od 2 % (w/v).

#### 7.12.2. Digestije Act d 1 u simuliranom crevnom soku

Uzorci aktiviranog aktinidina su nakon pepsinske digestije dijalizovani preko noći naspram 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pufera, pH 8.2. Tripsin (0.02 mg, T-8642, Sigma-Aldrich) je dodat do finalne koncentracije od 2 % (w/v). Reakciona smesa je inkubirana 2 h na 37 °C. Alikvoti reakcione smese su uzimani nakon 0, 15, 30, 60, i 120 min.

### 7.13. Berridge-ov test koagulacije mleka

Vreme potrebno da enzimski preparati koagulišu mleko mereno je prema Berridge-ovoj metodi.<sup>180</sup> U reakcionu smešu koja sadrži 1 mL delimično obranog i pasterizovanog kravljeg mleka (sa procentom mlečne masti 0.5 %, 1.5 %, 2.8 % ili 3.8 %) dodato je 100  $\mu\text{L}$  kivi ekstrakta, prečišćenog aktinidina ( $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ), ili himozina poreklom iz želuca teleta ( $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ , Sigma- Aldrich, St Louis, SAD). Izmerena je pH vrednost reakcione smeše i, po potrebi, podešena na 6.5 dodatkom 0.1 M NaOH ili HCl. Smeša je inkubirana

na 37 °C i izmereno je vreme koje prođe do pojave prvih čvrstih čestica usled koagulacije mleka. Slepa proba se sastojala od mleka kojem je dodato 100 µL odgovarajućeg pufera. Jedna jedinica koagulacione aktivnosti je definisana kao količina (mg) proteinskog preparata potrebna za koagulaciju 1 mL mleka za 1 minut na 37 °C.

## **7.14. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) aktinidina**

Kalorimetrijske analize aktivnog aktinidina su rađene na MicroCal MC-2 kalorimetru (Micro Cal Inc., Northampton MA, USA), uz upotrebu standardnog softverskog DAPaketa za prikupljanje podataka i Origin softvera za analizu podataka. Ovom metodom su procenjeni sledeći termodinamički parametri: temperature tranzicionog maksimuma ( $T_m$ ), kalorimetrijska entalpija ( $\Delta H_{cal}$ ), i van't Hofova entalpija ( $\Delta H_{VH}$ ). Skeniran je temperaturni opseg između 20-90 °C pri brzini skeniranja od 90 °C h<sup>-1</sup>. U cilju provere reverzibilnosti denaturacionog procesa, uzorci su ohlađeni a zatim ponovo zagrevani pri istoj brzini. Referentni spektar je dobijen merenjem pufera u kom je rastvoren aktinidin i zatim oduzet od endoterme uzorka. Iz proteinskih rastvora su uklonjeni mehurovi laganim mešanjem pre nanonešenja u ćeliju kalorimetra. Za sve eksperimente je korišćena koncentracija aktinidina od 0.042 µM u 10 mM kalijum-fosfatnom puferu, pH 6.5 sa 26 mM L-cisteinom i 1 mM EDTA.

## **7.15. Cirkularni dihroizam (CD)**

Uzorci aktivnog i aktinidina inhibiranog E-64 inhibitorom su dijalizovani tokom noći naspram 10 mM natrijum fosfatnog pufera, pH 6.5. Koncentracija svih merenih uzoraka je iznosila 1 mg mL<sup>-1</sup>. CD spektri su zabeleženi na J-815 spektrometru (Jasco Corporation, Tokyo, Japan).

CD spektri u dalekom ultravioletnom spektru su obuhvatali spektralnu oblast od 185 - 250 nm i načinjeni su u kiveti širine 0.001 cm i na 25 °C. Podaci su prikupljeni u interval

od 0.1 nm, pri brzini od 100nm / min is a osetljivošću od  $\pm 200$  mdeg. Za merenja u bliskom delu ultravioletnog spectra (260 - 320 nm) korišćena je kiveta širine 0.1 cm podaci su prikupljani u interval od 1 nm pri brzini od 20 nm/ min i osteljivošću od  $\pm 200$  mdeg.

Svi spektri su mereni sa četiri akumulacije, nakon čega je od spektra uzorka oduziman referentni spektar pufera (10 mM natrijum fosfatni pufer, pH 6.5). Grafici su predstavljeni u jedinicama srednje vrednosti eliptičnosti po aminokiselinskom ostatku ( $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1} \text{residue}^{-1}$ ).

## 7.16. Fluorimetrija

Uzorci aktivnog i aktinidina inhibiranog E-64 inhibitorom su dijalizovani tokom noći naspram 10 mM natrijum fosfatnog pufera, pH 6.5. Koncentracija svih merenih uzoraka je iznosila 50  $\mu\text{M}$ . Uzorcima je dodat ANS do finalne koncentracije od 100  $\mu\text{M}$  i nakon inkubacije od 30 min umraku izmeren je spektar u opsegu od 400- 600 nm sa ekscitacijom na 350 nm. Svi spektri su mereni u triplicatu i od spektara uzoraka je oduziman referentni spektar nevezanog ANS-a pufera (100  $\mu\text{M}$  ANS u 10 mM natrijum fosfatnom puferu, pH 6.5). Fluorescentni spektri su zabeleženi na HORIBA Scientific Fluoromax-4 spektrofluorometru (Horiba, Kjoto, Japan).

## 7.17. Masena spektrometrija

### 7.17.1. Peptidno mapiranje aktivnog i inhibiranog aktinidina

Proteinski uzorak prečišćenog aktinidina je nakon bojenja sa CBB-om na SDS-PAGE gelu pokazao prisustvo dve trake. Obe proteinske trake su isečene iz gela, obezbojene i digestovane preko noći sa tripsinom iz goveđeg pankreasa po protokolu *Shevchenko i Shevchenko*.<sup>181</sup> Za ESI FT-ICR masenu analizu fragmenti nakon tripsinske digestije su rastvoreni u 3:1:0.04 (v/v/v) smesi vode: acetonitrila: sirčetne kiseline i anlaizirani na ApexQe instrumentu (Bruker-Daltonics). Maseni spektri su šaržno-dekonvulisani i

izmereno monoizotopni pikovi su poređeni sa masama potencijalnih fragmenata nakon tripsinske digestije aktinidinove sekvence UniProtKB A5HII1.

### 7.17. 2. Određivanje molekulske mase aktinidina

Molekulska masa prečišćenog aktinidina određena je matriks asistiranom desorpcionom/apsorpcionom masenom spektrometrijom (MALDI TOF- MS) na Reflex III (Bruker-Daltonik, Bremen) u pozitivnom jonskom modalitetu. Protein je rastvoren u vodi u koncentraciju od  $5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  i zatim dalje razblažen u odnosu 1:60 sa sveže pripremljenim rastvorom matriksa koji se sastojao od zasićene 3,5-di-metoksi-4-hidroksicinaminske kiseline (sinapička kiselina, SA; Aldrich) u 2:1 smeši 0.1 % trifluorsirćetne kiseline/acetonitril. Alikvoti od  $0.5 \mu\text{L}$  su postavljeni na držač uzoraka i analizirani odmah nakon sušenja strujanjem vazduha.

### 7.17.3. Procena strukturnog integriteta aktinidina nakon tretmana digestije

Strukturni integritet uzoraka aktinidina nakon 0 i 120 min digestije pepsinom, kao i nakon 120 min digestije tripsinom je analiziran ESI-TOF spektrometrom (G1969A, Agilent Technology, Santa Clara, CA, United States) u pozitivnom jonskom modus i kapilarnom voltažom od 4 kV i naponom fragmentora od 150 V na  $350 \text{ }^\circ\text{C}$ . Opseg skeniranja je podešen na 400 do 3000 *m/z*. "Agilent MassHunter Workstation" softver je korišćen za prikupljanje podataka, dok je Analyst QS upotrebljen za analizu i procesovanje podataka.

## 7.18. N-terminalno sekvenciranje

U cilju N-terminalnog sekvenciranja, proteini su nakon SDS-PAG prebačeni na PVDF membranu. Membrana je nakon elektrotransfera isprana destilovanom vodom i proteini su vizuelizirani bojenjem sa 0.1 % CBB-om u 50 % metanolu. Proteinske trake su isečene sa membrane i mikrosekvencirane upotrebom Procise proteinskog sekvencatora koji je povezan sa PTH aminokiselinskim analizatorom. (PE Biosystems, Weiterstadt, Germany).

## 8. Literatura

1. Wjst, M. Introduction of oral vitamin D supplementation and the rise of the allergy pandemic. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 2009, 5:8.
2. Shinohara, M., Saito, H., Matsumoto, K. Dramatic Increase in the Prevalence of Allergic Sensitization in Japanese Adults Born After the 1950s. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 113(2): 307.
3. Cianferoni, A., Spergel, J.M. Food Allergy: Review, Classification and Diagnosis. *Allergology International*, 2009, 58 (4): 457-66.
4. Sampson, H.A. Food allergy. Part 2: diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol*, 1999,103:981-9.
5. Bublin, M., Pfister, M., Radauer, C., Oberhuber, C., Bulley, S., DeWitt, M., et al. Component-resolved diagnosis of kiwifruit allergy with purified natural and recombinant kiwifruit allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 2010,125:687-94.
6. Astwood, J.D., Leach, J.N., Fuchs, R.L. (1996). Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat Biotechnol*, 1996, 14: 1269–1273.
7. Boyano-Martinez, T., Garcia-Ara, C., Pedrosa, M., Diaz-Pena, J.M, Quirce, S. Accidental allergic reactions in children allergic to cow's milk proteins. *J Allergy Clin Immunol*, 2009,123(4):883–888.
8. Valenta, R. The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2: 446-453.
9. Deinhofer, K., Sevcik, H., Balic, N., Harwanegg, C. Hiller, R., Rumpold, H. et al. Microarrayed allergens for IgE profiling. *Methods*, 2004, 32: 249–254.
10. Lucas, J.S., Grimshaw, K.E., Collins, K., Warner, J.O., Hourihane, J.O. Kiwi fruit is a significant allergen and is associated with differing patterns of reactivity in children and adults. *Clin Exp Allergy*, 2004, 34(7):1115-21.

11. Mills, E.N., Sancho, A.I., Rigby, N.M., Jenkins, J.A., Mackie, A.R. Impact of food processing on the structural and allergenic properties of food allergens. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53(8):963-9.
12. Wickham, M., Faulks, R., Mills, C. In vitro digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. *Mol Nutr Food Res.*, 2009, 53(8): 952-958.
13. Fine, A.J. Hypersensitivity reaction to kiwi fruit (Chinese gooseberry, *Actinidia chinensis*). *J Allergy Clin Immunol*, 1981, 8:235.
14. Mattila, L., Kilpeläinen, M., Terho, E.O., Koskenvuo, M., Helenius, H., Kalimo, K. Food hypersensitivity among Finnish university students: association with atopic diseases. *Clin Exp Allergy*, 2003, 33(5):600-6.
15. Eriksson, N.E., Werner, S., Foucard, T., Moller, C., Berg, T., Kiviloog, J. et al. Self-reported hypersensitivity to exotic fruit in birch pollen-allergic patients. *Allergology International*, 2003, 52: 199–206.
16. Rancé, F., Grandmottet, X., Grandjean, H. Prevalence and main characteristics of schoolchildren diagnosed with food allergies in France. *Clin Exp Allergy*. 2005, 35(2):167-72.
17. Praekelt, U.M., McKee, R.A., Smith, H. Molecular analysis of actinidin, the cysteine proteinase of *Actinidia chinensis*. *Plant Molecular Biology*, 1988, 10:193-202.
18. Lucas, J.S.A, Nieuwenhuizenw, N.J., Atkinsonw, R.G., MacRaew, E.A., Cochrane S.A, Warner. J.O., Hourihane. J.O'B. Kiwifruit allergy: actinidin is not a major allergen in the United Kingdom. *Clinical and Experimental Allergy*, 2007, 37:1340–1348.
19. Paul, W., Amiss, J., Try, R., Praekelt, U., Scott, R., Smith, H. Correct processing of the kiwifruit protease actinidin in transgenic tobacco requires the presence of the C-terminal propeptides. *Plant Physiol*, 1995, 108(1):261-8.
20. Rzychon, M., Chmiel, D., Stec-Niemczyk, J. Modes of inhibition of cysteine proteases. *Act Biochimica polonica*, 2004, 51 (4): 861–873.

21. Grudkowska, M., Zagdańska, B. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica*, 2004, 51(3): 609–624.
22. Otto, H.H., Schirmeister, T. Cysteine Proteases and Their Inhibitors. *Chem Rev*, 1997, 97: 133-171.
23. Lewis, D., Luh, B. Development and distribution of actinidin in kiwifruit (*Actinidia chinensis*) and its partial characterisation. *J Food Biochem*, 1987, 12: 109.
24. Katsaros, G.I., Katapodis, P., Taoukis, P. Modeling the effect of temperature and high hydrostatic pressure on the proteolytic activity of kiwi fruit juice. *Journal of Food Engineering*, 2009, 94(1): 40-45.
25. Katsaros, G.I., Tavantzis, G., Taoukis, P.S. Production of novel dairy products using actinidin and high pressure as enzyme activity regulator. *Innovative Food Science and Engineering Technologies*, 2010, 11: 47-51.
26. Saha, B.C., Hayashi, K. Debittering of protein hydrolysates. *Biotechnology Advances*, 2001, 19: 355-370.
27. Valenta, R., Kraft, D. From allergen structure to new forms of allergen-specific immunotherapy. *Current Opinion in Immunology*, 2002, 14:718-727.
28. Romagnani, S. The role of lymphocytes in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, 105:399-408.
29. Romagnani, S. Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 113:395-400.
30. Yazdanbakhah, M., Kremsner, P.G., van Ree, R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science*, 2002, 296:490-4.
31. Sicherer, S.H., Sampson, H.A. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Annu Rev Med*, 2009, 60:261-77.
32. Fraser, O., Sumar, S., Jones, M., Sumar, N. Mechanisms in adverse reactions to foods: a review, *Nutrition & Food Science*, 2001, 31(4): 170 – 178.



33. Sicherer, S.H., Noone, S.A., Munoz-Furlong, A. The impact of childhood food allergy on quality of life. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2001, 87(6):461–464.
34. Branum, A.M., Lukacs, S.L. Food allergy among US children: trends in prevalence and hospitalizations. *NCHS data brief*, 2008, 10:1–8.
35. Chehade, M., Mayer, L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 115:3-12.
36. Macpherson, A.J., Harris, N.L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(6): 478–485.
37. Mowat, A.M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3:331-41.
38. Izcue, A., Coombes, J. and Powrie, F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annual Review of Immunology*, 2009, 27: 313-338.
39. Sicherer, S.H., Munoz- Furlong, A., Burks, A.W., Sampson, H.A. Prevalence of peanut and tree nut allergy in United States of America. *J Allergy and Clin Immunol*, 1999, 103: 559-62.
40. Husby, S., Jensenius, J.C., Svehag, S.E. Passage of undegraded dietary antigen into the blood of healthy adults. Further characterization of the kinetics of uptake and the size distribution of the antigen. *Scand J Immunol*, 1986, 24(4): 447–455.
41. Faria, A.M., Weiner, H.L. Oral tolerance and TGF- $\beta$ -producing cells. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2006, 5(3):179–190.
42. Sampson, H.A. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 113(5): 805–819.
43. Perrier, C., Corthésy, B. Gut permeability and food allergies. *Clinical & Experimental Allergy*, 2011, 41(1): 20-28.
44. Heyman, M. Symposium on dietary influences on mucosal immunity. How dietary antigens access the mucosal immune system. *Proc Nutr Soc*, 2001, 60:419-26.

45. Fernandez-Rivas, M., Bolhaar, S., Gonzalez-Mancebo, E. *et al.* Apple allergy across Europe: how allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 118:481-8.
46. Bohle, B. The impact of pollen-related food allergens on pollen allergy. *Allergy*, 2007, 62(1): 3–10.
47. Jenkins, J.A., Griffiths-Jones, S., Shewry, P.R., *et al.* Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens: An *in silico* analysis. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 115:163–70.
48. Gavrovic-Jankulovic, M., Cirkovic, T., Burazer, L., Vuckovic, O., Jankov, R.M. IgE cross reactivity between meadow fescue pollen and kiwi fruit in patients' sera with sensitivity to both extracts. *J Investl Allergol Clin Immunol*, 2002, 12: 279-286.
49. Strid, J., Hourihane, J., Kimber, I., Callard, R., Strobel, S. Epicutaneous exposure to peanut protein prevents oral tolerance and enhances allergic sensitization. *Clin Exp Allergy*, 2005, 35(6):757–766.
50. Sicherer, S.H., Furlong, T.J., Maes, H.H., Desnick, R.J., Sampson, H.A., Gelb, B.D. Genetics of peanut allergy: a twin study. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, 106:53-6.
51. Howell, W.M., Turner, S.J., Hourihane, J.O, *et al.* HLA class II DRB1, DQB1 and DPB1 genotypic associations with pea-nut allergy: Evidence from a family-based and case-control study. *Clin Exp Allergy*, 1998, 28:156–62.
52. Eigenmann, P.A., Sampson, H.A. Interpreting skin prick tests in the evaluation of food allergy in children. *Pediatr Allergy Immunol*, 1998, 9:186-91.
53. Tariq, S.M., Matthews, S.M., Hakim, E.A., Arshad, S.H. Egg allergy in infancy predicts respiratory allergic disease by 4 years of age. *Pediatr Allergy Immunol*, 2000, 11:162–7.
54. Sicherer, S.H., Sampson, H.A. 9. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 117: S470-5.
55. Radauer, C., Breiteneder, H. Evolutionary biology of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 120:518-25.

56. Jenkins, J.A., Breiteneder, H., Mills, E.N. Evolutionary distance from human homologs reflects allergenicity of animal food proteins. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 120:1399-405.
57. Breiteneder, H., Ebner, C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, 106:27–36.
58. Sicherer, S.H., Sampson, H.A. Food Allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125: S116-25.
59. Bublin, M., Radauer, C., Knulst, A., Wagner, S., Scheiner, O. et al. Effects of gastrointestinal digestion and heating on the allergenicity of the kiwi allergens Act d 1, actinidin, and Act d 2, a thaumatin-like protein. *Mol Nutr Food Res*, 2008, 52: 1130 – 1139.
60. Shreffler, W.G., Castro, R.R., Kucuk, Z.Y., Charlop-Powers, Z., Grishina, G., Yoo, S., et al. The major glycoprotein allergen from *Arachis hypogaea*, Ara h 1, is a ligand of dendritic cell-specific ICAM-grabbing nonintegrin and acts as a Th2 adjuvant in vitro. *J Immunol*, 2006, 177:3677-85.
61. Commins, S.P., Satinover, S.M., Hosen, J., Mozena, J., Borish, L., Lewis, B.D., et al. Delayed anaphylaxis, angioedema, or urticaria after consumption of red meat in patients with IgE antibodies specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 123:426-33.
62. Fu, T.J. Digestion stability as a criterion for protein allergenicity assessment. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 964: 99-110.
63. Alcocer, M.J.C., Murtagh G.J., Bailey K., Dumoulin M., Meseguer A.S., Parker M.J., Archer D.B. The disulphide mapping, folding and characterisation of recombinant Ber e 1, an allergenic protein, and SFA8, two sulphur-rich 2 S plant albumins. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 324: 165-175.
64. Moreno, F.J., Mellon, F.A., Wickham, M.S.J., Bottrill, A.R. Mills, E.N.C. Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. *Febs Journal*, 2005, 272: 341-352.
65. Brenna, O., Pompei, C., Ortolani, C., Pravettoni, V., Farioli, L., Pastorello, E.A. Technological processes to decrease the allergenicity of peach juice and nectar. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 493-497.

66. Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D., Amato, S., Falagiani, P. Analysis of the heat stability of lipid transfer protein from apple. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2003, 112: 1009-1011.
67. Pastorello, E.A., Farioli, L., Pravettoni, V., Ispano, M., Scibola, E., Trambaioli, C., et al. The maize major allergen, which is responsible for food-induced allergic reactions, is a lipid transfer protein. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, 106: 744-751.
68. Pastorello, E.A., Farioli, L., Pravettoni, V., Ortolani, C., Fortunato, D., Giuffrida, M.G., et al. Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2003, 111: 350-359.
69. Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D., Amato, S., van Ree R. A case of allergy to beer showing cross-reactivity between lipid transfer proteins. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2001, 87: 65-67.
70. Jegou, S., Douliez, J.P., Molle, D., Boivin, P., Marion, D. Evidence of the glycation and denaturation of LTP1 during the malting and brewing process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49: 4942-4949.
71. Urisu, A., Ando, H., Morita, Y., Wada, E., Yasaki, T., Yamada, K., et al. Allergenic activity of heated and ovomucoid-depleted egg white. *J Allergy Clin Immunol*, 1997, 100:171-176.
72. Yamada, K., Urisu, A., Kakami, M., Koyama, H., Tokuda, R., Wada, E., et al. IgE-binding activity to enzyme-digested ovomucoid distinguishes between patients with contact urticaria to egg with and without overt symptoms on ingestion. *Allergy*, 2000, 55:565-569.
73. Nowak-Wegrzyn, A., Bloom, K.A., Sicherer, S.H., Shreffler, W.G., Noone, S., Wanich, N., et al. Tolerance to extensively heated milk in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 122:342-7.
74. Lemon-Mule, H., Sampson, H.A., Sicherer, S.H., Shreffler, W.G., Noone, S., Nowak-Wegrzyn, A. Immunologic changes in children with egg allergy ingesting extensively heated egg. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 122:977-83.
75. Hamilton, R.G., Adkinson, N.F. In vitro assays for the diagnosis of IgE-mediated disorders. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 114:213-25.

76. Wide, L., Bennich, H., Johansson, S.G. Diagnosis of allergy by an *in vitro* test for allergen antibodies. *Lancet*, 1967, 2(7526):1105-1107.
77. Hill, D.J., Hosking, C.S., Reyes-Benito, L.V. Reducing the need for food allergen challenges in young children: a comparison of *in vitro* with *in vivo* tests. *Clin Exp Allergy*, 2001, 31:1031-5.
78. Winther, L., Arnved, J., Malling, H.J., Nolte, H., Mosbech, H. Side-effects of allergen-specific immunotherapy: a prospective multi-centre study. *Clin Exp Allergy*, 2006, 36: 254-260.
79. Nelson, H.S., Lahr, J., Rule, R., Bock, A., Leung, D. Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract. *J Allergy Clin Immunol*, 1997, 99:744-51.
80. Wilson, D.R., Lima, M.T., Durham, S.R. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: systematic review and metaanalysis. *Allergy*, 2005, 60:4-12.
81. Enrique, E., Pineda, F., Malek, T. et al. Sublingual immunotherapy for hazelnut food allergy: a randomized, doubleblind, placebo-controlled study with a standardized hazelnut extract. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 116:1073-9.
82. Thomas, W.R., Hales, B.J., Smith, W.A. Genetically engineered vaccines. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2005, 5: 197-203.
83. Larche, M. Peptide immunotherapy for allergic diseases. *Allergy*, 2007, 62: 325-331
84. Saxon, A., Zhu, D., Zhang, K., Allen, L.C., Kepley, C.L. Genetically engineered negative signaling molecules in the immunomodulation of allergic diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2004, 4: 563-568.
85. Spiegelberg, H.L., Horner, A.A., Takabayashi, K., Raz E. Allergen-immunostimulatory oligodeoxynucleotide conjugate: a novel allergoid for immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2002, 2: 547-551.
86. Jones, S.M., Pons, L., Roberts, J.L., Scurlock, A.M., Perry, T.T., Kulis, M., et al. Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 124:292-300.

87. Skripak, J.M., Nash, S.D., Rowley, H., Brereton, N.H., Oh, S., Hamilton, R.G., et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 122:1154-60.
88. Buchanan, A.D., Green, T.D., Jones, S.M., Scurlock, A.M., Christie, L., Althage, K.A., et al. Egg oral immunotherapy in nonanaphylactic children with egg allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 119:199-205.
89. van Ree, R. CREATE Partnership. The CREATE project: EU support for the improvement of allergen standardization in Europe. *Allergy*, 2004, 59(6): 571-574.
90. Chapman, M.D., Smith, A.M., Vailes, L.D., Arruda, L.K., Dhanaraj, V., Pomés, A. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2000, 106(3):409-18.
91. Ferguson, A.R., Wilson, E.H. Yichang and the Kiwifruit. *Arnoldia*, 1983, 43(4):24- 35.
92. Vietmeyer, N.D. The captivating kiwifruit. *National Geographic*, 1987, 171(5): 683-688.
93. Liang, C., Ferguson, A.R. The Botanical Nomenclature of the Kiwifruit and Related Taxa. *N Z J Botany*, 1986, 24: 183-184.
94. Bublin, M., Mari, A., Ebner, C., Knulst, A., Scheiner, O., Hoffmann-Sommergruber, K., et al. IgE sensitization profiles toward green and gold kiwifruits differ among patients allergic to kiwifruit from 3 European countries. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 114:1169-75.
95. Moller, M., Kayma, M., Vieluf, D., Paschke, A., Steinhart, H. Determination and characterization of cross-reacting allergens in latex, avocado, banana, and kiwi fruit. *Allergy*, 1998, 53: 289-96.
96. Florido Lopez, J.F., Quiralte Enriquez, J., Arias De Saavedra Alias, J.M., Saenz De San Pedro, B., Martin Casanez, E. An allergen from *Olea europaea* pollen (Ole e 7) is associated with plant-derived food anaphylaxis. *Allergy*, 2002, 57(71): 53-9.
97. Gall H., Kalveram K.J., Forck G., Sterry W. Kiwi fruit allergy: a new birch pollen-associated food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 1994, 94: 70-6.

98. Prestamo, G. Actinidin in kiwifruit cultivars. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1995, 200: 64-66.
99. Aleman, A., Sastre, J., Quirce, S., De Las Heras, M., Carnes, J., Fernandez-Caldas, E., et al. Allergy to kiwi: A double-blind, placebo-controlled food challenge study in patients from a birch-free area. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 113: 543-550.
100. Garcia, B.E., De La Cuesta, C.G., Santos, F., Feliu, X., Cordoba, H. A rare case of food allergy: monosensitivity to kiwi (*Actinidia chinensis*). *Allergol Immunopathol*, 1989, 17: 217-8.
101. Shimizu, T., Morikawa, A. Anaphylaxis to kiwi fruit in a 12-year-old boy. *J Asthma*, 1995, 32: 159-60.
102. Novembre, E., Bernardini, R., Bertini, G., Massai, G., Vierucci, A. Skin-prick-test-induced anaphylaxis. *Allergy*, 1995, 50: 511-3.
103. Ciardiello, M.A, Giangrieco, I., Tuppo, L., Tamburrini, M., Buccheri, M., Palazzo, P., et al. Influence of the natural ripening stage, cold storage, and ethylene treatment on the protein and IgE-binding profiles of green and gold kiwi fruit extracts. *J Agric Food Chem*, 2009, 57:1565-71.
104. Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Bateman, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: D343-D350.
105. Rawlings, N.D., Barrett, A.J. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J*, 1993, 290: 205–18.
106. Vierstra, R.D. The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci*, 2003, 8: 135–42.
107. Barrett, A.J. An Introduction to the Proteinases: In "Proteinase Inhibitors" (eds. Barrett, A., Salvesen, G.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1986.
108. Menard, R., Plouffe, C., Laflamme, P., Vernet, T., Tessier, D.C., Thomas, D.Y. et al. Modification of the electrostatic environment is tolerated in the oxyanion hole of the cysteine protease papain. *Biochemistry*, 1995, 34: 464–71.

109. Wiederanders, B. Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides. *Acta Biochim Polon*, 2003, 50: 691–713.
110. Majdinasab, M., Aminlari, L., Niakorari, M. Effect of actinidin on the solubility and SDS-PAGE pattern of soymilk proteins. *Journal of Food Biochemistry*, 2010, 34: 1172–1185.
111. Brocklehurst, K., Malthouse, J.P.G. Differences in the interactions of the catalytic groups of the active centres of actinidin and papain. *Biochem J*, 1981, 197: 739-746.
112. Pastorello, E.A., Conti, A., Pravettoni, V., Farioli, L., Rivolta, F., Ansaloni, R., et al. Identification of actinidin as the major allergen of kiwi fruit. *J Allergy Clin Immunol*, 1998, 101:531-7.
113. Carne, A., Moore, C.H. The amino acid sequence of the tryptic peptides from actinidin, a proteolytic enzyme from fruit of *Actinidia chinensis*. *J Biochem*, 1978, 173:73-83.
114. Fahlbusch, B., Rudeschko, O., Schumann, C., Steurich, F., Henzgen, M., Schlenvoigt, G., Jager, L. Further characterization of IgE-binding antigens in kiwi, with particular emphasis on glycoprotein allergens. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 1998, 8:325-32.
115. Arcus, A.C. Proteolytic enzyme of *Actinidia chinensis*. *Biochim Biophys Acta*. 1959, 33(1):242-4.
116. McDowall, M.A. Anionic proteinase from *Actinidia chinensis*. *Eur J Biochem*, 1970, 14:214–221.
117. Boland, M.J., Hardman, M.J. Kinetic studies on the thiol protease from *Actinidia chinensis*. *FEBS letters*, 1972, 27:282.
118. Boland, M. J., Hardman, M. J. The actinidin-catalyzed hydrolysis of N-D-benzyloxycarbonyl-L-lysine F- nitrophenyl ester. *Europ J Biochem*, 1973, 36: 575-582.
119. Baker, E.N. Structure of Actinidin: Details of the Polypeptide Chain Conformation and Active Site from an Electron Density Map at 2°8 A resolution. *J Mol Biol*, 1977, 115: 263-277.



120. Baker, E.N. Structure of actinidin, after refinement at 1.7 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 1980, 141(4): 441–484.
121. Podivinsky, E., Forster, R.L.S. and Gardner, R.C. Nucleotide sequence of actinidin, a kiwi fruit protease. *Nucl Acids Res*, 1989, 17: 8363.
122. Varughese, K.I., Su, Y., Cromwell, D., Hasnain, S., Xuong, N.H. Crystal structure of an actinidin E-64 complex. *Biochemistry*, 1992, 31: 5172-5176.
123. Nieuwenhuizen, N., Beuning, L., Sutherland, P., Sharma, N., Cooney, J., Bielecki, L. et al. Identification and characterisation of acidic and novel basic forms of actinidin, the highly abundant cysteine protease from kiwifruit. *Functional Plant Biology*, 2007, 34(10): 946–961.
124. Malone, L., Todd, J., Burgess, E., Philip, B. Effects of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) cysteine protease on growth and survival of *Spodoptera litura* larvae (*Lepidoptera: Noctuidae*) fed with control or transgenic avidin-expressing tobacco. *NZ J Crop Horticul Sci*, 2005, 33: 99–105.
125. Yogavel, M., Nithya, N., Suzuki, A., Sugiyama, Y., Yamane, T., et al. Structural analysis of actinidin and a comparison of cadmium and sulfur anomalous signals from actinidin crystals measured using in-house copper and chromium-anode X-ray sources. *Acta Crys.*, 2010, D66: 1323–1333.
126. Tello-Solis, S.R., Valle-Guadarrama, M.E., Hernandez-Arana, A. Purification and circular dichroism studies of multiple forms of actinidin from *Actinidia chinensis* (kiwifruit). *Plant Science*, 1995, 106: 227-232.
127. Yamaguchi, T., Yamashita, Y., Takeda, I. and Kiso, H. Proteolytic enzymes in green asparagus, kiwifruit and miut: occurrence and partial characterization. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1982, 46 (8): 1983-1986.
128. Lewis, D., Luh, B. Application of actinidin from kiwifruit to meat tenderization and characterization of beef muscle protein hydrolysis. *Journal of Food Biochemistry*, 1988, 12:147-158.
129. Wilson, E.L., Burns, D.J.W. Kiwifruit Juice Processing Using Heat Treatment Techniques and Ultrafiltration. *Journal of Food Science*, 1983, 48(4): 1101–1105.

130. Yang, H., Lee, Y.C., Han, K.S., Singh, H., Yoon, M., Park, J.-H., Cho, C.-W., Cho, S. Green and gold kiwifruit peel ethanol extracts potentiate pentobarbital-induced sleep in mice via a GABAergic mechanism. *Food Chemistry*, 2013, 136, 160–163.
131. Lo Piero, A.R., Puglisi, I., Petrone, G.V. Characterization of the purified actinidin as a plant coagulant of bovine milk. *European Food Research and Technology*, 2011, 233, 517–524.
132. Saha, B.C., Hayashi, K. Debittering of protein hydrolysates. *Biotechnology Advances*, 2011, 19, 355-370.
133. Cheryan, M., Van Wyk, P.J., Olson, N.F., Richardson, T. Secondary Phase and Mechanism of Enzymic Milk Coagulation. *Journal of Dairy Science*, 1975, 58 (4), 477-481.
134. Lopes, A., Teixeira, G., Liberato, M.C., Pais, M.S., & Clemente, A. New vegetal sources for milk-clotting enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1998, 5, 63–68.
135. Cavalcanti, M.T.H., Teixeira, M.F.S., Lima Filho, J.L., Porto, A.L.F. Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardioopsis sp.* *Bioresource Technology*, 2004, 93, 29-35.
136. Katsaros, G.I., Tavantzis, G., Taoukis, P.S. Production of novel dairy products using actinidin and high pressure as enzyme activity regulator. *Innovative Food Science and Engineering Technologies*, 2010, 11, 47-51.
137. Roseiro, L.B., Barbosa, M., Mames, J., & Wilbey, A. Cheesemaking with vegetable coagulants – the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 2003, 56, 76-85.
138. Egitoa, A.S., Girardetc, J.M., Lagunaa, L.E., Poirsonc, C., Molle, D., Micloc, L., Humbertc, G., Gaillardc, J.L. Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k-casein. *International Dairy Journal*, 2007, 17, 816–825.
139. Bode, W., Huber, R. Structural basis of the endoproteinase — protein inhibitor interaction. *Biochim Biophys Acta.*, 2000, 1477: 241–52.

140. Guncar, G., Pungercic, G., Klemencic, I., Turk, V., Turk, D. Crystal structure of MHC class II-associated p41 Ii fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsins L and S. *EMBO J*, 1999, 18: 793–803.
141. Ljunggren, A., Redzyna, I., Alvarez-Fernandez, M., Abrahamson, M., Mort, J.S., Krupa, J.C., et al. Crystal structure of the parasite protease inhibitor chagasin in complex with a host target cysteine protease. *J Mol Biol*. 2007, 371(1):137-53.
142. Powers, J.C., Juliana L. Asgian, Ozlem D.E., James, K.E. Irreversible Inhibitors of Serine, Cysteine, and Threonine Proteases. *Chemical Reviews*, 2002, 102 (12): 4639-4750.
143. Matsumoto, K., Mizoue, K., Kitamura, K., Tse, W.C., Huber, C.P., Ishida, T. Structural Basis of Inhibition of Cysteine Proteases by E-64 and Its Derivatives. *Biopolymers (Peptide Science)*, 1999, 51: 99–107.
144. Schaschke, N., Assfalg-Machleidt, I., Lassleben, T., Sommerhoff, C. P., Moroder, L., Machleidt, W. Epoxysuccinyl peptide-derived affinity labels for cathepsin B. *FEBS Lett*, 2000, 482: 91.
145. Greenbaum, D., Medzihradszky, K. F., Burlingame, A., Bogyo, M. Epoxide electrophiles as activity-dependent cysteine protease profiling and discovery tools. *Chem Biol*, 2000, 7: 569.
146. Bogyo, M., Verhelst, S., Bellingard-Dubouchaud, V., Toba, S., Greenbaum, D. Selective targeting of lysosomal cysteine proteases with radiolabeled electrophilic substrate analogs, *Chem Biol*, 2000, 7: 27.
147. Inaba, T., Hirayama, Y., Fujinaga, N. Inhibition of cathepsin Bi by E-64, a thiol proteinase inhibitor and its derivatives. *Agric Biol Chem*, 1979, 43: 655.
148. Varughese, K. I., Ahmed, F. R., Carey, P. R., Hasnain, S., Huber, C. P., Storer, A. C. Crystal structure of a papain-E-64 complex. *Biochemistry*, 1989, 28: 1330.

149. Bihovsky, R., Powers, J. C., Kam, C. M., Walton, R., Loewi, R. C. J. Further evidence for the importance of free carboxylate in epoxysuccinate inhibitors of thiol proteases. *Enzyme Inhib*, 1993, 7: 15.
150. Meara, J. P., Rich, D. H. Mechanistic studies on the inactivation of papain by epoxysuccinyl inhibitors. *J Med Chem*, 1996, 39: 3357.
151. Simpson, R.J. *Purifying Proteins for Proteomics: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004.
152. Matagne, A., Joris, B., Frere, J.M. Anomalous behaviour of a protein during SDS/PAGE corrected by chemical modification of carboxylic groups. *Biochem J.*, 1991, 280: 553-556.
153. Gavrovic-Jankulovic, M., Cirkovic, T., Vuckovic, O., Atanaskovic-Markovic, M., Petersen, A., Gojgic, G., et al. Isolation and biochemical characterization of a thaumatin-like kiwi allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2002, 110:805-810.
154. Chen, L., Lucas, J.S., Hourihane, J.O., Lindemann, J., Taylor, S.L., Goodman, R.E. Evaluation of IgE binding to proteins of hardy (*Actinidia arguta*), gold (*Actinidia chinensis*) and green (*Actinidia deliciosa*) kiwifruits and processed hardy kiwifruit concentrate, using sera of individuals with food allergies to green kiwifruit. *Food and Chemical Toxicology*, 2006, 44: 1100-1107.
155. Kaur, L., Rutherford, S.M., Moughan, P.J., Drummond, L., Boland, M.J. Actinidin enhances gastric protein digestion as assessed by using an in vitro gastric digestion model. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 5068-5073.
156. Pitt-Rivers, R., Impiombato, F.S. The binding of sodium dodecyl sulphate to various proteins. *Biochem J*, 1968, 109(5):825–830.
157. Dunker, A.K., Kenyon, A.J. Mobility of sodium dodecyl sulphate – protein complexes. *Biochem J*, 1976, 153:191–197.
158. Therien, A.G., Grant, F.E., Deber, C.M. Interhelical hydrogen bonds in the CFTR membrane domain. *Nat Struct Biol*, 2001, 8:597–601.
159. Hames, B.D. (ed), *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*, 3rd ed, Oxford University Press, Oxford, New York, 1998.

160. Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V.G., Chen, G., Deber, C.M. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *PNAS*, 2009,106 (6): 1760-1765.
161. Chiou, S.H., Wu, S.H. Evaluation of commonly used electrophoretic methods for the analysis of proteins and peptides and their application to biotechnology. *Analytica Chimica Acta*, 1999, 383: 47-60.
162. Witzel, K., Shahzad, M., Matros, A., Mock, H.P., Muhling, K.H. Comparative evaluation of extraction methods for apoplastic proteins from maize leaves. *Plant methods*, 2011, 7, 48.
163. Valcu, C.M., Schlink, K. Efficient extraction of proteins from woody plant samples for two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*, 2006, 6, 4166-4175.
164. Herndl, A., Marzban, G., Kolarich, D., Hahn, R., Boscia, D., Hemmer, W., et al. Mapping of *Malus domestica* allergens by 2-D electrophoresis and IgE-reactivity. *Electrophoresis*, 2007, 28: 437-448.
165. Marzban, G., Herndl A., Pietrozotto S., Banerjee S., Obinger, C., Maghuly, F., et al. Conformational changes of Mal d 2, a thaumatin-like apple allergen, induced by food processing. *Food Chemistry*, 2009, 112: 803-811.
166. Runswick, S., Mitchell, T., Davies, P., Robinson, C., Garrod, D. Pollen proteolytic enzymes degrade tight junctions. *Respirol*, 2007, 12 (6): 834–842.
167. Bousquet, J., Heinzerling, L., Bachert, C., Papadopoulos, N.G., Bousquet, P.J., Burney, P.G. et al. Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy*, 2012, 67: 18–24.
168. Cavic, M., Grozdanovic, M., Bajic, A., Srdic-Rajic, T., Andjus, P.R., et al. Actinidin, a protease from kiwifruit, induces changes in morphology and adhesion of T84 intestinal epithelial cells. *Phytochemistry*, 2012, 77: 46-52.
169. Kappeler, S.R., van den Brink, H.J.M., Rahbek-Nielsen, H., Farah, Z., Puhan, Z., Hansen, E., Johansen, E. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochemical and Biophysical Research Communications*., 2006, 342, 647–654.

170. Oner, M.D., Akar, B. Separation of the proteolytic enzymes from fig latex and its utilization in Gaziantep cheese production. *Food Sci. Technol.*, 1993, 26, 318-321.
171. Rao, N.M. Cysteine protease inhibitors from banana (*Musa paradisiaca*). *Current Science*, 1989, 58, 1320- 1323.
172. Garnot, P., Rank, T.C., Olson, N.F. Influence of protein and fat contents of ultrafiltered milk on rheological properties of gels formed by chymosin. *Journal of Dairy Science*, 1982, 65, 2267-2273.
173. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
174. Blanus, M., Perovic, I., Popovic, M., Polovic, N., Burazer, L., Milovanovic, M. et al. Quantification of Art v 1 and Act c 1 being major allergens of mugwort pollen and kiwi fruit extracts in mass-units by ion-exchange HPLC-UV method. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 857: 188-194.
175. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
176. Latham, H., Shaw, E. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, USA, 1976, 45:469-75.
177. Harlow, E., Lane, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1998.
178. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology*, 1972, 24: 145-149.
179. Laurell, C.B. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.*, 1966, 15:45-52.
180. Berridge, N.J. An improved method of observing the clotting of milk containing rennin. *Journal of Dairy Research*, 1952, 19, 328-329.

181. Shevchenko, A., Shevchenko, A. Evaluation of the efficiency of in-gel digestion of proteins by peptide isotopic labeling and MALDI mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 2001, 296(2): 279-83.

## 9. Prilog A: Radovi koji čine deo disertacije

1. Grozdanovic, M., Popovic, M., Polovic, N., Burazer, L., Vuckovic, O., Atanaskovic-Markovic, M., Lindner, B., Petersen, A., Gavrovic-Jankulovic, M. (2012) Evaluation of IgE reactivity of active and thermally inactivated actinidin, a biomarker of kiwifruit allergy. *Food and Chemical Toxicology*, 50 (3–4) 1013-1018. (IF<sub>2011</sub> = 2.999)
2. Grozdanovic, M., Burazer, L., Gavrovic- Jankulovic, M. (2013). Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) extract shows potential as a low-cost and efficient milk-clotting agent. *International Dairy Journal*, DOI: 10.1016/j.idairyj.2013.03.001. (IF<sub>2011</sub> = 2.401)
3. Grozdanovic, M., Aleksic, I., Burazer, L., Andjelkovic, U., Petersen, A., Gavrovic-Jankulovic, M. (2013). Actinidin, a specific biomarker of kiwifruit allergy, exerts proteolytic activity upon treatment in the simulated gastrointestinal environment. *Nepublikovan materijal*.





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Food and Chemical Toxicology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox)

## Evaluation of IgE reactivity of active and thermally inactivated actinidin, a biomarker of kiwifruit allergy

Milica Grozdanovic<sup>a</sup>, Milica Popovic<sup>a</sup>, Natalija Polovic<sup>a</sup>, Lidija Burazer<sup>b</sup>, Olga Vuckovic<sup>b</sup>, Marina Atanaskovic-Markovic<sup>c</sup>, Buko Lindner<sup>d</sup>, Arnd Petersen<sup>e</sup>, Marija Gavrovic-Jankulovic<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 16, Belgrade 11000, Serbia

<sup>b</sup> Department of Allergy, Torlak Institute of Virology, Vaccines and Sera, Vojvode Stepe 458, Belgrade, Serbia

<sup>c</sup> Department of Allergology and Pulmonology, University Children's Hospital, Tirsova 10, Belgrade, Serbia

<sup>d</sup> Division of Immunochemistry, Research Center Borstel, Parkallee 4, Borstel, Germany

<sup>e</sup> Division of Clinical and Molecular Allergology, Research Center Borstel, Parkallee 22, Borstel, Germany

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 31 October 2011

Accepted 19 December 2011

Available online 28 December 2011

## Keywords:

Act d 1

Actinidin

Food allergy

Cysteine protease

IgE reactivity

## ABSTRACT

Actinidin, an abundant cysteine protease from kiwifruit, is a specific biomarker of isolated allergy to kiwifruit. This study evaluates the IgE-binding properties of biologically active and thermally inactivated actinidin. Employing two different activity assays (caseinolytic assay and zymogram with gelatin) we showed that actinidin obtained from kiwifruit extract under native conditions represents a mixture of inactive and active enzyme. The structural integrity of actinidin was confirmed by SDS–PAGE, Edman degradation, mass fingerprint and Western blot with polyclonal antibodies. Although it was capable of inducing positive skin prick test reactions, we failed to detect IgE reactivity of active actinidin in Western blot with patient sera. Thermally inactivated actinidin exhibited IgE reactivity both *in vivo* and *in vitro*, indicating that heat processed kiwifruit products may induce clinical reactivity. These findings imply that apart from the allergenic epitopes on its surface, actinidin also contains hidden epitopes inside the protein which become accessible to IgE upon thermal treatment.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The popularity of kiwifruit and the availability of new varieties on the international market imposed an increasing interest in examination of its influence on human health. Kiwifruit has become very popular in the human diet due to its pleasant taste, high content of vitamin C, and its low caloric value. Several investigations on possible health-promoting effects of kiwifruit have been reported (Jung et al., 2005; Rush et al., 2002). However, kiwifruit has become one of the most common causes of food allergies with a wide range of symptoms, including oral allergy syndrome, urticaria, and anaphylaxis (Lucas et al., 2004; Aleman et al., 2004; Bublin et al., 2004; Palacin et al., 2008). Two predominant kiwifruit cultivars available on the international market are green-fleshed cultivar *Actinidia deliciosa* cv. Hayward and yellow-fleshed cultivar *Actinidia chinensis* cv. Hort16A. These cultivars differ in taste but also in the composition of kiwifruit proteins (Bublin et al., 2004; Lucas et al., 2005). Eleven IgE-reactive molecules from kiwifruit have been reported and registered by the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee ([www.allergen.org](http://www.allergen.org)). Actinidin (Act d 1) is the most abundant protein

and the major allergen from green kiwifruit (Aleman et al., 2004; Bublin et al., 2004; Pastorelo et al., 1998). It is a kiwifruit-specific allergen since no cross-reactivity with birch or grass pollen has been observed (Pastorelo et al., 1996). Even though actinidin undergoes irreversible unfolding when heated under neutral pH conditions, it preserves *in vitro* IgE reactivity (Bublin et al., 2008).

Actinidin belongs to the class of plant thiol proteinases (EC 3.4.22.14) which are widespread in nature (Carne and Moore, 1978). A number of allergens belonging to the papain-like cysteine proteinases have been identified, including inhalant allergens such as the major dust mite allergen Der p 1 and also plant food allergens such as Ana c 2 (bromelain) from pineapple, Car p 1 (papain) from papaya, and a major allergen from soybean seed storage vacuoles Gly m 1 (Hauser et al., 2008). Actinidin is encoded as a pre-protein with an endoplasmic reticulum (ER)-targeting signal peptide and N- and C-terminal propeptides (NTPP, CTPP). This enzyme is synthesized as a zymogen and processed into an active form after secretion or sequestration in the cell (Nieuwenhuizen et al., 2007). Ten different actinidin mRNAs for acidic and basic protein isoforms were identified which encode mature proteins. Extremely high levels of an acidic actinidin protein were detected in *A. deliciosa* fruit, but this acidic protein appeared to be at a very low level in Hort16A, the most important commercial cultivar of *A. chinensis* (Bublin et al., 2004; Nieuwenhuizen et al., 2007).

\* Corresponding author. Tel.: +381 11 333 6661; fax: +381 11 2184 330.

E-mail address: [mgavrov@chem.bg.ac.rs](mailto:mgavrov@chem.bg.ac.rs) (M. Gavrovic-Jankulovic).

Food processing, particularly thermal processing, was observed to reduce the allergenicity of some foods, and is therefore considered as an alternative management for the allergenic risk of foods (Wal, 2003; Fiocchi et al., 2004). At the molecular level thermal processing induces progressive loss of tertiary and secondary protein structures and the appearance of disorganized structures that adopt an unfolded, random-coil conformation. However, a decrease or increase of allergenicity can be caused by protein unfolding, misfolding, and aggregation, as well as by chemical modifications occurring during food processing (Marzban et al., 2009).

Along with skin prick testing, another widespread screening tool in the field of allergy diagnostics is immunoblotting by which a patient can be profiled against multiple allergen markers simultaneously, allowing insight into the integrity and IgE-binding epitopes of allergens. Therefore, one and two-dimensional Western blotting is a frequently employed method for determination of the sensitization patterns of atopic persons (Weghofer et al., 2005). In addition, alterations in IgE-binding affinity to separated proteins under different analytical conditions and eventual post-translational modifications can be elaborated (Herndl et al., 2007).

Inherent properties of a specific source material, for instance the presence of proteolytic enzymes, necessitate optimization of the extraction procedure for the preparation of plant-derived food allergen extracts. Therefore, to inhibit actinidin activity, kiwifruit extracts used in scientific research are often prepared in the presence of a thiol protease inhibitor E64 (Pastorelo et al., 1998) or a protease inhibitor cocktail (Bublin et al., 2004; Chen et al., 2006; Nieuwenhuizen et al., 2007).

In this study a protocol employed for actinidin purification under native conditions, without addition of protease inhibitors, revealed the presence of a mixture of active and inactive enzyme in *A. deliciosa* kiwifruit extract. In order to assess the allergenic properties of the active enzyme isolated under native conditions and to determine the effect of thermal processing on the allergenicity of kiwifruit, the actinidin preparation was either fully activated by incubation in L-cysteine buffer or inactivated by thermal treatment. *In vitro* and *in vivo* IgE-binding properties of proteolytically active and thermally inactivated Act d 1 were evaluated in Western immunoblot and skin prick test.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Preparation of protein extract

Kiwifruit (*A. deliciosa* cv. Hayward) was purchased in a local store. The pulp (150 g) of the fresh fruit was homogenized in 300 mL of 100 mM sodium citrate buffer, pH 5.0. After extraction (2 h at 4 °C), the slurry was centrifuged (1000g, 5 min) and the obtained supernatant was extensively dialyzed against the extraction buffer. Protein concentration in the extract was 0.8 mg mL<sup>-1</sup> as determined by Bradford assay.

### 2.2. Actinidin purification

Actinidin (Act d 1) was purified from the kiwifruit extract (250 mL) which was subjected to ion-exchange chromatography on a DEAE-Sephadex A-50 column (145 mm × 27 mm) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), pre-equilibrated with 100 mM sodium citrate buffer, pH 5.0. The unbound protein fraction (300 mL, collected at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>) was concentrated by ultrafiltration, and dialyzed against 20 mM TRIS-HCl buffer, pH 8.0 for 48 h. The protein sample (125 mL) was applied on a SP-Sephadex C-50 ion-exchange column (125 mm × 15 mm) (Pharmacia-Biotech, Uppsala, Sweden) equilibrated in the dialysis buffer and the column was eluted by a pH step gradient ranging from pH 5 to pH 2.5 with eight column volumes (CVs). The employed flow rate was 0.8 mL min<sup>-1</sup>. Collected fractions (10 mL each) were analyzed by SDS-PAGE, and those containing actinidin were pooled and concentrated by ultrafiltration. About 20 mg of actinidin preparation (Act d 1) was isolated from 250 mL of the kiwifruit extract. The purity of the protein preparation was estimated to be >97% by SDS-PAGE and N-terminal amino acid sequencing.

### 2.3. Production of polyclonal antibodies

Purified Act d 1 was used for production of polyclonal antibodies. Two rabbits were immunized according to the protocol described by Harlow and Lane (1988). In brief, 0.25 mL Act d 1 (0.50 mg mL<sup>-1</sup>) was mixed with 0.25 mL FCA (Freund's complete adjuvant) for the first immunization. Every 30 days, for 6 months, the rabbits were boosted with a mixture of 0.25 mL of Act d 1 and 0.25 mL of incomplete Freund' adjuvant. Each rabbit was subcutaneously immunized with 0.50 mL of the emulsion. After 6 months, sera were collected and stored at -20 °C before use. The immunization protocol was approved by the Ethics Committee of the Torlak Institute of Virology, Vaccines and Sera.

### 2.4. 1-D and 2-D PAGE

SDS-PAGE analysis of the actinidin preparation was performed on 4% stacking gel and 14% resolving gel under reducing conditions (Bollag et al., 1996). Before migration, the actinidin preparation (20 µg) was incubated in sample buffer (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 0.1% (v/v) bromophenol blue, 14.4 mM 2-mercaptoethanol) in a ratio 4:1 (v/v) (60 min at 45 °C) and centrifuged (13,400g for 1 min). After electrophoresis, proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB-R250, Serva, Heidelberg, Germany).

In addition, the homogeneity of the actinidin preparation was analyzed by 2D-PAGE under reducing conditions. In brief, the sample (25 µg) was separated under native conditions by isoelectric focusing in 5% (w/v) polyacrylamide gel containing 2.4% (v/v) ampholytes (pH 3.5–10, Pharmacia). Following first dimension separation, the gel stripe containing actinidin was incubated in equilibration buffer (62.5 mM Tris-HCl, 5% 2-mercaptoethanol, 2.3% SDS, 10% glycerol) for 15 min and then run in the second dimension on SDS-PAGE (14%). Actinidin was visualized following staining with Coomassie Brilliant Blue.

### 2.5. Proteolytic activity assays

Proteolytic activity of the actinidin preparation was assessed by using a protease enzymatic assay with casein as a substrate, as previously described (Drapeau, 1976). In brief, a 2% casein solution was prepared in 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.6. A 400 µL aliquot of casein was added to 40 µL of 250 mM L-cysteine, 40 µL of 250 mM EDTA, 40 µL of 250 mM NaOH, 120 µL of 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0 and 80 µL of distilled water. The reaction mixture was equilibrated to 37 °C, after which 80 µL of enzyme preparation (1 mg mL<sup>-1</sup> of Act d 1) was added and the assay mixture was incubated for 1 h at 37 °C. The enzyme reaction was stopped by addition of 1.2 mL of 10% trichloroacetic acid (TCA) and the reaction mixture was incubated for an additional hour at 37 °C. Following centrifugation (13,000g for 15 min) absorption of the supernatant was measured at 280 nm against a blank. The blank was prepared by first mixing the enzyme with TCA and then adding the casein solution to the enzyme-TCA mixture. One unit of activity was determined as that amount of enzyme which releases acid soluble fragments equivalent to 0.001 A<sub>280</sub> per minute at 37 °C under the specified conditions.

For activation of the actinidin, samples were incubated in 20 mM potassium phosphate buffer, pH 6.5 containing 52 mM L-cysteine and 2 mM EDTA (1:1; v/v) for 1 h at 45 °C. Inactivation of the enzyme was achieved either by thermal treatment (95 °C for 5 min) or by addition of P2714 Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) to the protein samples (1:1; v/v).

To detect proteolytic activity of actinidin after SDS-PAGE, zymograms were run according to Grobe et al. (2002) with some modifications, as described by Gavrovic-Jankulovic et al. (2005). Briefly, after incubation in reducing sample buffer (1 h at 45 °C), protein samples were applied onto a 14% resolving gel co-polymerized with 0.1% gelatin for SDS-PAGE analysis. After electrophoresis, the gel was incubated in a 100 mM potassium phosphate buffer, pH 6.5 with 26 mM L-cysteine and 1 mM EDTA for 16 h, followed by staining with Coomassie Blue (Serva).

### 2.6. MS analysis and N-terminal sequencing

The molecular mass of purified actinidin was determined by matrix assisted desorption/ionization mass spectrometry (MALDI TOF-MS) with a Reflex III (Bruker-Daltonik, Bremen) in the positive ion mode. The protein was dissolved in water at a concentration of 5 µg µL<sup>-1</sup> and further diluted in the ratio of 1:60 with freshly prepared matrix solution consisting of saturated 3,5-di-methoxy-4-hydroxycinnamic acid (sinapic acid, SA; Aldrich) in a 2:1 mixture of 0.1% trifluoroacetic acid/ acetonitrile. 0.5 µL aliquots were deposited on the sample holder and analyzed immediately after drying in a stream of air.

For N-terminal sequencing after SDS-PAGE protein samples were transferred by semidry blotting onto a PVDF membrane (Serva, Heidelberg, Germany) according to Gavrovic-Jankulovic et al. (2002). The membrane was washed in double-distilled water, stained with 0.1% Coomassie Blue (Serva) in 50% methanol and air-dried. The protein bands were excised and microsequenced using a Procise protein sequencer connected to an online PTH amino acid analyzer (PE Biosystems, Weistertadt, Germany).

To verify the intactness of inactive and active actinidin mass spectrometric peptide mapping was performed. In brief, the protein sample was separated by SDS–PAGE electrophoresis, followed by Coomassie Blue staining of the gel. Protein bands corresponding to inactive and active actinidin were excised from the gel, destained and digested overnight with sequence grade trypsin from bovine pancreas (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) as described by Shevchenko and Shevchenko (2001). For MALDI TOF–MS analyses of the tryptic fragments  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, CCA, was used as a matrix.

### 2.7. Patients sera

Sera from patients with allergic symptoms and positive skin-prick test to kiwifruit were used to check the *in vitro* IgE-binding capacity of thermally inactivated and active actinidin forms. Serum of a nonallergic subject was used as control. Demographic and clinical data of the studied patients are summarized in Table 1. Written informed consent was obtained from all patients and the study was approved by an Institutional Ethics Committee.

### 2.8. Western blot

Prior to electrotransfer samples of activated and thermally inactivated actinidin were prepared and run on SDS–PAGE as described above. After electrophoresis actinidin preparations were semi-dry transferred for 40 min ( $2 \text{ mA cm}^{-2}$ ) to a nitrocellulose membrane (pore size  $0.45 \mu\text{m}$ , Serva) as previously described by Gavrovic-Jankulovic et al. (2002). For IgE immunoblot development, following an 1 h incubation step with blocking solution consisting of 5% (w/v) nonfat dry milk in TTBS buffer (50 mM Tris–HCl, pH 7.4, and 150 mM NaCl containing 0.1% Tween 20), membranes were incubated with individual patient sera (dilution 1:2.5, (v:v) in TTBS buffer with 0.1% of nonfat dry milk) for 4 h at room temperature (RT). Afterwards the membrane strips were incubated for 1 h at RT with secondary antibody (goat anti-human IgE, dilution 1:10,000 in TTBS; Sigma–Aldrich) followed by incubation with rabbit anti-goat IgG labeled with alkaline phosphatase (dilution 1:30,000 in TTBS; Sigma–Aldrich) for 1 h at RT.

Additionally, samples of active and thermally inactivated Act d 1 were tested for IgG reactivity. After incubation with blocking solution, these membrane strips were incubated for 1 h at RT with polyclonal anti-Act d 1 antibodies raised in rabbits (dilution 1:20,000, v:v in TTBS buffer with 0.1% of nonfat dry milk) followed by incubation with secondary goat anti-rabbit IgG antibodies (dilution: 1:20,000, v:v in TTBS buffer with 0.1% of nonfat dry milk) for 1 h at RT and tertiary anti-goat IgG antibodies labeled with alkaline phosphatase (dilution 1:30,000 in TTBS; Sigma–Aldrich) for 1 h at RT. Immunoblots were visualized using nitro blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Sigma–Aldrich) as substrates.

### 2.9. Skin tests

Skin prick tests (SPTs) with the kiwifruit extract ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and serially diluted two concentrations of activated Act d 1 ( $500, 50$  and  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and thermally inactivated Act d 1 ( $500, 50$  and  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) were performed as previously described (Gavrovic-Jankulovic et al., 2002). Histamine phosphate ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) and 0.9% saline were used as positive and negative controls, respectively. The mean wheal diameter of at least 3 mm or greater compared with that produced by the negative control 20 min after puncture was considered a positive response.

## 3. Results

### 3.1. Identification of actinidin preparation

Actinidin (Act d 1) was isolated from kiwifruit (*A. deliciosa*) protein extract, which was prepared without addition of protease inhibitors. A combination of DEAE–Sephadex and SP–Sephadex ion-exchange chromatographies were employed for the actinidin purification. Homogeneity of the isolated protein was assessed by SDS–PAGE and 2D–PAGE in reducing conditions. The purified protein sample revealed two protein bands of about 22 and 30 kDa (Fig. 1). Both bands revealed the same N-terminal sequence (LPSYVD) which corresponded to amino acids 127–132 of the complete sequence of actinidin (UniProt ID: A5HII1). The molecular mass of isolated actinidin was 23883.1 Da (Fig. 2).

To confirm that the 22 kDa Act d 1 did not derive from proteolytic processing of 30 kDa Act d 1, the 22 kDa band was excised from a SDS-gel, and after incubation with a cocktail of inhibitors (1 h incubation at  $37^\circ\text{C}$ ), the 22 kDa protein was rerun by SDS–PAGE, showing electrophoretic mobility of a 30 kDa protein (Supplementary material Fig. 1S).

### 3.2. Detection of actinidin proteolytic activity

The caseinolytic digestion assay was performed to test proteolytic activity of actinidin (Act d 1). Four samples of Act d 1 were analyzed (a) Act d 1, (b) Act d 1 activated in the buffer with L-cysteine, (c) Act d 1 inactivated by thermal treatment and (d) Act d 1 inactivated by a cocktail of inhibitors. Relative proteolytic activity was calculated as % of proteolytic activity of the sample compared to activated actinidin (100% activity). Act d 1 showed 55% of caseinolytic activity when compared to activated Act d 1. 5.2% of caseinolytic activity was detected upon thermal treatment and 7.9% after treatment of Act d 1 with cocktail of inhibitors, respectively.

In addition, samples of Act d 1 were analyzed by SDS–PAGE and proteolytic activity was afterward visualized by zymogram with gelatin as substrate. All Act d 1 samples were run under reducing conditions in SDS–PAGE. Act d 1 inactivated by thermal treatment, or by protease cocktail inhibitors, revealed one strong band of about 30 kDa in reducing conditions (Fig. 3a). Act d 1 without additional treatment upon purification, as well as after activation with L-cysteine, revealed two bands that differed in electrophoretic mobility and intensity. The higher, faint band corresponded to inactive Act d 1, while the lower, stronger band of about 22 kDa seems to be active Act d 1. To confirm this assumption a zymogram with the same palette of Act d 1 samples was performed. Act d 1 samples which were inactivated either thermally or with the cocktail of protease inhibitors showed no proteolytic activity, while Act d 1 and activated Act d 1 were proteolytically active (Fig. 3b). In correlation with caseinolytic activity assay, activated Act d 1 revealed higher activity compared to Act d 1.

### 3.3. Mass analysis of actinidin preparation

Mass fingerprint of the 30 kDa band and the 22 kDa band of Act d 1 was performed after their excision from the SDS-gel and tryptic digestion. By Mascot analysis in both samples peptides  $^1\text{LPSYVDWR}^8$  and  $^{40}\text{IVTGVLSLSEQLIDCGRTQNTR}^{58}$  corresponding to the first part of mature actinidin were detected, as well as  $^{182}\text{NSWDTTWGEEGYMR}^{195}$  and  $^{199}\text{NVGGAGTCGIATMPSYPVK}^{217}$  peptides from the C-terminal part of the Act d 1 primary structure.

### 3.4. IgG reactivity of active and thermally inactivated Act d 1

Both active and thermally inactivated Act d 1 showed IgG reactivity in Western blot with anti-Act d 1 rabbit antibodies (Fig. 4). Thermally inactivated Act d 1 was detected as one intensive band of 30 kDa, while active Act d 1 showed one intensive band of about 22 kDa, and a faint band of 30 kDa, indicating that some inactivation of the enzyme had occurred.

### 3.5. *In vitro* and *in vivo* IgE reactivity of active and thermally inactivated Act d 1

Eight patients with clinical history of kiwifruit allergy were recruited for *in vivo* and *in vitro* studies. Their clinical characteristics, specific IgE levels, and SPT results are given in Table 1. All patients showed positive SPT with kiwifruit extract.

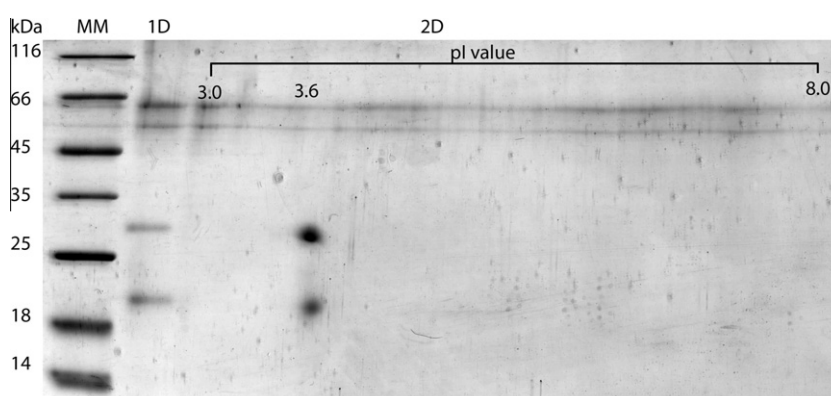
*In vitro* IgE reactivity of active and thermally inactivated Act d 1 was assessed in Western blot. As a source of specific IgE sera from seven patients were employed. IgE reactivity was detected only for inactivated Act d 1 in all tested patients sera (Table 1, supplementary material Fig. 2S), while active Act d 1 revealed no IgE binding.

Six out of eight patients were skin prick tested with serial dilutions of active and thermally inactivated Act d 1. Five (83%) out of six patients revealed a positive reaction to the thermally inactivated Act d 1 ( $c = 500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), and four (67%) showed a positive

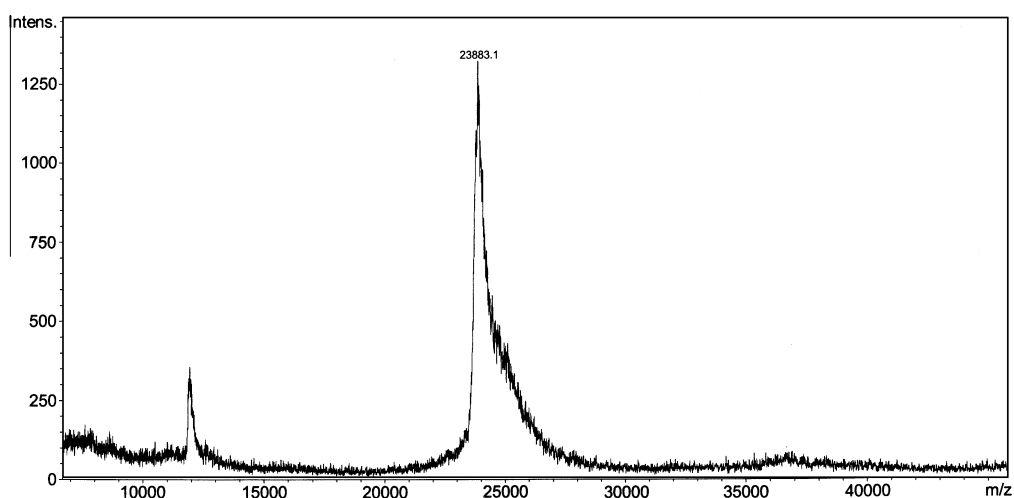
**Table 1**  
Demographic and clinical data.

Subject No.	Age/ sex	Symptoms	Other food allergies	Specific IgE CAP (kU/L)	SPT(mm) Kiwifruit extract	Histamine						IgE-immunoblot		
						i Act d 1 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )			a Act d 1 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )			i Act d 1	a Act d 1	
						500	50	5	500	50	5			
1. JU	41/M	OAS	Tropical fruit, celery	0.35	5	3	0	0	3	3	0	5	+	–
2. AT	39/F	OAS	/	4.31	14	NT	NT	NT	NT	NT	NT	5	+	–
3. IM	21/M	OAS, TT	Fish	0.67	8	10	10	0	12	5	3	4	+	–
4. AM	2/F	OAS	Pork, milk, peanut, soy	NT	10	NT	NT	NT	NT	NT	NT	3	+	–
5. MD	74/F	OAS, TT	/	0.35	6	5	0	0	7	3	0	3	+	–
6. FP	10/M	AE	Banana, tomato	1.14	3	3	0	0	0	0	0	3	+	–
7. JT	27/F	OAS	/	0.35	3	0	0	0	3	0	0	3	+	–
8. LK	40/F	AE	/	0.35	3	3	0	0	0	0	0	4	NT	NT

AE, Angioedem; OAS, oral allergy; TT, tightness of throat; NT (not tested); a Act d 1, active Act d 1; i Act d 1, inactivated Act d 1.



**Fig. 1.** Analysis of actinidin preparation (Act d 1) by (1) 1-D and (2) 2-D PAGE, MM) molecular markers. Proteins were stained by CBB.



**Fig. 2.** Mass analysis of purified Act d 1.

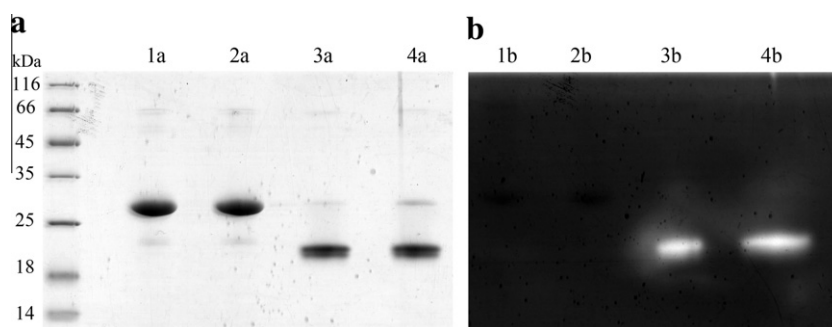
reaction to the active Act d 1 ( $c = 500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). However, three persons were more sensitive to active ( $c = 50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) than to inactivated Act d 1. One person showed a positive reaction only to active actinidin and two showed a positive reaction only to the thermally inactivated Act d 1.

#### 4. Discussion

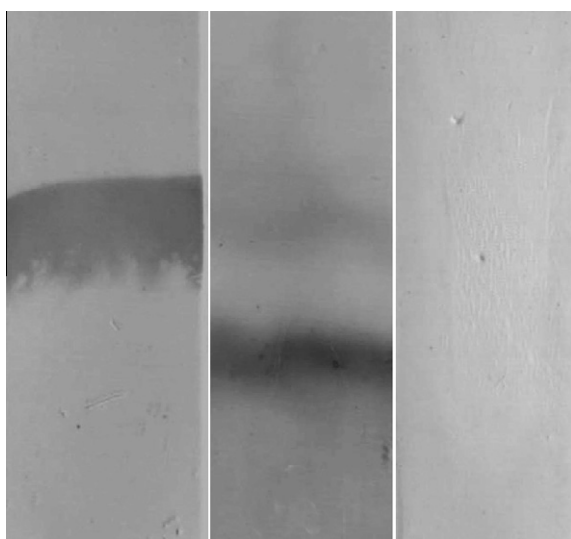
Using proteomic tools and a combination of biochemical and immunochemical methods this study provides evidence that Act

d 1 isolated under native conditions from *A. deliciosa* kiwifruit extract represents a mixture of active and inactive enzyme. Proteolytic activity of the isolated Act d 1 was tested by caseinolytic assay and by zymography with gelatin. Under employed experimental conditions, without addition of protease inhibitors in the extraction buffer, the isolated Act d 1 preparation showed 55% of caseinolytic activity when compared to a preparation consisting of only activated Act d 1. Proteolytic activity was confirmed by zymography.

Mature Act d 1 contains seven cysteine residues, six of them being involved in disulphide bridges ( $C^{22}-C^{65}$ ,  $C^{56}-C^{98}$ ,  $C^{156}-C^{206}$ ),



**Fig. 3.** SDS-PAGE analysis (a) and detection of proteolytic activity by zymogram (b) under reducing conditions: (1) Act d 1 inactivated by thermal treatment (95 °C, 5 min), (2) Act d 1 inactivated with cocktail of inhibitors, (3) Act d 1, (4) Act d 1 activated with L-cysteine, (M) molecular markers (from top to bottom: 116, 66, 45, 35, 25, 18, and 14 kDa).



**Fig. 4.** Western blot with anti-Act d 1 rabbit antibodies: (1) thermally inactivated Act d 1, (2) active Act d 1, (3) negative control (buffer used instead of primary antibodies in immunoblot development).

and Cys<sup>25</sup> being involved in the active site (Baker, 1977). Unprotected active-site cysteine residues can undergo various covalent modifications which may regulate protein activity (Reddie and Carroll, 2008). In SDS-PAGE and 2D-PAGE under reducing conditions an extraordinary difference in electrophoretic mobility (30 kDa/22 kDa) between inactive and active Act d 1 was noticed. By using SDS-PAGE analysis of the kiwifruit extract treated with E64 protease inhibitor (Pastorelo et al., 1998) noticed a large increase in the 30 kDa actinidin band. Mass analysis of tryptic digests of inactive and active Act d 1 revealed that both bands preserved the primary structure of mature actinidin, suggesting that the difference in electrophoretic mobility between active and inactive actinidin is due to conformational changes in the protein structure. There are several reports in literature on anomalies in electrophoretic mobility of proteins with a high number of disulphide bonds. Thaumatin-like protein from apple (Mal d 2), with a 23 kDa molecular mass confirmed by mass analysis, migrated as a 31 kDa band in SDS-PAGE (Krebitz et al., 2003). Similar findings were reported for two kiwifruit allergens: thaumatin-like protein (Act d 2) (Gavrovic-Jankulovic et al., 2002) and kiwellin (Act d 5) (Tamburini et al., 2005).

Biological activity of Act d 1 was preserved upon thermal treatment (1 h at 45 °C), in the presence of SDS and 2-mercaptoethanol, indicating that S-S bridges in the protein remained intact, i.e. that the protein structure is very compact. Antigenicity of active and

thermally inactivated Act d 1 was confirmed by anti-Act d 1 IgG antibodies in Western blot.

*In vitro* IgE reactivity of thermally inactivated Act d 1 was shown in Western blot in seven kiwifruit allergic persons. None of them showed IgE reactivity to active Act d 1. A considerable difference in *in vitro* IgE reactivity due to environmental effects on the protein conformation have been reported for several food allergens. A significant increase in IgE-binding under reducing conditions was observed for Mal d 2, while none of the tested patients sera reacted with the unreduced protein in Western blot (Herndl et al., 2007). Enhanced IgE-reactivity of Mal d 2 was, therefore, found only after the breakage of disulphide bridges, suggesting that IgE-binding epitopes of Mal d 2 were hidden inside the molecule not easily accessible for the IgE molecules (Marzban et al., 2009). It has also been recently shown that the conformation, and consequently *in vitro* and *in vivo* IgE reactivity of Act d 5 (kiwellin), was affected by the physico-chemical characteristics of the environment (Bernardi et al., 2010), suggesting that the assay conditions influence the results of the diagnostic systems by modulating the pattern of exposed antigenic epitopes.

*In vivo* IgE reactivity of active and thermally inactivated Act d 1 was evaluated by skin prick test. These result shows that *in vivo* the active actinidin is more IgE reactive. Since no protein precipitation was observed after the thermal inactivation (95 °C for 5 min) of Act d 1, it seems that monomolecular conformational scrambling brought to the inactivation of the enzyme. In line with results from *in vitro* IgE reactivity, data from *in vivo* testing indicates that besides conformational, hidden IgE binding epitopes, upon exposure, contribute to the allergenicity of Act d 1. It is believed that allergenicity of fresh fruits can be reduced rather easily by heat processing, allowing the production of hypoallergenic jams and juices (Soler-Rivas and Wichers, 2001). However, assessment of *in vivo* IgE reactivity of thermally inactivated Act d 1 suggest that thermally processed kiwifruit products could induce clinical symptoms in kiwifruit allergic persons. It has been shown that in a double-blind placebo-controlled food challenge (DBPCFC) steam-cooked kiwifruit preparation induced oral allergy syndrome in a child with kiwifruit allergy (Fiocchi et al., 2004). To the best of our knowledge this is the first evidence that thermally treated Act d 1 is capable of inducing clinical reactivity in kiwifruit allergic persons. However, our study has been performed on a rather small group of patients. In order to get a better insight into the IgE reactivity of biologically active and thermally inactivated actinidin a larger population of kiwifruit allergic subjects should be tested.

Even though our study was conducted in a small group of kiwifruit allergic patients, it indicates that compared to inactive 30 kDa actinidin, active 22 kDa actinidin under employed experimental conditions was not capable of binding specific IgE in Western blot. Such results could be misleading for allergy diagnosis as Act d 1 is regarded to be a selective biomarker of kiwifruit allergy.

IgE-binding assays with purified allergens should enable reliable detection/quantification of allergen-specific IgE, however deeper knowledge of the physico-chemical features of allergenic proteins is necessary for the improvement of diagnostic assays.

### Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest

### Acknowledgment

This work is supported by the Ministry of Education and Science, Republic of Serbia (Grant No. 172049).

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.fct.2011.12.030](https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.12.030).

### References

- Aleman, A., Sastre, J., Quirce, S., de las Heras, M., Carnes, J., Fernandez-Caldas, E., Pastor, C., Blazquez, A.B., Vivanco, F., Cuesta-Herranz, J., 2004. Allergy to kiwi: a double-blind, placebo-controlled food challenge study in patients from a birch-free area. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 543–550.
- Baker, E.N., 1977. Structure of actinidin: details of the polypeptide chain conformation and active site from an electron density map at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 115 (3), 263–277.
- Bernardi, M.L., Picone, D., Tuppo, L., Giangrieco, I., Petrella, G., Palazzo, P., Ferrara, R., Tamburrini, M., Mari, A., Ciardiello, M.A., 2010. Physico-chemical features of the environment affect the protein conformation and the immunoglobulin E reactivity of kiwellin (Act d 5). *Clin. Exp. Allergy* 40, 1819–1826.
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D., Edelstein, S.J., 1996. *Gel Electrophoresis Under Denaturing Conditions*. In: *Protein Methods*. Wiley-Liss, New York, p. 107.
- Bublin, M., Mari, A., Ebner, C., Knulst, A., Scheiner, O., Hoffman-Sommergruber, K., Breiteneder, H., Radauer, C., 2004. IgE sensitization profiles toward green and gold kiwifruits differ among patients allergic to kiwifruit from 3 European countries. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114, 1169–1175.
- Bublin, M., Radauer, C., Knulst, A., Wagner, S., Scheiner, O., Mackie, A., Mills, C.E.N., Breiteneder, H., 2008. Effects of gastrointestinal digestion and heating on the allergenicity of the kiwi allergens Act d 1, actinidin, and Act d 2, a thaumatin-like protein. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 1130–1139.
- Carne, A., Moore, C., 1978. The amino acid sequence of the tryptic peptides from actinidin, a proteolytic enzyme from the fruit of *Actinidia chinensis*. *Biochem. J.* 173, 73–83.
- Chen, L., Lucas, J.S., Hourihane, J.O., Lindemann, J., Taylor, S.L., Goodman, R.E., 2006. Evaluation of IgE binding to proteins of hardy (*Actinidia arguta*), gold (*Actinidia chinensis*) and green (*Actinidia deliciosa*) kiwifruits and processed hardy kiwifruit concentrate, using sera of individuals with food allergies to green kiwifruit. *Food Chem. Toxicol.* 44, 1100–1107.
- Drapeau, G.R., 1976. Protease from *Staphylococcus aureus*. In: Lorand, L. (Ed.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, pp. 469–475.
- Fiocchi, A., Restanti, P., Bernardo, L., Martelli, A., Ballabio, E.D.A., Riva, E., 2004. Tolerance of heat-treated kiwi by children with kiwifruit allergy. *Pediatr. Allergy Immunol.* 15, 454–458.
- Gavrovic-Jankulovic, M., Cirkovic, T., Vuckovic, O., Atanaskovic-Markovic, M., Petersen, A., Gojgic, G., Burazer, L., Jankov, R.M., 2002. Isolation and biochemical characterization of a thaumatin-like kiwi allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110, 805–810.
- Gavrovic-Jankulovic, M., Polovic, N., Prusic, S., Jankov, R.M., Atanaskovic-Markovic, M., Vuckovic, O., Cirkovic Velickovic, T., 2005. Allergenic potency of kiwi fruit during fruit development. *Food Agric. Immunol.* 16, 117–128.
- Grobe, K., Poppelmann, M., Becker, W.-M., Petersen, A., 2002. Properties of group I allergens from grass pollen and their relation to cathepsin B, a member of the C1 family of cysteine proteinases. *Eur. J. Biochem.* 26, 2083–2092.
- Hauser, M., Egger, M., Wallner, M., Wopfner, N., Schmidt, G., Ferreira, F., 2008. Molecular properties of plant food allergens: a current classification into protein families. *Open Immunol. J.* 1, 1–12.
- Harlow, E., Lane, D., 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 140.
- Herndl, A., Marzban, G., Kolarich, D., Hahn, R., Boscia, D., Hemmer, W., Maghuly, F., Stoyanova, E., Katinger, H., Laimer, M., 2007. Mapping of *Malus domestica* allergens by 2-D electrophoresis and IgE-reactivity. *Electrophoresis* 28, 437–448.
- Jung, K.A., Song, T.C., Han, D., Kim, I.H., Kim, Y.E., Lee, C.H., 2005. Cardiovascular protective properties of kiwifruit extracts in vitro. *Biol. Pharm. Bull.* 28 (9), 1782–1785.
- Krebitz, M., Wagner, B., Ferreira, F., Peterbauer, C., Campillo, N., Witty, M., Kolarich, D., Steinkellner, H., Scheiner, O., Breiteneder, H., 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. *J. Mol. Biol.* 329, 721–730.
- Lucas, J.S.A., Grimshaw, K.E.C., Collins, K., Warner, J.O., Hourihane, J.O.B., 2004. Kiwi fruit is a significant allergen and is associated with different patterns of reactivity in children and adults. *Clin. Exp. Allergy* 34, 1115–1121.
- Lucas, J.S.A., Lewis, S.A., Trewin, J.B., Grimshaw, K.E.C., Warner, J.O., Hourihane, J.O.B., 2005. Comparison of the allergenicity of *Actinidia deliciosa* (kiwi fruit) and *Actinidia chinensis* (gold kiwi). *Pediatr. Allergy Immunol.* 16, 647–654.
- Marzban, G., Herndl, A., Pietrozotto, S., Banerjee, S., Obinger, C., Maghuly, F., Hahn, R., Boscia, D., Katinger, H., Laimer, M., 2009. Conformational changes of Mal d 2, a thaumatin-like apple allergen, induced by food processing. *Food Chem.* 112, 803–811.
- Nieuwenhuizen, N.J., Beuning, L.L., Sutherland, P.W., Neelam, N.S., Cooney, J.M., Bielecki, L.R., Schroder, R., MacRae, E.A., Atkinson, R.G., 2007. Identification and characterization of acidic and novel basic forms of actinidin, the highly abundant cysteine protease from kiwifruit. *Funct. Plant Biol.* 34, 946–961.
- Palacin, A., Rodriguez, J., Blanco, C., Lopez-Torres, G., Sanchez-Monge, R., Varela, J., Jimenez, M.A., Cumplido, J., Carrillo, T., Crespo, J.F., Salcedo, G., 2008. Immunoglobulin E recognition patterns to purified kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) allergens in patients sensitized to kiwi with different clinical symptoms. *Clin. Exp. Allergy* 38, 1220–1228.
- Pastorello, E.A., Pravettoni, V., Ispano, M., Farioli, L., Ansaloni, R., Rotondo, F., Incorvaia, C., Asman, I., Bengtsson, A., Ortolani, C., 1996. Identification of the allergenic components of kiwi fruit and evaluation of their crossreactivity with timothy and birch pollens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114, 1169–1610.
- Pastorello, E.A., Conti, A., Pravettoni, V., Farioli, L., Rivolta, F., Ansaloni, R., Ispano, M., Incorvaia, C., Giuffrida, M.G., Ortolani, C., 1998. Identification of actinidin as the major allergen of kiwi fruit. *J. Allergy Clin. Immunol.* 101, 531–537.
- Reddie, K.G., Carroll, K.S., 2008. Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12, 1–9.
- Rush, E.C., Patel, M., Plank, L.D., Ferguson, L.R., 2002. Kiwifruit promotes laxation in the elderly. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 11, 164–168.
- Shevchenko, A., Shevchenko, A., 2001. Evaluation of the efficiency of in-gel digestion of proteins by peptide isotopic labeling and MALDI mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 296, 279–283.
- Soler-Rivas, C., Wichers, H., 2001. Impact of (bio)chemical and physical procedures on food allergen stability. *Allergy* 56 (Suppl. 67), 52–55.
- Tamburrini, M., Cerasuolo, I., Carratore, V., Stanziola, A.A., Zofra, S., Romano, L., Camardiella, L., Ciardiello, M.A., 2005. Kiwellin, a novel protein from kiwi fruit. Purification, biochemical characterization and identification as an allergen. *Protein J.* 24, 423–429.
- Wal, J.M., 2003. Thermal processing and allergenicity of foods. *Allergy* 58, 727–729.
- Weghofer, M., Thomas, W.R., Pittner, G., Horak, F., Valenta, R., Vrtala, S., 2005. Comparison of purified *Dermatophagoides pteronyssinus* allergens and extract by two-dimensional immunoblotting and quantitative immunoglobulin E inhibitions. *Clin. Exp. Allergy* 35, 1384–1391.

# **Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) extract shows potential as a low-cost and efficient milk-clotting agent**

Milica M. Grozdanovic<sup>a\*</sup>, Lidija Burazer<sup>b</sup>, Marija Gavrovic-Jankulovic<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 12, 11000 Belgrade, Serbia

<sup>b</sup> Allergy Department, Institute of Immunology and Virology, Vojvode Stepe 458, 11152 Belgrade, Serbia

<sup>a\*</sup> Corresponding author: e-mail address: mgrozdanovic@chem.bg.ac.rs

Tel: +381 11 3336663

Fax: +381 11 2184 330

**Abstract:** Actinidin, a cysteine protease accounting for more than 50 % of soluble proteins in kiwifruit pulp, has shown promise as a milk-clotting agent. In this study the potential use of kiwifruit pulp extract as a clotting agent was investigated. It was shown that three kiwifruit extracts made from the pulp of a single fruit have significantly different levels of active actinidin, depending on the extraction buffer employed. Kiwifruit extract prepared at pH 5.0 has the best milk-clotting properties, with a nearly 30% better ratio of clotting activity to proteolytic activity than purified actinidin. It produced a casein coagulum clearly separated from the whey proteins, and was shown to be stable at room temperature for up to two months. This extract has the potential to be employed as an efficient and low cost milk-clotting agent in the production of dairy products.

## **1. Introduction**

Milk coagulation is a basic step in cheese manufacturing and is most commonly achieved by addition of chymosin (rennet), a milk-clotting enzyme preparation obtained from the stomach contents of the unweaned calf (Lopes, Teixeira, Liberato, Pais, & Clemente, 1998). The world-wide increase in cheese production, alongside with the reduced supply of calf rennet and higher prices, have led to an increase in the demand for alternative sources of milk coagulants (Cavalcanti, Teixeira, Lima Filho, & Porto, 2004; Katsaros, Tavantzis, Taoukis, 2010). In addition, the use of animal rennet has consumer constraints due to religious reasons (e.g.,

Judaism and Islam), diet (vegetarianism), or bans on genetically engineered food (e.g., Germany, France and the Netherlands forbid the use of recombinant calf rennet) (Roseiro, Barbosa, Mames, & Wilbey, 2003). For these reasons, enzymes extracted from plants have become a subject of growing interest in dairy technology. Milk-clotting enzymes have been identified in various plant species; unfortunately, many of these enzyme preparations were found to be unsuitable because they produce extremely bitter cheeses (Egitoa et al., 2007). Both the flavor and texture of cheeses are affected by the high proteolytic activity of plant proteases that leads to the production of short peptides which are responsible for bitterness in dairy products (Lo Piero, Puglisi, & Petrone, 2011). Moreover, the toxin content of many of these plant extracts constrains their use in the food industry (Silva & Malcata, 2005).

Many of the proteolytic enzymes which have been studied for their milk-clotting ability belong to the group of acidic proteases, which includes chymosin. These include the commercially used microbial milk-clotting aspartic proteases from *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* and *Endothia parasitica*. Pepsin-like acid proteases are also derived from *Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp., and recently from *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (Sumantha, Larroche, & Panday, 2006; Lo Piero, 2011). Aspartic proteases with a pH optimum of 5.1 and milk-clotting activity have also been isolated from the flowers of *Cynara cardunculus* (Heimgartner et al., 1990).

In a recent study, Lo Piero et al. (2011) evaluated the applicability of purified actinidin as a plant milk coagulant. Actinidin (EC 3.4.22.14) is a cysteine protease from kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) with a wide pH activity range (4-10) and wide substrate specificity (Arcus, 1959; McDowall, 1970; Boland, 1972). Lo Piero et al. (2011) showed that actinidin has the ability to form milk clots and that the enzyme is fully compatible with conditions used in cheese manufacture (optimum activity at 40–42 °C, sub-acid pH values). Analysis of hydrolysis products produced by actinidin showed that the preferred substrate for this enzyme is  $\beta$ -casein, followed by  $\kappa$ -casein which is hydrolyzed into a small number of larger peptides (Lo Piero et al., 2011). Saha and Hayashi (2001) reported that dairy products clotted with the use of kiwifruit juice actinidin develop less off-flavor notes, which are attributed to bitter peptides occurring when the fig protease ficin (or papaya protease papain) are used in the same products (Saha & Hayashi, 2001). Puglisi et al. showed that actinidin retains the ability to hydrolyse casein fractions in the presence of up to 5% cream fat and suggested a potential application of actinidin in the manufacture of cheese with optimized fat content (Puglisi, Petrone & Lo Piero, 2012).

All of these findings indicate that kiwifruit derived protease extracts could be a suitable option for the production of novel dairy products. However, the level of actinidin activity in kiwifruit is known to differ depending on fruit growth stage and treatment of the fruit during postharvest storage (Larocca, Rossano, & Riccio, 2010). Ciardiello et al. (2009) showed that a ripe kiwifruit may have different concentration of total proteins and a different amount of single components when ripeness is reached by different means of postharvest handling, such as ethylene exposure



with or without previous cold storage. Additionally, in a previous study it was shown that actinidin preparations isolated from kiwifruit under native conditions contain a mixture of active and inactive actinidin. These two enzyme forms were shown to have an extraordinarily different electrophoretic mobility, with the active enzyme travelling as a band of approximately 22 kDa in SDS-PAGE (Grozdanovic et al., 2012). In order to be employed as a milk-clotting reagent, the procedure for extracting actinidin from kiwifruit should be optimized to produce preparations with maximum yields of milk-clotting activity, a requirement for industrial scale-up and commercial exploitation of this rennet alternative.

Kiwifruit is very popular in the human diet due to its pleasant taste and high content of vitamin C and several investigations on possible health-promoting effects of kiwifruit have been reported (Jung et al., 2005; Rush, Patel, Plank, & Ferguson, 2002). Kiwifruit extract is already used in the food industry as a meat tenderizer (Han, Morton, Bekhit, & Sedcole, 2009) and concentrated kiwifruit juices are used extensively as fruit ingredients in many foods such as dairy products, jams and jellies, syrups, confectionery, etc. (Goulal & Adamopoulos, 2010). Approximately 1 million metric tons of kiwifruits are processed annually worldwide; this results in about 30 % (wet weight) of by-products, such as pulp and peel, and there is a growing interest in utilizing these by-products in the food industry (Yang et al., 2013).

In this study, it was demonstrated by means of SDS-PAGE, zymography and immunoblotting with anti-actinidin antibodies that the ratio between active and inactive actinidin present in kiwifruit protein extracts differs depending on the pH of the buffer employed in the extraction procedure. Furthermore, the quantity of active protease in each extract was assayed and milk-clotting and hydrolysis properties of three different kiwifruit extracts were examined, in order to determine the best possible preparation for use as a milk-clotting agent at industrial scale. Finally, the effect of fat percentage in milk on the clotting times of actinidin and kiwifruit extracts was assessed.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Preparation of kiwifruit protein extracts*

A single ripe kiwifruit (*Actinidia deliciosa*, cv Hayward) was purchased at a local store and used as the starting material in the preparation of all protein extracts. Equal amounts (15 g) of kiwifruit pulp were homogenized in a ratio of 1:2 wt/vol in three different extraction buffers: 100 mM sodium citrate buffer, pH 5.0; 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0; and 100 mM ammonium bicarbonate buffer, pH 9.0. Following extraction (2 hours at 4°C), the obtained slurry was centrifuged (20 minutes at 13 400 × g) and protein concentration in the extracts was

determined by the Bradford method (Bradford, 1976). Concentrations of all protein extracts were made up to 1 mg mL<sup>-1</sup> by dilution in respective extraction buffers.

## *2.2. Purification of actinidin*

Actinidin was purified from 100 mM sodium citrate extract, pH 5.0. The crude extract was subjected to ion-exchange chromatography on a SP- Sephadex C-50 column (145 mm × 27 mm) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) pre-equilibrated with 100 mM sodium citrate buffer, pH 5.0. The unbound protein fraction (300 mL, collected at a gravity flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>) was extensively dialyzed against 20 mM TRIS-HCl buffer, pH 8.0, after which it was loaded onto a QAE-Sephadex A-50 column (125 mm × 15 mm) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), equilibrated with the dialysis buffer. The column was eluted by means of a pH step gradient. For elution, six different 20 mM sodium citrate buffers were prepared with pH values ranging from pH 5 to pH 2.5. The column was eluted with a total of 8 column volumes and a gravity flow rate of 0.5 mL min<sup>-1</sup>. Collected fractions (15 mL each) were analyzed by SDS-PAGE and those containing purified actinidin were dialyzed against 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer, pH 6.5 and assayed for proteolytic activity. A total of 40 mg of purified actinidin was obtained from 300 mL of crude extract. For the preparation of fully active actinidin samples, purified actinidin was diluted in an equal volume of 20 mM potassium phosphate buffer, pH 6.5 containing 52 mM L-cysteine and 2 mM EDTA and incubated for 1 h at 45°C. The final concentration of L-cysteine was 26 mM. For use as control, a sample of purified actinidin was inhibited by addition of E64 inhibitor (AppliChem, GmbH, Darmstadt, Germany) in equimolar amounts.

## *2.3. SDS- PAGE and zymography analysis*

SDS-PAGE was performed on 4% stacking gel and 14% resolving gel under non-reducing conditions (Laemmli, 1970). Samples were prepared by incubation in SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2.0 % SDS, 10 % glycerol, 0.02 % bromphenol blue) for 1 h at 45 °C and centrifuged at 13, 400 × g for 1 min. After electrophoresis, the separated proteins were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue (CBB-R250, Serva, Heidelberg, Germany).

Proteolytic activity of kiwifruit extracts was detected by one-dimensional gelatin gel zymography. Following incubation in SDS sample buffer, the samples were separated under non-reducing conditions in a SDS-PA gel co-polymerized with 1 g L<sup>-1</sup> gelatin. After electrophoresis, the gel was incubated in a 100 mM potassium phosphate buffer, pH 6.5 with 26 mM L-cysteine and 1 mM EDTA for 16 h, followed by staining with Coomassie Brilliant Blue. Zymography analysis of actinidin samples was performed twice (as two independent experiments).

## *2.4 Production of polyclonal antisera*

Purified actinidin was used for the immunization of rabbits according to the protocol described by Harlow and Lane (Harlow & Lane, 1998). In brief, 0.15 mL of actinidin (1 mg mL<sup>-1</sup>) was mixed with 0.15 mL FCA (Freund's complete adjuvant) for the first immunization. Every 30 days, for 6 months, the rabbits were boosted with a mixture of 0.15 mL of actinidin and 0.15 mL of incomplete Freund' adjuvant. Each rabbit was subcutaneously immunized with 0.3 mL of the emulsion, and after bleeding, sera were collected and stored at -20 °C before use. The immunization protocol was approved by the Ethics Committee of the Torlak Institute of Virology, Vaccines and Sera.

## 2.5. Western blot

Sample proteins separated by SDS-PAGE were transferred for 30 min (2 mA cm<sup>-2</sup>) onto a nitrocellulose membrane (pore size 0.45 µm, Serva, Heidelberg, Germany) as described by Towbin *et al.* (1979). The membrane was blocked by incubation with 5 % (w/v) nonfat dry milk in TTBS buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 150 mM NaCl containing 0.1% Tween 20) for 1h at room temperature (RT). Rabbit anti-actinidin antibodies were added in a dilution of 1:5000 (v:v) in TTBS buffer and incubated for 1 h at RT. Afterwards, the membrane was extensively washed with TTBS and incubated for 1 h at RT with goat anti-rabbit IgG antibodies (dilution 1:30 000 v:v in TTBS, Sigma – Aldrich, Saint Louis, MO, USA) labeled with alkaline phosphatase. Immunoblots were visualized using nitro blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) as substrates. Immunoblot analysis was performed three times (as three independent experiments).

## 2.6. Caseinolytic protease activity assay

Proteolytic activity of kiwifruit extracts was assessed using casein as a substrate, as previously described (Drapeau, 1976), with some modifications. A 2 % casein solution was prepared in 100 mM potassium phosphate buffer, pH 6.5, with addition of 17 mM EDTA. The reaction mixture was equilibrated to 37°C, after which 100 µL of kiwifruit extract or purified actinidin (0.5 mg mL<sup>-1</sup>) or calf chymosin (0.5 mg mL<sup>-1</sup>) (Sigma- Aldrich, Saint Louis, MO, USA) was added. Upon the addition of kiwifruit extracts or purified enzymes the pH of the assay mixture was once again measured and, if necessary, corrected to the value of 6.5 with 0.1 M NaOH or HCl. The assay mixture was incubated for 1 h at 37 °C. The enzyme reaction was stopped by addition of trichloroacetic acid (TCA) to a final concentration of 6.75 % and the reaction mixture was incubated for an additional hour at 37 °C. Following centrifugation (13 400 × g for 20 minutes) absorption of the supernatant was measured at 280 nm against a blank. The blank was prepared by first mixing the enzyme with TCA and then adding the casein solution to the enzyme-TCA mixture. One unit of activity was determined as that amount of enzyme which releases acid-soluble fragments equivalent to 0.001 A<sub>280</sub> per minute at 37 °C under the specified conditions.

To determine the concentration of active enzyme in kiwifruit protein extracts, L-cysteine was added to the reaction mixture to a final concentration of 17 mM. A linear standard curve was constructed plotting the absorbance measured at  $A_{280}$  following TCA precipitation versus concentration of purified and activated actinidin (0.2 - 2 mg mL<sup>-1</sup>). The obtained values for caseinolytic activity represent mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments.

### *2.7. Milk-clotting assay*

The clotting activities of kiwifruit extracts and purified actinidin were determined according to the method of Berridge (1952), with some modifications. To 1 mL of milk preparation (commercial semi-skimmed milk containing 0.5 %, 1.5 %, 2.8 % or 3.8 % fat) a volume of 100  $\mu$ L of kiwifruit extract or purified actinidin (0.5 mg mL<sup>-1</sup>), or calf chymosin (0.5 mg mL<sup>-1</sup>) was added. pH of the assay mixtures was measured and, if necessary, corrected to the value of 6.5 with 0.1 M NaOH or HCl. Calcium-chloride was not added to the reaction mixture. The assay mix was incubated at 37 °C and the time which passed from the addition of enzyme to the first appearance of solid particles was measured. Blank controls consisted of milk preparations to which 100  $\mu$ L of respective extraction buffers were added. One unit was defined as being the quantity (mg) of protein extract or purified enzyme needed to coagulate 1 mL of milk in 1 min at 37 °C. The obtained values for milk-clotting activity represent mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments.

### *2.8. Electrophoretic analysis of milk hydrolysis*

To analyze the hydrolytic activity of purified actinidin and different extracts toward bovine milk, all of the kiwifruit extracts were diluted in their respective extraction buffers to a concentration of active enzyme of 0.2 mg mL<sup>-1</sup>. A total amount of 50  $\mu$ g of active enzyme was added from each extract, purified actinidin, or calf chymosin to a 580  $\mu$ L aliquot of 0.5 % fat milk with 17 mM EDTA. Upon the addition of kiwifruit extracts or purified enzymes the pH of the assay mixture was once again measured and, if necessary, corrected to the value of 6.5 with 0.1 M NaOH or HCl. The reaction mixture was incubated for 1 h at 37 °C, following which SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2.0 % SDS, 5 % 2-mercaptoethanol, 10 % glycerol, 0.02 % bromphenol blue) was added and, after incubation for 5 min at 95 °C, the samples were run on SDS-PAGE. In addition, to determine the influence of L-cys on the proteolytic activity of actinidin, chymosin, and the three kiwifruit extracts, the same assay was performed with the addition of 17 mM L-cys to the reaction mixture. Electrophoretic analysis was performed in duplicate.

### *2.9. Electrophoretic analysis of milk-clotting activity*

For the electrophoretic analysis of milk-clotting activity, the extracts were also diluted in their respective extraction buffers to a concentration of active enzyme of 0.2 mg mL<sup>-1</sup>. A total amount of 50 µg of active enzyme was added from each extract, purified actinidin, or chymosin to a 1 mL aliquot of 0.5 % fat milk. pH of the assay mixtures was measured and, if necessary, corrected to the value of 6.5 with 0.1 M NaOH or HCl. Ca<sup>2+</sup> ions were not added to the reaction mixture. The assay was incubated at 37 °C until milk clotting occurred, after which the samples were centrifuged at 13 000 × g for 20 min. The whey was separated from the clot and, after 5 min incubation at 95 °C with reducing SDS sample buffer, the samples were run on SDS-PAGE. Electrophoretic analysis was performed in duplicate.

### *2.10. Densitometry analysis*

Densitometry analysis of bands in SDS-PAGE and immunoblot was performed with Gel-Pro Analyzer 3.1 software (Media Cybernetics, MD).

### *2.11. Stability of kiwifruit extract*

In order to analyze the stability of kiwifruit extract prepared at pH 5.0, two samples of the extract were filtered through a 0.22- µm filter and kept in sterile containers at +4 °C or room temperature (+20 °C) for a period of 2 months. Aliquots were taken after one and after 2 months and analyzed by means of reducing SDS-PAGE (samples were incubated at 95 °C with reducing SDS sample buffer for 5 min prior to analysis) and zymography with gelatin as substrate (samples were prepared by incubation in SDS sample buffer for 1h at 45 °C). Densitometry analysis of obtained protein bands was performed.

## **3. Results and discussion**

### *3.1. Identification of actinidin in kiwifruit extracts*

Three different kiwifruit protein extracts were prepared from a single fruit and the protein content of obtained extracts was analyzed by SDS-PAGE and zymography with gelatin as substrate. All three extracts showed the presence of protein bands that correspond in electrophoretic mobility to the inhibited and activated form of actinidin in SDS-PAGE (Fig. 1A). Cleared bands from active actinidin appeared in all three kiwifruit extract samples when performing zymography with gelatin as substrate (Fig. 1B). There are visible differences between the intensity of active actinidin bands in SDS-PAGE depending on the buffer used for the extraction procedure. Densitometry analysis of SDS-PAGE bands showed that kiwifruit extract prepared at pH 9.0 appears to have the most abundant fraction of active enzyme (100 %

relative band intensity), followed by kiwifruit extract prepared at pH 5.0 (80.07 % relative band intensity), while the extract prepared at pH 7.0 displays the least intensive active actinidin band (57.83 %). To confirm the identity of both the active and inhibited actinidin protein bands, immunoblotting with specific anti-actinidin antibodies was performed. Rabbit anti-actinidin IgG antibodies detected both active and inhibited actinidin in all three kiwifruit extracts (Fig. 2). A difference between the extracts (with regards to the intensity of active and inhibited actinidin bands) that corresponded to the results observed in SDS-PAGE was detected (100 % relative band intensity for extract prepared at pH 9.0, 87 % for extract prepared at pH 5.0, and 44.45 % for kiwifruit extract prepared at pH 7.0).

The phenomenon of active and inactive actinidin having substantially different electrophoretic motilities in SDS-PAGE has been previously reported (Grozdanovic et al., 2012). During electrophoresis, proteins migrate in an electric field in a fashion consistent with their net charge, because net charge is a conformation-dependent characteristic. Independent of charge, electrophoretic mobility is also affected by macromolecular size and shape (Creighton, 1997). It has been shown that the differences in electrophoretic mobility did not arise from autocatalytic cleavage of the inhibited enzyme, and it was, therefore, assumed that the difference noted is derived from some conformational changes (Grozdanovic et al., 2012). Extraction buffers have profound effects on the tertiary and quaternary structures of proteins, since they perturb protein conformational stability because of a complex interplay between various effects (Witzel, Shahzad, Matros, & Muhling, 2011), and it is therefore not uncommon to achieve varying extraction levels for plant proteins depending on the pH and extraction buffer used (Valcu & Schlink, 2006).

### *3.2. Proteolytic activity of extracts*

In order to quantify the varying amount of active actinidin present in the kiwifruit extracts as shown by SDS-PAGE and immunoblotting, protease activity assays with casein as substrate were performed. L-cysteine, a reducing agent, was added to the assay mixture to stimulate proteolytic activity. A standard curve was constructed by measuring the caseinolytic activity of serial dilutions of purified active actinidin, after which the concentration of active actinidin was determined in the different extracts. Kiwifruit extract prepared at pH 9.0 had the highest concentration of active enzyme ( $0.62 \text{ mg mL}^{-1}$ ), followed by the extract at pH 5.0 ( $0.46 \text{ mg mL}^{-1}$ ), while the extract prepared at pH 7.0 had less than half the amount of active enzyme compared to the pH 9.0 extract ( $0.28 \text{ mg mL}^{-1}$ ) (Table 1). These findings correlate with the estimated amount of actinidin in kiwifruit, being from 50 to 60 % of soluble protein content, but show that the extraction buffer influences the amount of active enzyme which is obtained from the pulp of this fruit (Pastorello et al., 1998; Paul et al., 1995). Kiwifruit actinidin is already known to be significantly less proteolytically active towards casein as a substrate than other plant cysteine proteases, such as papain (16× higher specific activity), bromelain and ficin (4× higher specific

activity) (Ha, Bekhit , Carne, & Hopkins, 2012; Rao, 1989). This could be beneficial with regards to the potential use of actinidin as a rennet alternative, since the high proteolytic activity of plant proteases has been one of the major difficulties in the quest for a suitable plant-derived milk coagulant (Egitoa et al., 2007).

### *3.3 Milk-clotting activity of extracts*

Milk-clotting activity of the extracts and purified actinidin were determined according to the method of Berridge. Clotting times obtained for purified actinidin under tested conditions are comparable to those previously reported in literature (Lo Piero, 2011; Alirezai, Aminlari, Gheisari, & Tavana, 2011). Interestingly, the obtained results demonstrate that the highest level of milk-clotting activity was not shown for the kiwifruit extract which contained the highest concentration of proteolytically active enzyme (pH 9.0) but for kiwifruit extract at pH 5.0. Assays with commercial semi-skimmed milk containing 0.5 % fat showed that the extract prepared at pH 5.0 had a milk-clotting activity 18 % higher than the same amount of purified actinidin (Table 1). Kiwifruit extract prepared at pH 7.0 had the lowest clotting activity, as expected from the low amount of active actinidin present in this extract, while the extract at pH 9.0 showed a clotting activity similar to that of purified actinidin. In addition, the extract prepared at pH 5.0 displayed a promising C/P value (milk-clotting and general protease activity ratio) of approximately 0.7, significantly superior to the ratio found for purified actinidin (0.46) or the other two kiwifruit extracts (0.45 and 0.34), and comparable to the value obtained for calf chymosin (1) (Table 1). This may be due to the fact that the pH of the extraction buffer in kiwifruit extract prepared at pH 5.0 is close to the pI value of casein (pI 4.6) (Strange, Van Hekken, & Holsinger, 1994). The C/P value has shown to be crucial in determining the applicability of an enzyme preparation as a rennet substitute, due to avoidance of bitter flavors that develop from high proteolytic activity (Kappeler et al., 2006).

The influence of milk composition on the clotting time observed when employing kiwifruit extract, purified actinidin or calf chymosin was assessed by using commercial semi-skimmed milk with varying fat content (0.5 – 3.8 %). The obtained results indicate that fat percentage in milk shows no significant influence on the observed clotting times (Fig. 3). These results are comparable to those previously reported on the negligible influence of fat percentage in bovine milk in a similar range (0.9 - 3.8 %) on the clotting activity of chymosin (Garnot, Rank, & Olson, 1982).

### *3.4 Electrophoretic analysis of proteolytic and milk-clotting activity*

Hydrolysis of commercial milk by actinidin, chymosin, or kiwifruit extracts was analyzed by reducing SDS-PAGE. The amount of active actinidin in all of the kiwifruit extracts was brought to the same value as in the purified actinidin sample prior to setting up the hydrolysis assay,

ensuring that the ratio of substrate and active enzyme was the same in all samples. The pattern of proteins obtained by proteolytic activity of purified actinidin, or the three different kiwifruit extracts, was comparable to the pattern obtained by the activity of chymosin. All milk preparations showed no visible  $\alpha$ - and  $\beta$ - casein (approx. 33 and 31 kDa, respectively) degradation (Fig. 4). Upon the addition of 17 mM L-cystein to the reaction mixture, a significant difference was observed in the protein patterns. Purified actinidin visibly degraded the  $\alpha$ - and  $\beta$ -casein fractions more than any of the three kiwifruit extracts, out of which the kiwifruit extract prepared at pH 5.0 showed the lowest activity toward milk proteins (Fig. S1 in supplementary material). The obtained results show that the amount of L-cysteine naturally present in bovine milk is not enough to ensure an optimum proteolytic activity of actinidin towards  $\alpha$ - and  $\beta$ -casein.

The composition of whey and coagulum obtained by the milk-clotting action of purified actinidin and the kiwifruit extracts was also analyzed by means of reducing SDS-PAGE and compared to the action of calf chymosin. An equal amount of active actinidin was added to all samples. All kiwifruit extracts, as well as purified actinidin, produced a coagulum with a protein composition virtually identical to that of calf chymosin, asserting once again the possible use of actinidin in the dairy industry.

### *3.5 Stability of kiwifruit extract prepared at pH 5.0*

An important aspect in the potential use of kiwifruit extract in the dairy industry is the shelf- life of the extract. In order to test the instability, samples of kiwifruit extract prepared at pH 5.0 were maintained at room temperature and at +4 °C for a period of 2 months. After this period, the protein profile of the samples was analyzed by SDS-PAGE and the proteolytic activity of actinidin in the samples was assessed by zymography with gelatin. The obtained results displayed no differences neither in protein profile or proteolytic activity between the control sample and the samples after 1 or 2 months of storage (Fig. S2 in supplementary material).

## **Conclusions**

Kiwifruit extract prepared at pH 5.0 showed comparable patterns of coagulum and whey proteins to those obtained by chymosin, while at the same time displaying a promising C/P value, 30% lower than that of chymosin. Kiwifruit biomass left over from the food industry has a potential to be inexpensively and efficiently transformed into a plant derived milk- coagulation agent and additional studies about the quality of milk coagulum formed with the use of such an agent should be performed to confirm its usefulness in the dairy industry.



## Acknowledgment

This work was supported by the Ministry of Education and Science, Republic of Serbia (Grant no. 172049).

## References

Alirezaei, M., Aminlari, M., Gheisari, H.R., & Tavana, M. (2011). Actinidin: A promising milk coagulating enzyme. *European Journal of Food Research & Review*, 1, 43-51.

Arcus, A.C. (1959). Proteolytic enzyme of *Actinidia chinensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 33, 242-244.

Berridge, N.J. (1952). An improved method of observing the clotting of milk containing rennin. *Journal of Dairy Research*, 19, 328-329.

Boland, M.J., & Hardman, M.J. (1972). Kinetic studies on the thiol protease from *Actinidia chinensis*. *FEBS letters*, 27, 282-284.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248- 254.

Cavalcanti, M.T.H., Teixeira, M.F.S., Lima Filho, J.L., & Porto, A.L.F. (2004). Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardiosis* sp. *Bioresource Technology*, 93, 29-35.

Ciardiello, M.A., Giangrieco, I., Tuppo, L., Tamburrini, M., Buccheri, M., Palazzo, P., Bernardi, M.L., Ferrara, R., & Mari, A. (2009). Influence of the natural ripening stage, cold storage, and ethylene treatment on the protein and IgE-binding profiles of green and gold kiwi fruit extracts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 1565-1571.

Creighton, T.E. (1997). *Protein Structure: A practical approach*. (2nd ed.) Oxford and New York: IRL Press at Oxford University Press.

Drapeau, G.R. (1976). Protease from *Staphylococcus aureus*. In: L. Lorand (ed.), *Methods in Enzymology* (pp. 469-475). New York: Academic Press.

- Egitoa, A.S., Girardet, J.M., Lagunaa, L.E., Poirsonc, C., Molle, D., Micloc, L., Humbertc, G., & Gaillardc, J.L. (2007). Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k-casein. *International Dairy Journal*, *17*, 816–825.
- Garnot, P., Rank, T.C., & Olson, N.F. (1982). Influence of protein and fat contents of ultrafiltered milk on rheological properties of gels formed by chymosin. *Journal of Dairy Science*, *65*, 2267-2273.
- Goulal, A.M., & Adamopoulos, K.G. (2011). Rheological Models of Kiwifruit Juice for Processing Applications. *Journal of Food Processing & Technology*, *2*, 106.
- Grozdanovic, M., Popovic, M., Polovic, N., Burazer, L., Vuckovic, O., Atanaskovic- Markovic, Lindner, B., Petersen, A., & Gavrovic- Jankulovic, M. (2012). Evaluation of IgE reactivity of active and thermally inactivated actinidin, a biomarker of kiwifruit allergy. *Food and Chemical Toxicology*, *50*, 1013-1018.
- Ha, M., Bekhit, A.E.A., Carne, A., & Hopkins, D.L. (2012). Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. *Food Chemistry*, *134*, 95-105.
- Heimgartner, U., Pietrzak, M., Geertsen, R., Brodelius, P., da Silva Figueiredo, A.C., & Pais, M.S.S. (1990). Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry*, *29*, 1405-1410.
- Han, J., Morton, J.D., Bekhit, A.E.D., & Sedcole, J.R. (2009). Pre-rigor infusion with kiwifruit juice improves lamb tenderness. *Meat Science*, *82*, 324–330.
- Harlow, E., & Lane, D. (1998). *Antibodies: A Laboratory Manual*. (1st ed.). New York: Cold Spring Harbor.
- Jung, K. A., Song, T. C., Han, D., Kim, I.H., Kim, Y. E., & Lee, C.H. (2005). Cardiovascular protective properties of kiwifruit extracts in vitro. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *28*, 1782-1785.
- Kappeler, S.R., van den Brink, H.J.M., Rahbek-Nielsen, H., Farah, Z., Puhon, Z., Hansen, E., & Johansen, E. (2006). Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *342*, 647–654.

Katsaros, G.I., Tavantzis, G., & Taoukis, P.S. (2010). Production of novel dairy products using actinidin and high pressure as enzyme activity regulator. *Innovative Food Science and Engineering Technologies*, 11, 47-51.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Larocca, M., Rossano, R., & Riccio, P. (2010). Analysis of green kiwi fruit (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) proteinases by two-dimensional zymography and direct identification of zymographic spots by mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 2411-2418.

Lo Piero, A.R., Puglisi, I., & Petrone, G.V. (2011). Characterization of the purified actinidin as a plant coagulant of bovine milk. *European Food Research and Technology*, 233, 517–524.

Lopes, A., Teixeira, G., Liberato, M.C., Pais, M.S., & Clemente, A. (1988). New vegetal sources for milk-clotting enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 5, 63–68.

McDowall, M.A. (1970). Anionic proteinase from *Actinidia chinensis*. Preparation and properties of the crystalline enzyme. *European Journal of Biochemistry*, 14, 214-221.

Pastorelo, E. A., Conti, A., Pravettoni, V., Farioli, L., Rivolta, F., Ansaloni, R., Ispano, M., Incorvaia, C., Giuffrida, M.G., & Ortolani, C. (1998). Identification of actinidin as the major allergen of kiwi fruit. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 101, 531-537.

Paul, W., Amiss, J., Try, R., Praekelt, U., Scott, R., & Smith, H. (1995). Correct processing of the kiwifruit protease actinidin in transgenic tobacco requires the presence of the C-terminal propeptide. *Plant Physiology*, 108, 261-268.

Puglisi, I., Petrone, G., & Lo Piero, A.R. (2012). Role of actinidin in the hydrolysis of the cream milk proteins. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 449–452.

Rao, N.M. (1989). Cysteine protease inhibitors from banana (*Musa paradisiaca*). *Current Science*, 58, 1320- 1323.

Roseiro, L.B., Barbosa, M., Mames, J., & Wilbey, A. (2003). Cheesemaking with vegetable coagulants – the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 56, 76-85.

Rush, E.C., Patel, M., Plank, L. D., & Ferguson, L. R. (2002). Kiwifruit promotes laxation in the

elderly. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 11, 164-168.

Saha, B.C., & Hayashi, K. (2001). Debittering of protein hydrolysates. *Biotechnology Advances*, 19, 355-370.

Sumantha, A., Larroche, C., & Pandey, A. (2006). Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. *Food Technology and Biotechnology*, 44, 211–220.

Silva, S.V., & Malcata, F.X. (2005). Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. *Food Chemistry*, 89, 19-26.

Strange, E.D., Van Hekken, D.L., & Holsinger, V.H. (1994). Effect of sodium chloride on the solubility of caseins. *Journal of Dairy Science*, 77, 1216-1222.

Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76, 4350 - 4354.

Valcu, C.M., & Schlink, K. (2006). Efficient extraction of proteins from woody plant samples for two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*, 6, 4166-4175.

Witzel, K., Shahzad, M., Matros, A., Mock, H.P., & Muhling, K.H. (2011). Comparative evaluation of extraction methods for apoplast proteins from maize leaves. *Plant methods*, 7, 48.

Yang, H., Lee, Y.C., Han, K.S., Singh, H., Yoon, M., Park, J.-H., Cho, C.-W., & Cho, S. (2013). Green and gold kiwifruit peel ethanol extracts potentiate pentobarbital-induced sleep in mice via a GABAergic mechanism. *Food Chemistry*, 136, 160–163.

## Figures

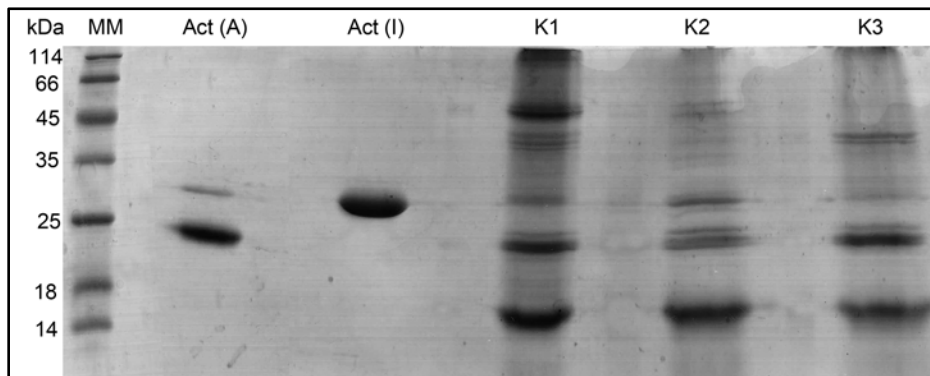


Fig. 1. (A) SDS-PAGE analysis of kiwifruit extracts: MM, molecular markers; Act (A), purified actinidin activated with L- cys buffer; Act (I), purified actinidin inhibited with E64; K1, kiwifruit extract prepared with citrate buffer at pH 5.0; K2, kiwifruit extract prepared with phosphate buffer at pH 7.0; K3, kiwifruit extract prepared with bicarbonate buffer at pH 9.0.

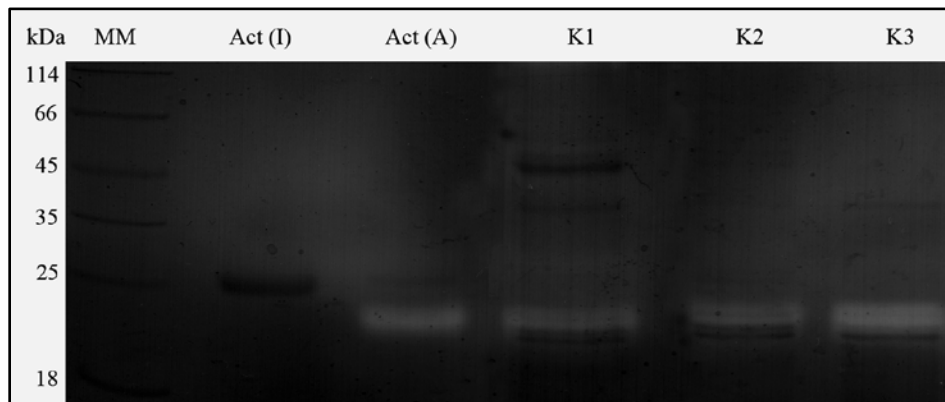


Fig. 1. (B) Gelatin zymogram of kiwifruit extracts: MM, molecular markers; Act (I), purified actinidin inhibited with E64; Act (A), purified actinidin activated with L- cys buffer; K1, kiwifruit extract prepared with citrate buffer at pH 5.0; K2, kiwifruit extract prepared with phosphate buffer at pH 7.0; K3, kiwifruit extract prepared with bicarbonate buffer at pH 9.0.

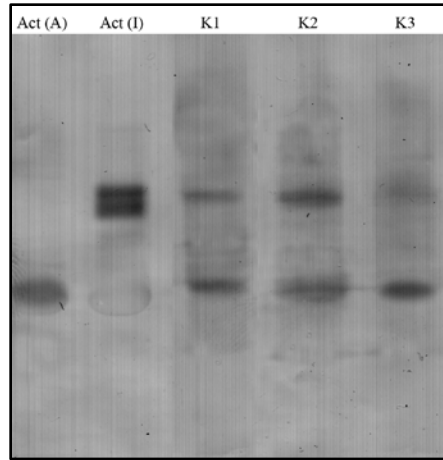


Fig. 2. Immunoblot with rabbit anti-actinidin antibodies: Act (A), purified actinidin activated with L- cyst buffer; Act (I), purified actinidin inhibited with E64; K1, kiwifruit extract prepared with citrate buffer at pH 5.0; K2, kiwifruit extract prepared with phosphate buffer at pH 7.0; K3, kiwifruit extract prepared with bicarbonate buffer at pH 9.0.

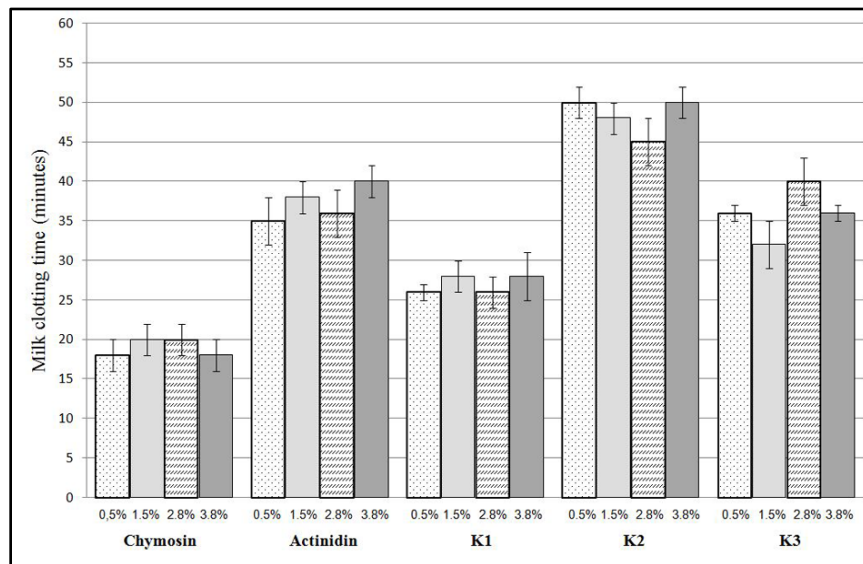


Fig. 3. Dependence of milk-clotting time on the % of fat in the milk preparation for calf chymosin, actinidin, and three kiwifruit extracts (K1, extract prepared at pH 5.0; K2, extract prepared at pH 7.0; K3, extract prepared at pH 9.0).

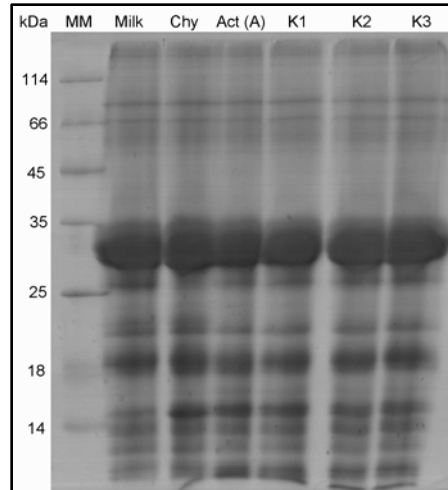


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of proteolytic activity on total milk: Milk, untreated bovine milk; Chy, milk hydrolyzed with chymosin; Act (A), milk hydrolyzed with purified actinidin; K1, milk hydrolyzed with kiwifruit extract prepared with citrate buffer at pH 5.0; K2, milk hydrolyzed with kiwifruit extract prepared with phosphate buffer at pH 7.0; K3, milk hydrolyzed with kiwifruit extract prepared with bicarbonate buffer at pH 9.0

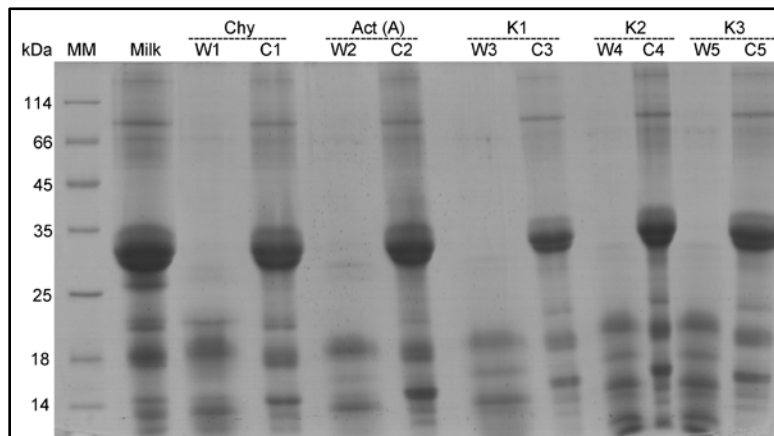


Fig. 5. SDS-PAGE analysis of milk coagulum and whey: Milk, untreated bovine milk; Chy, whey (W1) and coagulum (C1) produced by the action of chymosin; Act (A), whey (W2) and coagulum (C2) produced by the action of purified actinidin; K1, whey (W3) and coagulum (C3) produced by the action of kiwifruit extract prepared with citrate buffer at pH 5.0; K2, whey (W4) and coagulum (C4) produced by the action of kiwifruit extract prepared with phosphate buffer at pH 7.0; K3, whey (W5) and coagulum (C5) produced by the action of kiwifruit extract prepared with bicarbonate buffer at pH 5.0.

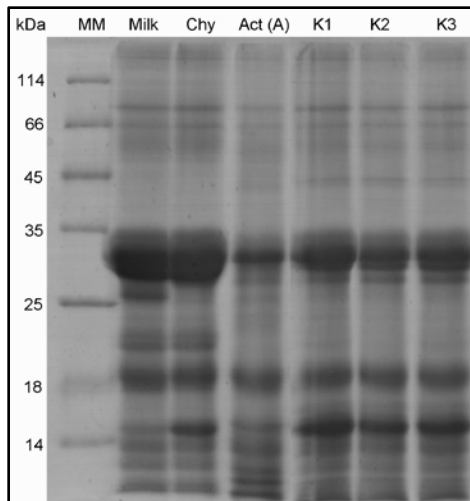


Fig. S1. (A) SDS-PAGE analysis of the stability of kiwifruit extract prepared at pH 5.0: 1a, extract immediately after preparation; 2a, after 1 month at +4 °C; 3a, after 1 month at RT; 4a, after 2 months at +4 °C; 5a, after 2 months at RT. (B) Zymogram with gelatin as substrate of kiwifruit extract prepared at pH 5.0: 1b, immediately after extraction ; 2b, after 1 month at +4 °C; 3b, after 1 month at RT; 4b, after 2 months at +4 °C; 5b, after 2 months at RT.

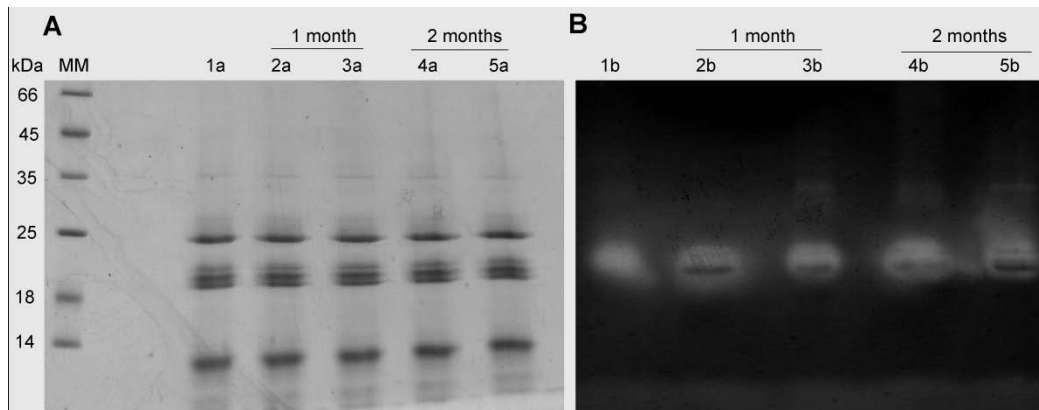


Fig. S2. SDS-PAGE analysis of proteolytic activity on total milk with the addition of L-cys to the assay: Milk, untreated milk; Chy, milk hydrolyzed with chymosin; Act (A), milk hydrolyzed with purified actinidin; K1, milk hydrolyzed with kiwifruit extract prepared with citrate buffer at pH 5.0; K2, milk hydrolyzed with kiwifruit extract prepared with phosphate buffer at pH 7.0; K3, milk hydrolyzed with kiwifruit extract prepared with bicarbonate buffer at pH 9.0.



# **Actinidin, a specific biomarker of kiwifruit allergy, exerts proteolytic activity upon treatment in the simulated gastrointestinal environment**

Milica M. Grozdanovic<sup>a</sup>, Ivana Aleksic<sup>b</sup>, Lidija Burazer<sup>b</sup>, Uros Andjelkovic<sup>c</sup>, Arnd Petersen<sup>d</sup>, Marija Gavrovic-Jankulovic<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 12, Belgrade, Serbia

<sup>b</sup> Torlak Institute of Virology, Vaccines and Sera, Vojvode Stepe 458, 11221 Belgrade, Serbia

<sup>c</sup> Institute for Chemistry, Technology and Metallurgy, Department of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 12 - 16, 11000 Belgrade, Serbia

<sup>d</sup> Division of Cellular and Molecular Allergology, Research Center Borstel, Parkallee 22, Borstel, Germany

\* Corresponding author: Marija Gavrovic-Jankulovic, Studentski trg 12-16, 11 000 Belgrade, Serbia

Tel: +381 11 3336661

Fax : +381 11 2184 330

e-mail: mgavrov@chem.bg.ac.rs

## **Abstract**

Structural integrity and biological activity of cysteine protease actinidin under conditions of simulated gastro-intestinal fluid (SGF) was investigated. Actinidin isolated from kiwifruit under native conditions retains its primary structure and proteolytic activity after 2 h of simulated gastric digestion, followed by 2 h of simulated intestinal digestion, as assessed by gelatine zymography and ESI-TOF analysis. Rocket immunoelectrophoresis showed that actinidin preserves immunological reactivity after exposure to digestive conditions. E64-inhibited actinidin was degraded under simulated SGF conditions and different near CD-UV spectra were displayed by active and E64-inhibited enzyme, indicating that they have different conformations which seem to be a contributing factor for susceptibility to digestion. These findings indicate that actinidin may be capable of reaching the intestinal mucosa in a proteolytically active and

immunogenic state, which may be a contributing factor to the allergenic potency of kiwifruit, and could shed light on the process of sensitization via the oral route.

**Keywords:** Actinidin, Digestion stability, Food Allergen, Immunoreactivity, Kiwifruit

## 1. Introduction

Since its first appearance on the fruit market in 1960 (Lucas, Lewis & Hourihane, 2003) kiwifruit has become very popular due to its pleasant taste and high content of vitamin C. Several varieties of kiwifruit have been included in the diet, with one of the more popular being green kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var. Hayward), rich in content of proteolytically active enzyme actinidin, whereas others, such as gold kiwifruit (*Actinidia chinensis* var. Hort16A), possess only trace amounts of this enzyme in their fruit tissue (Nieuwenhuizen et al., 2007).

Kiwifruit is an example of the possible consequences encountered by introducing a novel item into the human diet. In 30 years, from the first report of allergic reaction in 1981 (Fine, 1981), kiwifruit has become one of the top ten food allergy sources, as shown in recent studies from Finland, Sweden, and France (Bublin et al., 2010). Actinidin (Act d 1) is a major allergen of kiwifruit (Pastorello et al., 1998); it is the most abundant of the 11 kiwi allergens recognized by the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee ([www.allergen.org](http://www.allergen.org)) and has been identified as a marker molecule of kiwifruit allergy with diagnostic significance (Bublin et al., 2010).

Actinidin (EC 3.4.22.14) belongs to the family of cysteine proteases and has a wide pH activity range (4-10) and wide substrate specificity. It most strongly hydrolyzes the amide and ester bonds at the carboxyl side of lysine residues (Arcus, 1959; McDowall, 1970; Boland & Hardman, 1972). Actinidin shows sequence homology with cysteine protease such as papain, chymopapain, ficin, and stem and fruit bromelain and is accumulated to very high concentrations in the fruit, where it constitutes up to 60% of soluble protein.

Actinidin is encoded as a pre-proprotein with an endoplasmic reticulum targeting signal peptide and N- and C- terminal propeptides. The enzyme is likely to be synthesized as a zymogen and further processed into an active form after secretion or sequestration in the cell (Nieuwenhuizen et al., 2007). It consists of a single polypeptide chain made up of 220 residues and has a molecular weight of 23 kDa. The 3D structure revealed that its polypeptide chain is folded into two domains of approximately equal size. Amino acid residues Cys25 (L domain) and His162 (R domain), situated on either side of the inter-domain cleft (Yogavel et al., 2010), constitute a catalytic ion pair (a cysteinyl *thiol-histidinyll imidazole dyad*).

It has been postulated that in order to sensitize the organism through an oral route, food allergens must reach the gastrointestinal mucosa in order to interact with the immune system. In light of this, it is important to understand the structural and biological features of allergens which enable them to resist denaturation and proteolytic degradation during their passage through the GIT. The properties that are, in general, shared by food allergens are their structural stability and high concentration in the food source (Astwood, Leach & Fuchs, 1996; Wickham, Faulks & Mills, 2009; Bublin et al., 2008). Additionally, it has been observed that inhalatory allergen proteases are able to induce changes in the permeability of the pulmonary epithelium (Runswick, Mitchell, Davies, Robinson & Garrod, 2007), and a recent study showed that actinidin is, likewise, capable of inducing protease-dependent changes in the morphology and adhesion of T84 intestinal cells, which could be a contributing factor in the process of allergic monosensitization to kiwifruit (Cavic, Grozdanovic, Bajic, Srdic- Rajic, Andjus & Gavrovic-Jankulovic, 2012).

In order to be able to induce protease-dependent changes to the intestinal epithelium and to sensitize via the oral route it is necessary that actinidin retains proteolytic activity and immunogenicity in conditions of the digestive tract. However, actinidin activity in kiwifruit is known to vary markedly depending on fruit growth stage, postharvest storage, and the part of the fruit being tested (Kaur, Rutherford, Moughan, Drummond & Boland, 2010; Ciardiello et al., 2009). Plant-derived food extracts contain several interfering substances such as polyphenols, carbohydrates and pigments that could influence protein structure and function (Larocca, Rossano & Riccio, 2010). It has been shown that actinidin obtained from kiwifruit extract under native conditions represents a mixture of inactive and active enzyme that have different migration rates on SDS-PAGE (Grozdanovic et al., 2012). Therefore, it was interesting to explore the digestion stability of biologically active actinidin and to compare it with the inactive enzyme present in kiwifruit extracts.

We describe an *in vitro* study that investigates the stability of proteolytically active actinidin in the simulated acidic and basic environments of the stomach and intestine. In addition, structural integrity of actinidin upon exposure to the simulated digestive conditions was assessed by mass spectrometry and antigenicity of actinidin upon the treatment was evaluated by electroimmunoassay. The existence of structural differences between active and E-64 inactivated actinidin that probably influenced the digestion stability of actinidin was confirmed by circular dichroism (CD) spectroscopy.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Isolation of actinidin**

Actinidin was isolated from the pulp of fresh kiwifruit (*Actinidia deliciosa*, Hayward cv) purchased at a local store. A total protein extract was obtained by homogenization of kiwifruit (50 g) in 100 mL of 0.1 M sodium-citrate buffer, pH 5.0. Following extraction (2h at 4°C), the

slurry was centrifuged ( $3000 \times g$ , 30 minutes) and dialyzed overnight against the extraction buffer. Purification of actinidin from the obtained protein extract (120 mL) was achieved by a two step ion-exchange chromatography procedure. The first step consisted of loading the extract on a QAE-Sephadex A-50 column (100 mm  $\times$  27 mm) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), pre-equilibrated with 0.1 M sodium citrate buffer, pH 5.0. The unbound fraction was collected, concentrated by ultrafiltration and extensively dialyzed against 20 mM TRIS-HCl buffer, pH 8.0. In the second step the protein sample (40 mL) was applied on a SP-Sephadex C-50 ion-exchange column (125 mm  $\times$  15 mm) (Pharmacia-Biotech, Uppsala, Sweden) equilibrated in the dialysis buffer and the column was eluted by a pH step gradient ranging from pH 5 to pH 2.5 with 8 column volumes. A total of about 10 mg of actinidin was isolated from 120 mL of the extract. The identity of actinidin was confirmed by N-terminal amino acid sequencing and the purity of the protein was estimated to be  $> 95\%$  by densitometry analysis of SDS-PA gel. Densitometry analysis of bands in SDS-PA gel was performed with *Gel-Pro Analyzer 3.1* software (Media Cybernetics, MD).

## **2.2. Production of polyclonal antisera**

Purified actinidin was employed for production of polyclonal antisera. Two rabbits were immunized according to the protocol described by Harlow and Lane (1998). In brief, 0.25 mL of actinidin ( $0.50 \text{ mg mL}^{-1}$ ) was mixed with 0.25 mL FCA (Freund's complete adjuvant) for the first immunization. Every 30 days, for 6 months, the rabbits were boosted with a mixture of 0.25 mL of actinidin and 0.25 mL of incomplete Freund' adjuvant. Each rabbit was subcutaneously immunized with 0.50 mL of the emulsion. After bleeding sera were collected and stored at  $-20^\circ\text{C}$  before use. The immunization protocol was approved by the Ethics Committee of the Torlak Institute of Virology, Vaccines and Sera.

## **2.3. *In vitro* digestion under conditions of SGF and SIF**

For the *in vitro* digestion under conditions of simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF), actinidin ( $0.042 \mu\text{M}$ ) was activated in buffer A (20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 52 mM L-Cys, 2 mM EDTA, pH 6.5) at  $45^\circ\text{C}$  for 1 h. Actinidin inhibited with E-64 inhibitor (MW 357,41 Da) was used as a negative control. For preparation of the actinidin – E-64 complex, activated actinidin ( $0.042 \mu\text{M}$ ) was mixed with an equimolar amount of E-64 ( $0.042 \mu\text{M}$ , AppliChem, GmbH, Darmstadt, Germany). Homogeneity of actinidin preparations were analyzed by isoelectric focusing (IEF). In brief, the actinidin samples ( $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) were separated under native conditions by isoelectric focusing in 5% polyacrylamide gel containing 2.4% ampholites (pH 3.5-10, Pharmacia) according to Bollag, Rozycki, and Edelstein (1996).

Stability of actinidin under conditions of SGF and SIF was examined according to Moreno *et al.* (2005), with some modifications. In brief, digestion was performed under conditions of SGF, followed by conditions of SIF. To  $225 \mu\text{L}$  ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) of actinidin, hydrochloric acid (HCl) was

added to a final pH of 2.0. Pepsin (0.01 mg, P7012, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), previously dissolved in 0.7% HCl, was added to a final concentration of 1% (w/v). The reaction mixture was incubated for 2 h at 37 °C with agitation, with aliquots taken at 0, 15, 30, 60, and 120 min. Digestion was stopped by raising the pH with addition of 2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> to the final concentration of 2% w/v. After 2 h, the protein sample was dialyzed overnight against a 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> buffer, pH 8.2. Trypsin (0.02 mg, T-8642, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) was added up to 2% (w/v). The reaction mixture was incubated at 37°C for two hours. Aliquots were taken at 0, 15, 30, 60, and 120 min, for further analysis. To inhibit further activity of trypsin all of the aliquoted samples were incubated for 10 min at 95°C in SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2.0% SDS, 10% glycerol, 0.02% bromphenol blue). Bovine serum albumin (BSA, 1 mg mL<sup>-1</sup>) was used as a control of pepsin and trypsin activity and treated under the same conditions. All the experiments were performed twice.

#### **2.4. SDS-PAGE and one-dimensional gelatin gel zymography**

Digestion stability of actinidin samples under conditions of SGF and SIF was assessed by SDS-PAGE under non-reducing conditions (Laemmli, 1970). Before migration on 12% SDS-PAGE, samples were incubated in SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2.0% SDS, 10% glycerol, 0.02% bromphenol blue) for 5 min at 95 °C and centrifuged at 10,000 ×g for 1 min. After electrophoresis, the separated proteins were visualized following staining with Coomassie Brilliant Blue (CBB-R250, Serva, Heidelberg, Germany).

Proteolytic activity of actinidin after SGF and SIF treatment was tested by one-dimensional gelatin gel zymography. Aliquots of actinidin taken after 0, 15, 30, 60 and 120 min of SGF and SIF treatment, respectively, were mixed with electrophoresis non-reducing sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2.0% SDS, 10% glycerol, 0.02% bromphenol blue) and incubated at 45 °C for 1h. The samples were separated under non-reducing conditions in a SDS-PA gel copolymerized with 1 g L<sup>-1</sup> gelatin. After electrophoresis, the gel was incubated in a 100 mM potassium phosphate buffer, pH 6.5 with 26 mM L-cysteine and 1 mM EDTA for 16 h, followed by staining with Coomassie Blue (Serva). All SDS- PAGE experiments were performed in triplicate.

#### **2.5. Mass spectrometry**

The molecular mass of purified actinidin was determined by matrix assisted desorption/ionization mass spectrometry (MALDI TOF-MS) with a Reflex III (Bruker-Daltonik, Bremen) in the positive ion mode according to the previously described procedure (Grozdanovic et al., 2012).

Structural integrity of actinidin following digestion treatment was assessed by mass spectrometry of samples taken after 0 and 120 min of SGF treatment and after 120 min of SIF treatment. Mass

spectra were recorded on Electron Spray Ionization Time Of Flight Mass Spectrometer (G1969A, Agilent Technology, Santa Clara, CA, United States) in positive ion mode with capillary voltage of 4 kV and fragmentor voltage of 150 V at 350°C. The scan range was set from 400 to 3000 *m/z*. Agilent MassHunter Workstation software was used for data acquisition and Analyst QS was used for data processing. Mass analysis of actinidin following digestion treatment was performed twice.

## **2.6. Rocket immunoelectrophoresis**

Rabbit anti-actinidin antibodies (500 µL) were added to 7.2 mL of 1% liquid agarose solution in 50 mM sodium barbiturate buffer, pH 8.6, and the mixture was poured over a glass plate (11×5 cm<sup>2</sup>). After solidification, wells (1.5 mm in diameter) were bored in the gel. The following samples (6 µL of each) of active and E64 inhibited actinidin were separately added to the appropriate wells: control sample (actinidin incubated under conditions of SGF followed by conditions of SIF without addition of pepsin or trypsin), actinidin after 0 min of SGF treatment, actinidin after incubation for 2 h in SGF, and actinidin after incubation for 2 h in SIF. Electrophoresis was run in 50 mM sodium barbiturate buffer, pH 8.6, for 16 h at a constant voltage of 12V cm<sup>-1</sup>. Following this, the gels were washed in three changes of saline solution over 4 hours. Finally, the gels were dried and stained in Coomassie Blue (Serva). The experiment was repeated twice.

## **2.7. Circular dichroism (CD) spectroscopy**

Actinidin samples for measurement of CD spectra were incubated in activation buffer A (20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 52 mM L-Cys, 2 mM EDTA, pH 6.5) for 1h at 45 °C, after which they were dialyzed overnight against a 10 mM phosphate buffer, pH 6.5. The E64-actinidin complex was prepared by adding an equimolar amount of E64 inhibitor to the activated sample, followed by an additional overnight dialysis against the 10 mM phosphate buffer, pH 6.5. CD measurements were made on a J-815 spectrometer (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) with a 0.1 cm path length cell at 25 °C. Data was collected at 1 nm intervals (20 nm min<sup>-1</sup>) with a sensitivity of ± 200 mdeg. Measurements in the near-ultraviolet region (260-320 nm) were made on protein solutions of 1 mg mL<sup>-1</sup>. Spectra represent the average of four accumulations and were baseline-corrected by subtraction of blank buffer. Spectra are presented in units of mean residue ellipticity.

# **3. Results**

## **3.1. Isolation and characterization of actinidin**

Actinidin was isolated from kiwifruit extract under native conditions by ion-exchange chromatography. In MALDI-TOF analysis actinidin revealed a molecular mass of 23883.1 Da, indicating that the enzyme was in its mature form (220 amino acids). N-terminal amino acid

sequence LPSYVD confirmed the identity of mature actinidin (UniProt ID: A5HII1). IEF analysis of both active actinidin and E64-actinidin complex revealed one band with *pI* 3.54 (Figure 1) indicating that no changes in net charge on the protein surface had occurred upon actinidin inactivation.

### **3.2. *In vitro* digestibility of actinidin**

Protein stability of actinidin and actinidin-E-64 complex under conditions of SGF and SIF was monitored by SDS-PAGE. Interestingly, a fairly different electrophoretic mobility of actinidin and actinidin-E-64 complex in SDS-PAGE was observed, indicating a difference in protein conformations (Figure 2A). Both protein bands were confirmed as actinidin by N-terminal microsequencing and mass spectroscopy. The actinidin-E-64 complex was fully degraded after 60 min of incubation under the conditions of SGF (Figure 2A) and samples analyzed by SDS-PAGE show the disappearance of the inhibited actinidin band over time and the appearance of peptides as products of pepsin digestion. Actinidin without inhibitor showed resistance to pepsin under the conditions of SGF even after 120 minutes of incubation (Figure 2A). The same sample was then treated under conditions of SIF. An actinidin band was detected in SDS-PAGE after 120 min of incubation with trypsin (Figure 2B). Since trypsin activity was stopped by thermal treatment of samples at 95 °C for 10 min, active actinidin in the samples was also inhibited and now travelled as a band above 25 kDa in SDS-PAGE. The sharp band of about 23 kDa, visible just below the actinidin band, belongs to trypsin. Pepsin is no longer visible in the samples, and was presumably digested by the activity of trypsin. The BSA control sample was completely digested during the 2h of pepsin and/or 2h of trypsin treatment (not shown).

### **3.3. Biological activity of actinidin**

To assess biological activity of actinidin after SGF and SIF treatment zymography with gelatin was performed. The intensity of cleared bands decreased with the time of incubation; however gelatinolytic activity of actinidin was detectable in all analyzed time points, including after 120 min of incubation with pepsin in SGF (Figure 3a). Proteolytic activity of actinidin was also detected by zymography after 120 min of incubation with trypsin in SIF conditions (Figure 3b).

### **3.4. Mass spectrometry of actinidin following SGF and SIF treatment**

Results of digestion stability obtained by SDS-PAGE were confirmed by ESI-TOF analysis. Mass spectrometry of active actinidin samples revealed an intact primary structure after 120 min of SGF treatment (Figure 4B).

The relative intensity of peaks remained the same as compared to the control sample taken after 0 min of SGF treatment (Figure 4A). The relative intensity of actinidin peaks decreased, but they were still present even after 120 min of SIF treatment (Figure 4C). In contrast to active actinidin,

inhibited actinidin spectra revealed that a significant loss of primary structure occurred between 0 min (Figure 4D) and 120 min (Figure 4E) of SGF treatment.

### **3.5. Immunoreactivity of actinidin after SGF and SIF treatment**

In order to evaluate the ability of actinidin to bind IgG after SGF and SIF treatment rocket immunoelectrophoresis was performed with anti-actinidin rabbit antibodies. Characteristic immunoprecipitation patterns were formed with active actinidin samples, visible even after 120 min of incubation in conditions of SGF and, also, after 120 min of SIF treatment (Figure 5A), although the surface below the rockets was reduced compared to the control, indicating a lower level of antigen in the tested samples. No visible immunoprecipitates were formed between the E64-actinidin and anti-actinidin antibodies after SGF or SIG treatment (Figure 5B).

### **3.6. CD Spectroscopy**

CD spectra were recorder in both the far and near- ultraviolet region. Far UV spectra of actinidin and the E64-actinidin complex are virtually superimposable (Figure 6A). Since the CD signal in the spectral region of 185 - 250 nm mainly depends on the secondary structures of a protein, it is clear no disruption at this level of protein structure has occurred upon binding of the E64 inhibitor. Near UV CD spectroscopy was performed to assess the tertiary structure of actinidin (Figure 6B). In comparison to uninhibited actinidin the actinidin-E64 complex spectrum shows a loss of the distinct 287 nm tryptophan peak, as well as a red shift in the tyrosine peak from 275 nm to 277 nm. The observed dissimilarities in the two spectra reflect a change in the environment of the aromatic amino acid side chains between the active and inhibited actinidin. Since the CD signal in the spectral region of 260 - 320 nm depends on the tertiary structure of a protein, the observed shift in position and shape of peaks implies a conformational change in actinidin upon binding of the E64 inhibitor.

## **4. Discussion**

In this study the structural stability of proteolytically active actinidin and actinidin–E-64 complex was evaluated under simulated gastric and intestinal conditions. Additionally, immunoreactivity of actinidin samples after simulated gastric and intestinal digestion was assessed. To our knowledge, the impact of biological reactivity of actinidin to its digestion stability has not been studied so far.

Various factors such as fruit growth stage, postharvest storage, presence of cysteine protease inhibitor, and isolation method may influence actinidin activity in kiwifruit (Kaur et al., 2010). An unprotected active-site cysteine residue can undergo various covalent modifications which may regulate protein activity (Reddie & Carroll, 2008). The presence of both an active and inactive enzyme form has been detected in kiwifruit extract (Grozdanovic et al., 2012). In order to assess the impact of biological activity on its digestion stability, in this work actinidin was



isolated from kiwifruit extract under native conditions. Following isolation, and prior to further analysis, the enzyme was activated in the presence of L-cysteine. In addition, a sample of biologically active actinidin was inhibited with E-64, 1-(L-*trans*-epoxysuccinylleucylamino)-4-guanidinobutane, a potent, highly selective and irreversible inhibitor of many cysteine proteases, including actinidin (Watts & Brocklehurst, 2003). The actinidin-E-64 complex is formed through a covalent linkage between the  $\gamma$  sulfur of the active-site cysteine 25 and the carbon atom of the oxiran moiety in position alpha to carboxyl group of the inhibitor.

Activated actinidin showed resistance to pepsin and trypsin under conditions of SGF and SIF, retaining its proteolytic activity, while actinidin inhibited with E-64 was digested after 60 minutes of incubation in SGF. In a study by Bublin *et al.* (2008) it was revealed that only about 20 % of actinidin primary structure remained intact after 1 hour of gastric digestion. We failed to detect actinidin aggregation after contact with SGF as was found in their study. The explanation for such discrepancies could be that most of the tested actinidin in their study was in an inactive form, since they used a different method for protein purification (covalent chromatography) and the enzyme revealed a molecular mass of 27 kDa. Additionally, we found that the active enzyme retained antigenicity by forming immunoprecipitates with anti-actinidin rabbit antibodies following digestion treatment, while the inactivated enzyme did not due to degradation during the SGF incubation.

The employed isolation protocol yielded a homogenous protein species with an acidic pI of 3.5. Although both active and inactivated actinidin revealed similar net charge, the conformational differences between these two forms, as shown by near UV CD spectroscopy, probably influenced their electrophoretic mobility in SDS-PAGE. The loss of sharp peaks in the near UV region could indicate a possible loosening of the protein structure upon binding of the inhibitor (Kelly & Price, 2000).

These results indicate a need for caution when employing a common kiwifruit extract preparation protocol that includes the addition of E-64 inhibitor. Kiwifruit extracts prepared in such a manner might exhibit two varying molecular mass bands for actinidin in SDS-PAGE, depending on the active or inactive enzyme content. Additional structural examinations of active and inactivated actinidin are necessary in order to reveal the differences between the two molecules that induce different susceptibility to the employed digestive enzymes.

Kiwifruit has become an important cause of plant food allergy both in children and adults (Lucas, Grimshaw, Collins, Warner & Hourihane, 2004; Mattila, Kilpelainen, Terho, Koskenvuo, Helenius & Kalimo, 2003). Actinidin is considered as a marker allergen for genuine sensitization to kiwifruit (Bublin *et al.*, 2011). There is a general hypothesis that food allergens must exhibit sufficient structural integrity in the gastrointestinal tract to be able to reach the intestinal mucosa. Recently it has been shown that biologically active actinidin induced damage

of the epithelial monolayer of T84 intestinal epithelial cells (Cavic et al., 2012). In this view our results are very important, since they show that proteolytically active actinidin is resistant to SGF and SIF and thus can influence /increase the uptake of complete actinidin molecules, as well as increase the uptake of other barely degraded proteins / allergens.

## Acknowledgment

This work is supported by the Ministry of Education and Science, Republic of Serbia (Grant no. 172049) and the European Commission (Framework 7, project RegPot FCUB ERA, GA No. 256716).

## References

- Arcus, A.C. (1959). Proteolytic enzyme of *Actinidia chinensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, *33(1)*, 242-244.
- Astwood, J.D., Leach, J.N., & Fuchs, R.L. (1996). Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature Biotechnology*, *14*, 1269–1273.
- Boland, M.J., & Hardman, M.J. (1972). Kinetic studies on the thiol protease from *Actinidia chinensis*. *FEBS Letters*, *27(2)*, 282-284.
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D., & Edelstein, S.J. (1996). Protein methods. (2nd ed.). New York: Wiley-Liss, Inc
- Bublin, M., Dennstedt, S., Buchegger, M., Ciardiello, A.M., Bernardi, M.L., Tuppo, L., Harwanegg, C., Hafner, C., Ebner, C., Ballmer-Weber, B.K., Knulst, A., Hoffmann-Sommergruber, K., Radauer, C., Mari, A., & Breiteneder, H. (2011). The performance of a component-based allergen microarray for the diagnosis of kiwifruit allergy. *Clinical and Experimental Allergy*, *41*, 129-136.
- Bublin, M., Pfister, M., Radauer, C., Oberhuber, C., Bulley, S., Dewitt, A.M., Lidholm, J., Reese, G., Vieths, S., Breiteneder, H., Hoffmann-Sommergruber, K., & Ballmer-Weber, B.K. (2010). Component-resolved diagnosis of kiwifruit allergy with purified natural and recombinant kiwifruit allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*, 687-694.
- Bublin, M., Radauer, C., Knulst, A., Wagner, S., Scheiner, O., Mackie, A.R., Mills, E.N., & Breiteneder, H. (2008). Effects of gastrointestinal digestion and heating on the allergenicity of the kiwi allergens Act d 1, actinidin, and Act d 2, a thaumatin-like protein. *Molecular Nutrition and Food Research*, *52*, 1130 – 1139

- Cavic, M., Grozdanovic, M., Bajic, A., Srdic-Rajic, T., Andjus, P.R., & Gavrovic-Jankulovic, M. (2012). Actinidin, a protease from kiwifruit, induces changes in morphology and adhesion of T84 intestinal epithelial cells. *Phytochemistry*, 77, 46-52.
- Ciardiello, M.A., Giangrieco, I., Tuppo, L., Tamburrini, M., Buccheri, M., Palazzo, P., Bernardi, M.L., Ferrara, R., Mari, A. (2009). Influence of the natural ripening stage, cold storage, and ethylene treatment on the protein and IgE-binding profiles of green and gold kiwi fruit extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1565-1571.
- Fine, A.J. (1981). Hypersensitivity reaction to kiwi fruit (Chinese gooseberry, *Actinidia chinensis*). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 8, 235.
- Grozdanovic, M., Popovic, M., Polovic, N., Burazer, L., Vuckovic, O., Atanaskovic-Markovic, M., Lindner, B., Petersen, A., Gavrovic-Jankulovic, M. (2012). Evaluation of IgE reactivity of active and thermally inactivated actinidin, a biomarker of kiwifruit allergy. *Food and Chemical Toxicology*, 50,1013-1018
- Harlow, E., & Lane, D. (1998). *Antibodies: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Kaur, L., Rutherford, S.M., Moughan, P.J., Drummond, L., & Boland, M.J. (2010). Actinidin enhances gastric protein digestion as assessed by using an in vitro gastric digestion model. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, 5068-5073.
- Kelly, S.M., Price, N.C. (2000). The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Current Protein and Peptide Science*, 1, 349-384.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Larocca, M., Rossano, R., & Riccio, P. (2010). Analysis of green kiwi fruit (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) proteinases by two-dimensional zymography and direct identification of zymographic spots by mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(14), 2411-2418.
- Lucas, J.S., Lewis, S.A., & Hourihane, J.O. (2003). Kiwi fruit allergy: a review. *Pediatric Allergy and Immunology*, 14(6), 420-428.
- Mattila, L., Kilpelainen, M., Terho, E.O., Koskenvuo, M., Helenius, H., & Kalimo, K. (2003). Food hypersensitivity among Finnish university students: association with atopic diseases. *Clinical and Experimental Allergy*, 33, 600-606.

- McDowall, M.A. (1970). Anionic proteinase from *Actinidia chinensis*. Preparation and properties of the crystalline enzyme. *European Journal of Biochemistry*, 14(2), 214-221.
- Moreno, F.J., Mellon, F.A., Wickham, M.S., Bottrill, A.R., & Mills, E.N. (2005). Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. *FEBS Journal*, 272(2), 341-352.
- Nieuwenhuizen, N.J., Beuning, L.L., Sutherland, P.W., Neelam, N.S., Cooney, J.M., Bielecki, L.R.F., Schröder, R., MacRae, E.A., & Atkinson, R.G. (2007). Identification and characterization of acidic and novel basic forms of actinidin, the highly abundant cysteine protease from kiwifruit. *Functional Plant Biology*, 34, 946-961.
- Pastorello, E.A., Conti, A., Pravettoni, V., Farioli, L., Rivolta, F., Ansaloni, R., Ispano, M., Incorvaia, C., Giuffrida, M.G., & Ortolani, C. (1998). Identification of actinidin as the major allergen of kiwi fruit. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 101, 531-537.
- Reddie, K.G., & Carroll, K.S. (2008). Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12, 1-9.
- Runswick, S., Mitchell, T., Davies, P., Robinson, C., & Garrod, D. (2007). Pollen proteolytic enzymes degrade tight junctions. *Respirology*, 12 (6), 834–842.
- Watts, A.B., & Brocklehurst, K. (2003). Handbook of proteolytic enzymes. (2nd ed.) In A.J. Barrett, N.D. Rawlings, J.F. Woessner (Eds.), pp. 1143- 1146, London: Elsevier Academic Press
- Wickham, M., Faulks, R., & Mills, C. (2009). In vitro digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53(8), 952-958.
- Yogavel, M., Nithya, N., Suzuki, A., Sugiyama, Y., Yamane, T., Velmurugan, D., & Sharma, A. (2010). Structural analysis of actinidin and a comparison of cadmium and sulfur anomalous signals from actinidin crystals measured using in-house copper and chromium-anode X-ray sources. *Acta Crystallographica, D66*, 1323–1333.

# Figures

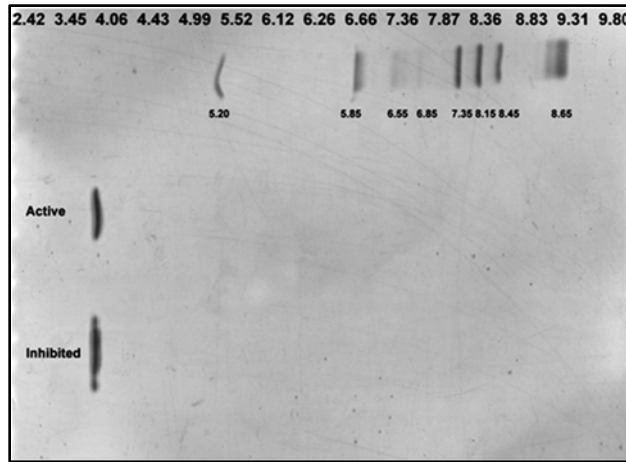


Figure 1. Isoelectric focusing of active and inhibited actinidin (E-64-actinidin complex). pH in the gel was determined by both incubating gel slices (1 cm<sup>2</sup>) in 1 mM KCl and measuring the pH and by *pI* markers.

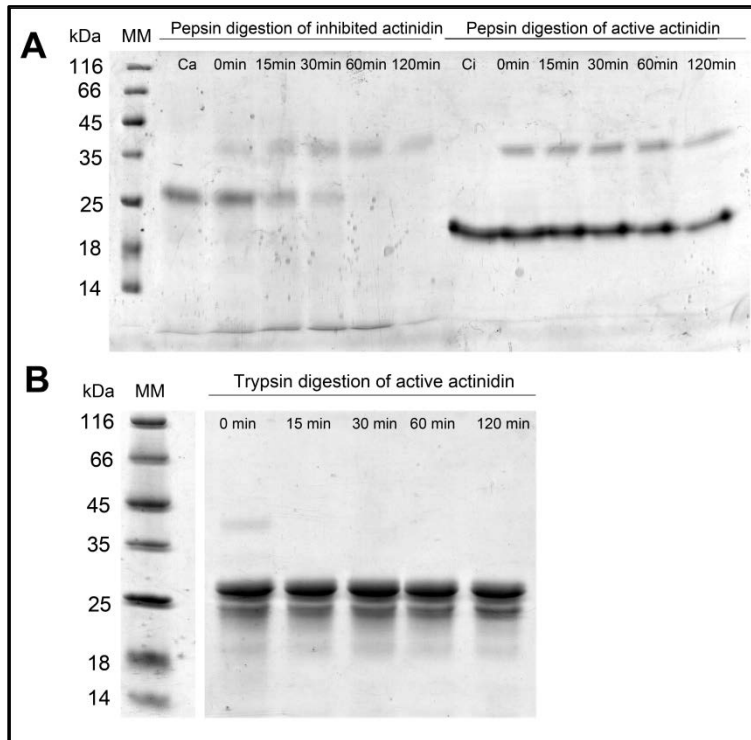


Figure 2. Analysis of E64-inhibited and active actinidin stability to peptic (A) and tryptic (B) digestion by SDS-PAGE: MM- molecular mass markers, Control samples (Ci- inhibited actinidin, Ca- active actinidin) were prepared without the addition of pepsin to reaction assay. Aliquots were taken after 0, 15, 30, 60 and 120 min of pepsin or trypsin digestion. Pepsin and trypsin bands are visible at ~ 35 kDa and ~23 kDa, respectively.

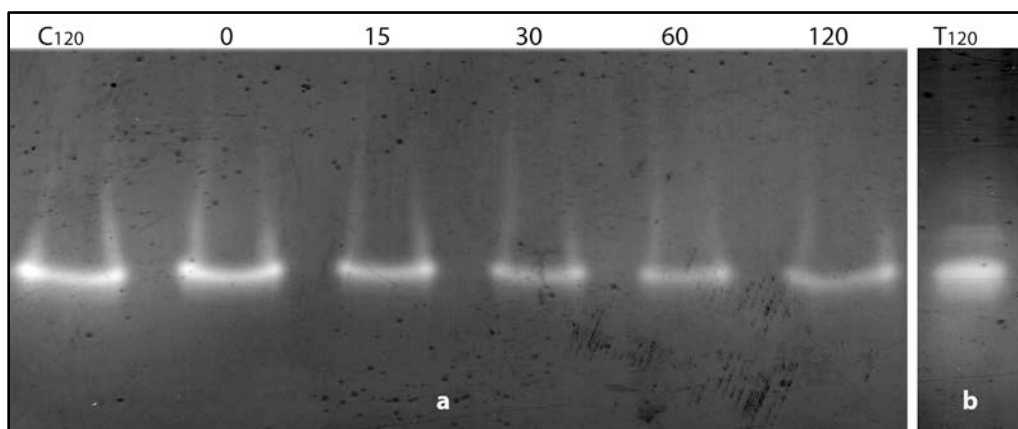


Figure 3. Zymogram of active actinidin samples: A) after pepsin digestion: C<sub>a</sub> – control after 120 min (no pepsin added to the reaction assay), 0 min, 15 min, 30 min, 60 min and 120 min samples; B) after tryptic digestion: 120 min – actinidin sample after 120 min of tryptic digestion.

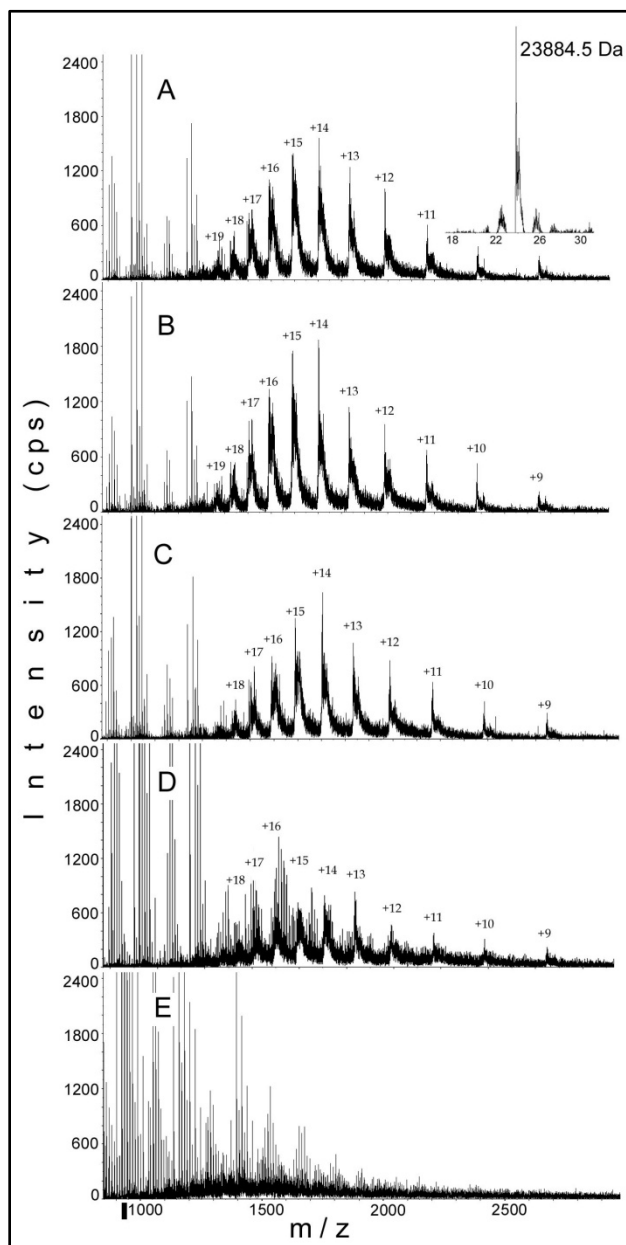


Figure 4. Mass spectrometry of active actinidin after SGF treatment: A) t=0 min, B) t=120 min, and SIF treatment C) t=120 min.; and inhibited actinidin after SGF treatment D) t=0 min and E) t=120 min. The species of ions are annotated by charge state. The insert shows the deconvoluted spectrum.

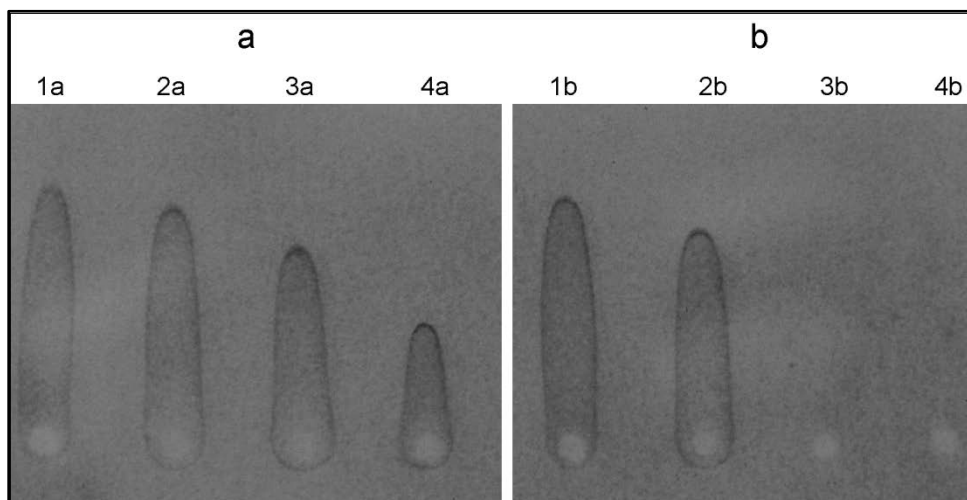


Figure 5. Rocket immunoelectrophoresis of active and inhibited actinidin samples after pepsin and trypsin digestion: Control samples of active or inhibited actinidin were incubated under conditions of SGF followed by conditions of SIF without addition of pepsin and trypsin, 0 min – samples after 0 min of pepsin treatment, 2 h SGF- samples after 2 h of pepsin treatment, 2 h SIF- samples after 2 h of trypsin treatment.

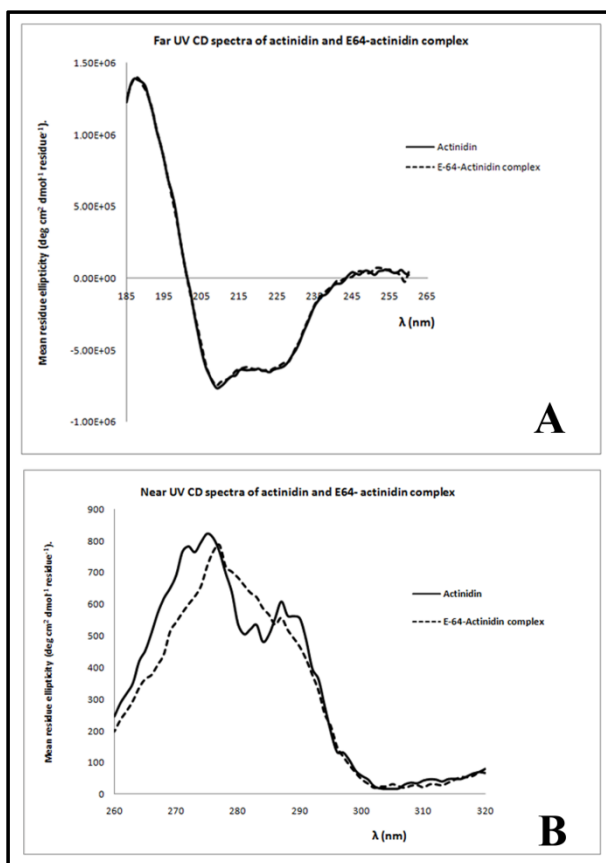


Figure 6. CD spectra of actinidin and E64-actinidin complex in the A) far and B) near ultraviolet region.



## **Biografija autora**

Milica Grozdanović je rođena 03. januara 1981. godine u Moskvi, Republika Rusija. Osnovnu i srednju školu završila je u Beogradu. Hemijski fakultet, smer diplomirani biohemičar, upisala je 2004. godine, a diplomirala 2008. godine sa prosečnom ocenom 8.85 po ubrzanom programu studiranja i ocenom deset na diplomskom ispitu. Studijski program doktor biohemijskih nauka upisala je u oktobru 2008. godine. Od 2009. godine radi kao istraživač pripravnik, a od 2011. kao istraživač saradnik na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. U periodu od 2008 do 2012. godine bila je angažovana kao saradnik u nastavi pri katedri za Biohemiju Hemijskog fakulteta na predmetima: Hemija prirodnih proizvoda, Patobiohemija i Biohemija proteina i nukleinskih kiselina. Tokom doktorskih studija boravila je na tromesečnom usavršavanju na RWTH Univerzitetu (Ahen, Nemačka) tokom 2010. godine, a zatim i na tromesečnom usavršavanju u istraživačkom centru Borstel (Borstel, Nemačka) tokom 2011. godine. Tokom 2013. godine boravila je na jednomesečnom usavršavanju na “Institute for Risk Assessment Sciences“ (Utreht, Holandija).

Član je Srpskog hemijskog društva, Biohemijskog društva Srbije i Evropske akademije za alergiju i kliničku imunologiju. Autor je šest radova štampanih u međunarodnim časopisima i poglavlja u monografiji od međunarodnog značaja.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а MILICA GROZDANOVIĆ

број уписа 9/2008

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

"Strukturna i imunološka karakterizacija aktivnog  
i inhibiranog aktinidina, cistein proteaze iz kivija  
(Actinidia deliciosa Liang, Ferguson).

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

Потпис докторанда

У Београду, 01.04.2013

Milica Grozdanović

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Milica Corozdanović

Број уписа 9/2008

Студијски програм Biohemija

Наслов рада Strukturalna i imunološka karakterizacija aktivnog i inhibiranog aktinidina, cistein proteaze iz klica (*Actinidia deliciosa*, Liang, Ferguson)

Ментор prof. dr Marija Gavrović-Jankulović

Потписани M. Taburović

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 01.04.2013

Трозг Мими

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Strukturalna i imunološka karakterizacija aktivnog i inhibiranog aktinidina, cistein proteaze iz kiviја (Actinidia deliciosa, Liang, Ferguson)

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, 01.04.2013

Трозг Милић