

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Ivana Z. Prodić

Digestomika alergena kikirikija i
karakterizacija fragmenata otpornih na
proteolizu

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Ivana Z. Prodić

Digestomics of peanut allergens and
characterization of digestion resistant
fragments

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

Komisija za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije

dr Tanja Ćirković Veličković, mentor i član Komisije

Redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet, Katedra za Biohemiju
Centar izuzetnih vrednosti za molekularne nauke o hrani
Dopisni član Srpske akademije nauka i umetnosti

dr Katarina Smiljanić, mentor i član Komisije

Viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet, Katedra za Biohemiju
Centar izuzetnih vrednosti za molekularne nauke o hrani

dr Dragana Stanić-Vučinić, član Komisije

Naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet, Katedra za Biohemiju
Centar izuzetnih vrednosti za molekularne nauke o hrani

dr Jelena Radosavljević, član Komisije

Docent, Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet, Katedra za Biohemiju
Centar izuzetnih vrednosti za molekularne nauke o hrani

dr Danijela Apostolović, član Komisije

Naučni saradnik, Department of Medicine, Solna, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

Datum odbrane _____

Ova doktorska disertacija je skoro u potpunosti urađena u laboratorijama prof. dr Tanje Ćirković Veličković na Univerzitetu u Beogradu – Hemijskom fakultetu, Katedri za biohemiju i pri Centru izuzetnih vrednosti za molekularne nauke o hrani. Ova disertacije je podržana projektima „Molekularna karakterizacija i modifikacije nekih respiratornih i nutritivnih alergena“ (Broj OI172024, Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije) i „FoodenTwin“ Horizon2020 projektom broj 810752. Izuzetak čine rezultati vezivanja IgE antitela iz seruma pacijenata alergičnih na kikiriki dobijeni pomoću ImmunoCap metode, urađeni na departmanu za Medicinu u Solni, Karolinska Instituta u Štokholmu, Švedskoj, jednom od partnera u okviru „FoodenTwin“ projekta kojim rukovodi redovni profesor Tanja Ćirković Veličković, mentor.

Zahvalnica:

Ovom prilikom želim da se zahvalim svojim mentorima, prof. dr Tanji Ćirković Veličković i dr Katarini Smiljanić na ukazanom poverenju, savetima , razumevanju, smehu, srčanosti i podršci tokom izrade doktorske disertacije.

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

dr Jeleni Radosavljević i dr Danijeli Apostolović se zahvaljujem na kritičnoj analizi ove teze.

Beskrajno hvala svim svojim kolegama i prijateljima na podršci i razumevanju... Ne postoji osoba koju bih izdvojila, a koja na mene nije uticala da li pozitivno, da li negativno, da postanem ovakva kakva sam... svako će se pronaći...

Kokice, Lijepi , Brano... šta reći posle svega... Hvala na logistici i ludoj podršci!

Hvala mojoj „Jovani“ do neba i nazad... Hvala mojoj „Suzani“ što postoji...

Tezu posvećujem Koki i Jovici, bez njih ne bi bilo šanse da ona ugleda svetlost dana.

Ivana

SKRAĆENICE

AA – akrilamid

ACN – acetonitril

ABC – amonijum bikarbonatni pufer

AGE (*engl.* advanced glycation end products) – proizvodi kasnog glikovanja

ANSCUIIS (*engl.* Allergen Nomenclature Sub-committee of the International Union of Immunological Societies) – Potkomitet za nomenklaturu alergena Internacionalne unije imunoloških društava

ANOVA (*engl.* Analysis of Variance)– analiza varijanse

AEBSF – 4-(2-aminoetil) benzensulfonil fluorid hidrohlorid

AP – alkalna fosfataza

BCA – bicinhoninska kiselina

BSA (*engl.* bovine serum albumin) – goveđi serum albumin

CD – cirkularni dihiroizam

cCBB – koloidna boja Coomassie Brilliant Blue

DTT – ditiotretitol

EFSA- Evropska agencija za bezbednost hrane

ELISA (*engl.* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) – imunoadsorpcijski enzimski test

ESI (*engl.* electrospray ionization) – elektrosprej jonizacija

FDR (*engl.* false discovery rate) – mera učešća lažnih nalaza

FA (*engl.* formic acid) – mravlja kiselina

GIT – gastrointestinalni trakt

Ig – imunoglobulin

IAA – jodacetamid

IEDB (*engl.* Immuno Epitope Database) – baza podataka imunskih epitopa

LFQ (*engl.* label free quantification) – relativna kvantifikacija proteina bez obeležavanja

MS – masena spektrometrija

MPOP – peptidi malih molekulskih masa otporni na proteolizu

nLC-MS/MS (*engl.* nano-liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry)

– nano tečna hromatografija kuplovana sa tandemskom masenom spektrometrijom

PAA – poliakril-amid

PBS – fosfatom puferisan fiziološki rastvor

PBS-T – 0.05% Tween 20 u PBS-u

PMSF – fenil-metil-sulfonil fluorid

PTM – post-translacione modifikacije

NC – nitrocelulozna membrana

SDS-PAGE – natrijum-dodecilsulfat elektroforeza na poliakrilamidnom gelu

SGF (*engl.* simulated gastric fluid) – simulirani sok gastričnog varenja

SIF (*engl.* simulated intestinal fluid) – simulirani sok intestinalnog varenja

SSF (*engl.* simulated salivary fluid) – simulirana pljuvačna tečnost

TCA – trihlorsirćetna kiselina

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

Sažetak

INFOGEST metoda predstavlja standardizovani protokol za *in vitro* simulaciju digestije kompletne hrane, zasnovanom na fiziološki relevantnim uslovima. Predmet rada ove disertacije je ispitivanje digestibilnosti alergena kikirikija iz celog zrna primenom INFOGEST metode, kao i karakterizacija njihovih fragmenata otpornih na proteolizu.

Za odstranjivanje lipida primenjena je metoda taloženja proteina, koja se pokazala kao superiornija u odnosu ekstrakciju lipida organskim rastvaračem, usled manjeg kvalitativnog i kvantitativnog gubitka proteina.

U ovoj tezi je pokazano da termički tretmani kikirikija, pored matriksa hrane, dodatno otežavaju oslobađanje proteina iz zrna, što čini glavne alergene kikirikija Ara h 1, Ara h 2 Ara h 3 i Ara h 6 nedostupnijim za pepsinsku hidrolizu. Oslobađanje proteina kikirikija, kao i digestibilnost, u gastričnoj fazi se pokazala znatno izraženijom, u odnosu na intestinalnu fazu, s tim da je digestija kod pečenog kikirikija otežana u odnosu na sirovi. Nakon oralno-gastrične digestije celog zrna sirovog kikirikija, glavni alergeni kikirikija u velikoj meri ostaju intaktni, a njihovi peptidi otporni na digestiju zadržavaju alergeni kapacitet. Pokazano je da većina Ara h 2 i Ara h 6 alergena ostaje rezistentna na digestiju. Ara h 1 i Ara h 3 kaskadno podležu pepsinolizi, do fragmenata koji i dalje zadržavaju IgE vezujući potencijal. Mali peptidi koji potiču od Ara h 2 alergena, su se pokazali kao najpotentniji inhibitori vezivanja IgE iz seruma pacijenata alergičnih na kikiriki, u odnosu na male Ara h 1 i Ara h 3 peptide.

U ovoj disertaciji je pokazana izuzetno važna uloga efekata matriksa hrane, kao i njene termičke obrade, na digestiju proteina hrane, koji mogu povećati stabilnost alergena hrane tokom digestije, i time omogućiti zadržavanje potencijala aktivacije alergijske reakcije nakon oralno-gastrične faze digestije.

Ključne reči: alergeni kikirikija, termička obrada hrane, matriks hrane, simulirana oralno-gastrična/oralno-gastrointestinalna digestija, odmaščivanje digesta, peptidi otporni na proteolizu.

Naučna oblast: Prirodno-matematičke nauke

Uža naučna oblast: Biohemija

UDK broj:

Abstract

INFOGEST method is standardized protocol for *in vitro* simulation of complete food digestion, based on physiologically relevant conditions. The objective of this dissertation was to investigate digestibility of peanut allergens from whole peanut kernel by INFOGEST method, as well as to characterize their fragments resistant to proteolysis.

For delipidation, protein precipitation approach was applied, showing to be superior in comparison to delipidation by organic solvent, due to lower qualitative and quantitative protein loss.

In this thesis it was shown that peanut thermal processing, in addition to effect of food matrix, further complicates the extractability and digestibility of proteins from the grain, making peanut allergens Ara h 1, 2, 3 and 6, less accessible for pepsin hydrolysis. Extractability and digestibility of peanut proteins in the gastric phase have shown to be significantly more pronounced, in comparison to intestinal phase, and roasted peanut digestion was impaired compared to the raw. It was shown that after oral and gastric digestion of whole raw peanut grains peanut allergens largely remain intact, and their digestion resistant peptides retain allergenic capacity. The most Ara h 2 and Ara h 6 allergens have been shown to remain resistant to digestion. Ara h 1 and Ara h 3 undergo pepsinolysis with cascade pattern to consequently smaller peptide fragments with retained IgE binding capacity. Small peptides from Ara h 2 allergens were the most potent inhibitors of IgE binding from sera of peanut allergic patients, compared to small peptides from Ara h 1 and Ara h 3.

This thesis points to the great importance of the effects of food matrix, as well as food thermal processing, on protein digestibility, which can create additional stability of food allergens during digestion, and thus enable retaining of their potential for the sensitization or triggering of allergic reactions.

Keywords: peanut allergens, thermal processing, food matrix, simulated oral-gastric/oral-gastrointestinal digestion, digesta defatting, proteolytic resistant peptides.

Scientific field: Life sciences

Scientific discipline: Biochemistry

UDK number:

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Opšti deo	5
2.1 Mehanizam alergijske reakcije	5
2.2 Gastrointestinalni trakt i njegov imunski sistem	8
2.3 Alergije na hranu	10
2.4 Alergije na kikiriki	11
2.5 Alergeni kikirikija	11
2.6 Termalna obrada alergena hrane	15
2.7 Digestibilnost alergena kikirikija	18
2.7.1 Harmonizovani, statički <i>in vitro</i> test digestibilnosti: COST INFOGEST protokol.....	20
2.8 OMIKS tehnologije u alergijama na hranu	21
3. Ciljevi rada.....	23
4. Materijal i metode	26
4.1 Priprema sirovog i termički obrađenog kikirikija	26
4.2 Priprema i termička obrada različitih tipova hrane	26
4.3 Priprema štok rastvora simuliranih digestivnih sokova.....	26
4.4 Simulacija fizioloških uslova oralno-gastroične i oralno- gastrointestinalne faze digestije	27
4.5 Tretmani odmaščivanja tečne faze uzoraka kikirikija n-heksanom i trihlorsirćetnom kiselinom u acetonu (TCA/aceton) nakon oralno-gastroične i oralno- gastrointestinalne faze digestije.....	29
4.6 Priprema nerastvornih frakcija (taloga) sirovog, barenog i pečenog kikirikija nakon gastroične digestije za SDS-PAGE analizu.....	30
4.7 1D SDS PAGE analiza tečne faze sirovog, barenog i pečenog kikirikija nakon oralno-gastroične i oralno-gastrointestinalne digestije.....	30

4.7.1 1D SDS PAGE analiza tečne faze uzoraka digestovane hrane sa kvalitativno različitim matriksom nakon gastrične digestije	31
4.7.2 1D SDS PAGE analiza tečne faze sirovog, barenog i pečenog kikirikija nakon oralno-gastrične digestije u različitim vremenskim intervalima.....	31
4.7.3 1D SDS PAGE analiza vode u kojoj se kikiriki kuvao	31
4.8 Određivanje koncentracije proteina u ekstraktima i digestima kikirikija.....	32
4.8.1 Određivanje koncentracije proteina bicinhoninskom metodom	32
4.8.2 Određivanje koncentracije proteina kikirikija denzitometrijom na ImageQuant TL 8.1 i procena efikasnosti digestije pepsinom.....	32
4.8.3 Statističke analize	34
4.9 Analize 1D SDS-PAGE profila ekstraktoma i digestoma sirovog kikirikija tandemskom masenom spektrometrijom visoke rezolucije (<i>nano-LC-MS/MS</i>).....	34
4.9.1 Isecanje traka iz gela i priprema uzoraka iz gela za digestiju tripsinom i za nanošenje na <i>nano-LC-MS/MS</i>	34
4.9.2 Nano-LC-MS/MS i pretraga proteina na osnovu zadate databaze	36
4.10 Optimizacija izoelektričnog fokusiranja kod uzoraka bogatih lipidima u cilju eventualnog izbegavanja delipidacije.....	37
4.10.1 Priprema ekstrakata polena trave mačiji repak (<i>Phleum pratense</i>)	37
4.10.2 Optimizacija izoelektrofokusiranja na neodmašćenim ekstraktima polena trave mačijeg repka.....	37
4.11 2D SDS-PAG elektroforeze kontrolno-standardnog ekstrakta sirovog kikirikija i ekstraktoma i digestoma kikirikija na osnovu INFOGEST protokola	38
4.11.1 Priprema proteinskih tačaka sa 2D SDS-PAG elektroforeze kontrolnog i digestovanog sirovog kikirikija	39
4.11.2 Identifikacija standardnog ekstrakta, kontrolnih i digestovanih proteina sirovog kikirikija dobijenih sa 2D SDS-PAGE.....	39
4.12 Izolovanje malih peptida otpornih na proteolizu (MPOP) dobijenih nakon oralno-gastrične digestije i razdvajanje gel hromatografijom.....	40

4.12.1 Identifikacija MPOP putem masene spektrometrije intaktnih i trisinom digestovanih peptida u rastvoru i upareni sa imunoepitop bazom IEDB	40
4.13 IgE vezujuće sposobnosti digestovanog uzorka sirovog kikirikija	41
4.13.1 ELISA inhibicije	41
4.13.2 ImmunoCAP inhibicija	43
4.13.3 2D imunoblot	43
4.14 Spektroskopija cirkularnog dihiroizma (CD)	44
5. Rezultati	46
5.1 Procena uticaja termičke obrade na oslobađanje proteina kikirikija i njihove digestibilnosti tokom <i>in vitro</i> oralno-gastroične i oralno-gastroičnointestinalne digestije	47
5.2 Uticaj izbora metode odmaščivanja digesticione smeše na koncentraciju proteina oslobođenih nakon <i>in vitro</i> oralno-gastroične i oralno-gastrointestinalne digestije kikirikija	49
5.3 Uticaj izbora metode odmaščivanja digesticione smeše na elektroforetske profile nakon <i>in vitro</i> oralno-gastroične i oralno-gastrointestinalne digestije sirovog, barenog i pečenog.....	53
5.4 Uticaj matriksa hrane na simuliranu <i>in vitro</i> oralno-gastroičnu digestiju proteina	57
5.5 Kinetika oralno-gastroične digestije sirovog, barenog i pečenog kikirikija.....	59
5.5.1 Efekat „curenja” proteina u vodu tokom pripreme kuvanog kikirikija	61
5.6 SDS-PAGE proteinski profili nerastvorne frakcije nakon <i>in vitro</i> oralno-gastroične digestije kikirikija.....	62
5.7 SDS-PAGE proteinski profili odmaščene rastvorne faze nakon <i>in vitro</i> oralno-gastroične digestije sirovog kikirikija	64
5.8 Procena efikasnosti pepsinske digestije proteina sirovog kikirikija na osnovu nLC-MS/MS analize i bioinformatičke analize podataka	65

5.9 Optimizacija izoelektričnog fokusiranja za uspešno fokusiranje proteina iz ekstrakata bogatih mastima i polisaharidima na modelu neodmašćenog polena mačijeg repka	77
5.10. Ispitivanje digestibilnosti proteina kikirikija u simuliranim <i>in vitro</i> uslovima oralno-gastroične digestije na osnovu proteoma digestovanog sirovog zrna kikirikija	78
5.10.1 Kaskadni obrazac pepsinske proteolize alergena Ara h 1 i Ara h 3	79
5.10.2 Ara h 2 i Ara h 6 ostaju skoro intaktni u toku pepsinske digestije	82
5.11 IgE vezujuće sposobnosti digestovanog uzorka kikirikija	82
5.11.1 2D imunoblot kontrolnog i digestovanog kikiriki uzorka sa mešavina seruma pacijenata senzitivizovani na kikiriki	82
5.11.2 Inhibitorski potencijal peptida otpornih na proteolizu	83
5.11.3 Mali peptidi otporni na proteolizu (MPOP) dobijeni <i>in vitro</i> oralno-gastroičnom digestijom kikirikija doprinose IgE reaktivnosti.....	84
5.12 CD spektrometrija proteina kikirikija digestovanih u simuliranim <i>in vitro</i> uslovima oralno-gastroične digestije.....	89
6. Diskusija.....	91
7. Zaključci.....	100
8. Prilozi	102
9. Literatura:	133
Biografija autora.....	144
Изјава о ауторству.....	Error! Bookmark not defined.
Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада	Error! Bookmark not defined.
Изјава о коришћењу.....	Error! Bookmark not defined.

1. Uvod

Kikiriki (*Arachis hypogaea* L.) se smatra jednim od glavnih izvora proteina, lipida, vlakana, vitamina, minerala, fenolnih jedinjenja i fitosterola. Uprkos ekonomskom značaju, kao glavnom izvoru proteina, kikiriki je okarakterisan kao jedan od glavnih izvora alergena hrane. Postoji 16 alergeni proteinskih grupa u kikirikiju (http://www.allergen.org/search.php?allergen_source=Arachis+hypogaea). Među njima su glavni alergeni, Ara h 1 sa 35-95%, i Ara h 2 sa čak 95% učešća u vezivanju IgE antitela iz krvi pacijenata alergičnih na kikiriki [1]. Navedeni alergeni pripadaju klasi I alergena (tzv. kompletnim alergenima), koji su sposobni da senzitivizuju i da izazovu simptome opasne po život [2].

Termičko procesovanje hrane utiče na proteinsku strukturu i stabilnost [3]. Schmitt i saradnici su istraživali strukturnu stabilnost, i IgE vezivanje termički procesovanog kikirikija (kuvani, prženi i pečeni), i pronašli da se proteinska rastvorljivost (ekstrakcija) smanjila nakon termičkog tretmana. Ukazali su da se ovaj trend povećava sa vremenom izlaganja kikirikija temperaturi, što se najverovatnije dešava zbog agregacije proteina [4].

Otpornost na digestiju, dejstvom digestivnih proteaza predstavlja važnu osobinu proteina sa alergenim svojstvima. Prvu sistematičnu studiju o proteolitičkoj stabilnosti alergeni i nealergeni proteina iz hrane je izveo Astwood sa saradnicima [5]. Njegova studija je pokazala kako su alergeni proteini hrane otporni na pepsinsku digestiju naspram nealergeni proteina, što dovodi do zaključka da postoji veza između alergnosti i digestibilnosti. Postoje brojne studije koje su poredile digestibilnost prečišćenih alergena i proteina bez alergeni svojstava [6-8] na osnovu protokola koji je dao Astwood i saradnici (1996) [5]. Npr. Thomas sa saradnicima (2004) [7] je modifikovao studiju Astwood-a (1996) [5], tako što je smanjio količinski odnos između pepsina i ciljnog proteina, i posmatrao efekat kisele sredine (pH 1.2 i 2.0). Rezultati *in vitro* digestije rađene na pH 1.2 i 2.0 sa 10 prečišćenih proteina (alergeni i nealergeni) su evaluirani u multistudiji, sprovedenoj u devet različitih laboratorija. Autori su uočili da analiza malih i velikih fragmenata nastalih pepsinskom hidrolizom, nije

konzistentna [5]. Nekoliko studija [9], [10], [11] su istraživale proizvode digestije ekstrakata kikirikija, ali nikad digestiju celog zrna kikirikija. Studije koje su se bavile istraživanjima u oblasti pepsinske digestibilnosti alergena kikirikija su prikazane u Tabeli 1, i bez obzira na primenjene eksperimentalne uslove, Ara h 2 i Ara h 6 su se pokazali kao najotporniji na pepsinsko delovanje u poređenju sa Ara h 1 i Ara h 3 [11, 12].

Plundrich i saradnici [13] su istraživali pepsinsku digestibilnost blago pečenog brašna kikirikija (12% masti), sa idejom da se prati degradacija alergena uz pomoć jednodimenzionalne natrijum-dodecilsulfat poliakrilamidne gel elektroforeze (1D SDS PAGE). Digestibilnost ekstrakta kikirikija je takođe ispitivao i Tantoush sa saradnicima [9].

EFSA, prema protokolu Evropske unije broj 503/2013 (IR503/2013), istakla je ograničenja klasičnog testa za pepsinsku digestiju, i preporučila da se rezistencija proteina na pepsinsku digestiju izvodi na osnovu *in vitro* testova digestije koji simuliraju fiziološke uslove varenja kod čoveka. Takođe, EFSA u dokumentu procene rizika od alergije na hranu i genetski modifikovanu hranu, objavljenog 2011. godine, nalaže da se mora obavezno uzeti u obzir uticaj interakcija između proteina i drugih komponentni iz matriksa hrane, kao i uticaj obrade hrane, pri izvođenju *in vitro* testova digestije (EFSA GMO Panel, 2011).

Do nedavno nije postojao internacionalno prihvaćeni konsenzus protokol po kome se radi *in vitro* oralna-gastrointestinalna digestija, ali je 2014. godine razvijen COST INFOGEST protokol koji se primenjuje na kompletnu hranu, a 2019. godine je protokol modifikovan [14, 15]. Harmonizovani statički model digestije, primenjivan u okviru ove disertacije, zasnovan je na oponašanju fizioloških uslova digestije kod odraslog čoveka, pružajući uvid u detaljnu metodološku primenu protokola digestije. Međutim, pojedini aspekti tog protokola su ipak nedovoljno opisani, poput smernica za rešavanje problema digesta koji sadrže veliku količinu lipida, u slučajevima kada je hrana veoma bogata lipidima, čime je onemogućena sledstvena analiza proteinskih profila, elektroforetskim tehnikama.

Studija koju je radio DiStasio sa svojim saradnicima [16] istraživala je digestibilnost proteina iz celog zrna kikirikija, *in vitro* oralno-gastrointestinalnom digestijom uz prateći korak digestije membranskim proteazama četkastog pokrova, ali istraživanje nije pokazalo koji su to proteolitički proizvodi nastali nakon gastrične faze. Stoga su potencijalni imunoreaktivni proteini/peptidi, kojima je mukoza tankog creva bila izložena nakon gastrične digestije proteina kikirikija, ostali nepoznati. Rao i kolege su [17] proučavali efekte termičke obrade kikirikija na oralno-gastrointestinalnu digestiju putem INFOGEST protokola [15]. Pratili su efekat kuvanja i pečenja celog zrna kikirikija na ekstrakciju njegovih proteina i vezivanje IgE antitela iz seruma alergičnih pacijenata, i pokazali su da se proteini parcijalno hidrolizuju. Međutim nisu opisali protokol delipidacije, ostavljajući mogućnost špekulacije o nepodržanom odmašćivanju uzorka pre same digestije od strane INFOGEST protokola, na osnovu suviše urednih rezultata SDS-PAGE, i veoma kratkih vremena potrebnih za potpunu gastričnu digestiju glavnih alergena. Stoga su u ovoj tezi istraženi efekti termičke obrade kikirikija (sirovog barenog i pečenog) na efikasnost kako oralno-gastrične, tako i oralno-gastrično-intestinalne faze varenja, i procenu otpornosti alergena ka digestijama, strogo poštujući pomenuti INFOGEST protokol.

Od velike važnosti je da se INFOGEST protokol tačno primeni, kako bi se obezbedili relevantni rezultati, i smanjile varijacije u rezultatima među-laboratorijskih ispitivanja. Prvi razlog se odnosi na ispitivanje zaštitnih sposobnosti komponenti matriksa hrane, u rezistenciji alergena kikirikija na digestiju, koji se ne može u potpunosti istražiti ukoliko se radi sa odmašćenim ekstraktima ili sa prečišćenim proteinima. Drugo, kada se radi sa eksperimentalno zahtevnim materijalom, poput kikirikija čiji je matriks bogat lipidima, često je potrebno ili neophodno ukloniti lipide iz uzorka, kako bi se neometano izvele analize proteinskih i peptidnih profila digestije elektroforetskim tehnikama. Nepostojanje direktnih smernica u okviru INFOGEST protokola u vezi odmašćivanja uzorka digestije različitih vrsta hrane, kao i odsustvo eksplicitne zabrane odmašćivanja hrane pre digestije, dovelo je do neujednačenih rezultata digestije alergena kikirikija širokog opsega među raznim istraživačkim grupama [16, 17]. Stoga je u ovoj studiji posvećena posebna pažnja metodološkim istraživanjima i nalaženju optimalnog rešenja za odmašćivanje nakon digestije hrane; ukoliko se hrana odmasti pre digestije,

kompletno je izlišno baviti se istraživanjima uticaja matriksa hrane na digestiju alergena.

Veliki broj alergeni proteina sirovog kikirikija su se pokazali kao otporni, ili delimično otporni, na proteolizu u gastričnom traktu, i opstanak fragmenata proteina kikirikija je opisano u nekoliko studija [7, 11, 18]. Procena otpornosti alergena, njihovih velikih i malih fragmenata na pepsinsku digestiju u *in vitro* simuliranim uslovima je važan deo ispitivanja alergnosti kikirikija. Eventulano preživljavanje intaktnih alergena sirovog kikirikija, njihovih velikih fragmenata za koje se zna da mogu da senzitiviraju mukoza epitela tankog creva, kao i karakterizacija fragmenata malih masa i njihovih IgE vezujućih kapaciteta detaljno je ispitana i okarakterisana u ovoj tezi.

2. Opšti deo

Smatra se da oko 1% svetske populacije, odnosno oko 70 miliona ljudi ima alergiju na kikiriki, a istovremeno, postoje nalazi da je stopa pojave novih slučajeva alergije na kikiriki u porastu [19, 20]. Simptomi koji se javljaju nakon konzumiranja kikirikija su uobičajni za alergije na hranu: povraćanje, urtikarija, mučnina, oticanje, bronhospazam i anafilaksija [19, 21]. Za razliku od drugih alergija uzrokovanih hranom, reakcija na kikiriki se retko prevazilazi u starijem dobu [22]. Doze koje obično izazivaju reakciju se kreću između 0.1-1 g, a kod veoma osetljivih pojedinaca čak i 100 µg kikirikija je dovoljno da izazovu anafilaksiju opasnu po život [23, 24]. Do senzitivizacije dolazi prilikom unosa hrane (npr. kikiriki puter), čak i u toku laktacije [25], ili pak preko kože, koristeći proizvode za negu kože na bazi ulja kikirikija [26]. Sve veća upotreba prerađene hrane koja sadrži kikiriki dovodi do povećanja kako prevalencije, tako i incidence alergije na kikiriki [19, 27].

Način obrade hrane u industriji, veoma menja alergene sposobnosti kikirikija. Nekoliko studija je pokazalo da kuvanje smanjuje alergeni potencijal proteina kikirikija [28, 29], dok je u slučaju pečenja doslo do povećanja alergenoeg potencijala [10, 28, 30, 31]. Ovo može da bude razlog za povećanu stopu alergija u SAD i Evropi (gde je pečeni kikiriki češće u upotrebi) u poređenju sa Azijskim zemljama, gde konstantna upotreba kikirikija, ali kuvanog ili prženog, ne izaziva porast pacijenata alergičnih na kikiriki [27, 32-34]. U ovom momentu, ne postoji efikasan tretman kojim bi se lečila alergija na kikiriki, tako da jedina preporučena strategija jeste striktno izbegavanje hrane koja sadrži kikiriki [35, 36]. Međutim, ovakva strategija u datom kontekstu ne može biti potpuno efikasna, obzirom da kikiriki postaje jedan od glavnih izvora proteina u prerađenoj hrani [37] i nezgode prilikom unosa bivaju prilično česte zbog kontaminacije postrojenja za preradu hrane [38].

2.1 Mehanizam alergijske reakcije

Kod osoba osetljivih na kikiriki, do alergijske reakcije dolazi nakon umrežavanja receptora na mast ćelijama i bazofilima sa IgE antitelima specifičnim za kikiriki [39, 40]. Umrežavanje receptora se obezbeđuje kroz formirani IgE antitelo- kikiriki alergen

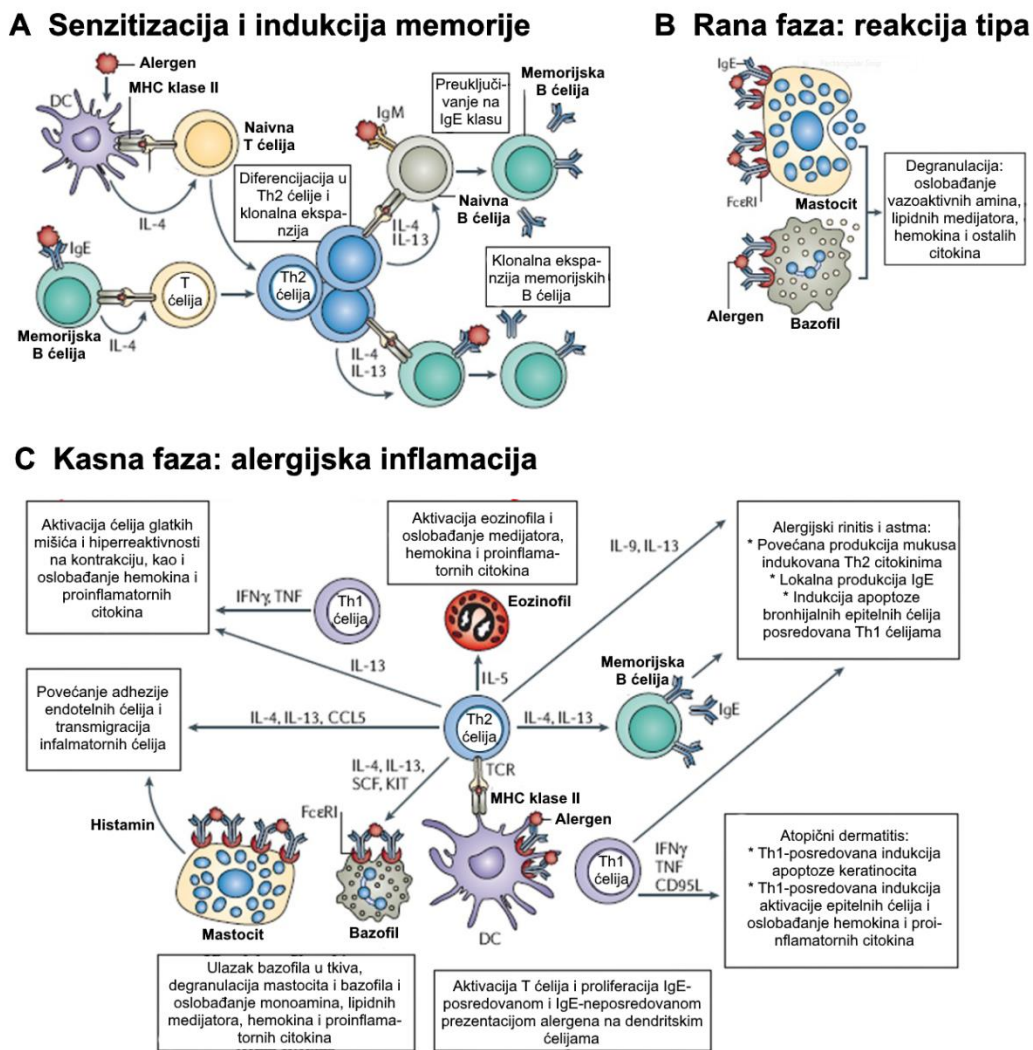
kompleks, tako da je razumevanje strukture alergena esencijalno za identifikaciju IgE vezujućih epitopa.

Imuni sistem pravi interaktivnu mrežu sa tkivima, i odluke o reagovanju donosi na bazi signala koje dobija od prisutnih ćelija tkiva, infektivnih agenasa, normalne mikroflore, i bilo kog drugog člana trenutnog okruženja. Imunološka osnova alergijskih bolesti se može podeliti na dve faze. Prvu fazu predstavlja senzitivizacija i razvoj memorijskog T i B ćelijskog odgovora, i produkcije IgE antitela. Drugu fazu čini efektorska funkcija koja se može povezati sa tkivnom inflamacijom, povredama tkiva, obnavljanjem tkiva, kao i hroničnom astmom, atopijskim dermatitisom i alergijskim rinitisom.

U fazi senzitivizacije, tzv. ranoj fazi, prilikom prvog izlaganja alergenu počinje proizvodnja IgE antitela. Antigen-prezentujuće ćelije (dendritične ćelije, B ćelije) prikupljaju i obrađuju alergen do peptida. Peptidi dobijeni od alergena se udružuju u kompleks sa receptorima MHC klase II i bivaju prikazani naivnim CD4⁺ T- ćelijama. Prepoznavanje peptid-MHC II kompleksa i T ćelijskog receptora naivne T- ćelije je signal za diferencijaciju i umnožavanje naivnih CD4⁺ T ćelija u T_H2 ćelije, što je kontrolisano citokinima: IL-4, IL-5, i IL-13. Istovremeno, naivne B-ćelije pomoću antigen-specifičnih membranski vezanih IgM antitela prepoznaju i preuzimaju antigen i predstavljaju ga Th2-ćelijama. IL-4 i IL-13, koji indukuju promenu klase teškog lanca imunoglobulina ε u B ćelijama, dovode do produkcije alergen specifičnih IgE antitela (Slika 1) [41]. B-ćelije proizvode alergen specifična IgE antitela koja se vezuju za FcεRI receptore visokog afiniteta, koji se nalazi na površini mastocita ili bazofila, dovodeći do senzitivizacije pacijenta.

U efektorskoj fazi, kada dođe do novog susreta sa alergenom, dolazi do tzv., umrežavanja IgE-FcεRI kompleksa, na već senzitivizovanim bazofilima i mastocitima. Tada se ćelije aktiviraju i dolazi do otpuštanja anafilaktogenih medijatora (histamin, leukotrijeni, prostaglandini, proteaze, faktori aktivacije krvnih pločica). Medijatori dovode do patofizioloških promena, poput: kontrakcije glatkih mišića, produkcije mukusa i povećane propustljivosti krvnih sudova, koje su odgovorne za akutne simptome alergijske reakcije.

Da bi došlo do odvijanja kasne faze alergijskog odgovora potrebni su sati ili dani. Bazofili i mastociti oslobađaju medijatore, koji dovode do iniciranja i prolongiranja inflamatornog procesa, koji ujedno privlače i imune ćelije na mesto izlaganja alergenu, kao što su Th2 limfociti, eozinofili, bazofili i monociti. Nakon dolaska na mesto izlaganja alergenu, alergen-specifične Th2 ćelije se ponovno aktiviraju antigen-prezentujućim dendritičnim ćelijama i B-ćelijama. Reakcija kasne faze je dodatno pospešena IgE antitelima.



Slika 1 Mehanizam alergijske reakcije. Mehanizam alergijskih reakcija se može podeliti na tri faze: A -fazu senzitivacije i indukcije memorije, B-fazu rane i C- kasna faza; TCR- T-ćeljski receptor, DC- dendritična ćelija, Th2- pomoćnička T-ćelija tipa 2, Fc ϵ R1- visokoafinitetni receptor za IgE na mastocitima i bazofilima, IL- intraleukini, IF-

interferon, SCF- faktor matičnih ćelija (*engl.* stem cell factor; poznat kao KIT ligand), TNF- tumor nekrozni faktor (*engl.* tumor necrosis factor). Adaptirano sa dozvolom Springer Nature: [Nature Reviews Immunology] [42], Copyright (2006).

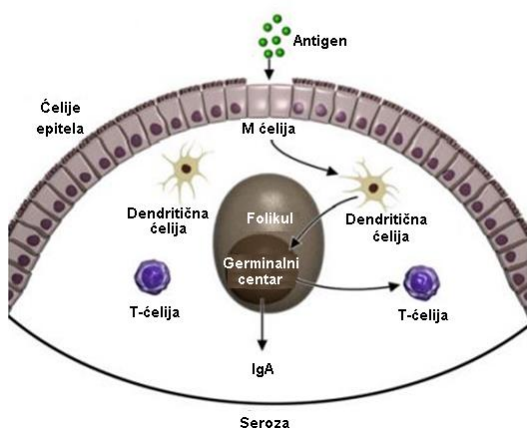
2.2 Gastrointestinalni trakt i njegov imunski sistem

Humani gastrointestinalni trakt predstavlja kompleksan sistem za razgradnju hrane i ekstrakciju njenih nutritivnih komponenti. Oralna faza digestije predstavlja vid mehaničke obrade, gde se hrana prvo drobi, kida i meša sa pljuvačkom u ustima, gde dolazi do formiranja oralnog bolusa [43]. Pljuvačka sadrži različite soli i enzime kao što su lizozimi, lingualna lipaza, salivarna amilaza, i mucine. Amilaza razgrađuje skrob na maltozu, a optimalna pH vrednost njenog delovanja je 6.9. Oralni bolus se peristaltičkim pokretima spušta do ezofagusa, i hrana ulazi u želudac [44]. Glavna komponenta želuca je hlorovodonična kiselina, koju luče parijetalne ćelije, i tako utiču na promenu pH. Iako literatura kaže da je u želucu pH 2 [45], smatra se da pH *in vivo* varira, u zavisnosti od toga gde je pH izmerena i da li je pojedinac gladan ili ne [46]. Na pH takođe utiče hrana koja je uneta u organizam, jer hrana poseduje puferišuće sposobnosti. Niska pH u želucu inaktivira salivarnu amilazu, a dolazi do aktivacije pepsina hidrolizom njegovog prekursora pepsinogena, koga sekretuju ćelije želuca. Pražnjenje želuca je uslovljeno delimično sa veličinom čestica hrane koja može fizički da izađe, kao i sa samom kaloričnošću hrane [47]. Peristaltičke kontrakcije distalnog želuca mogu da smanje veličinu čestica i da prebace gastrični sadržaj u duodenum; takođe kontrakcije duodenuma mogu da potpomognu gastrično pražnjenje preko gradijenta antralno-duodenalnog pritiska.

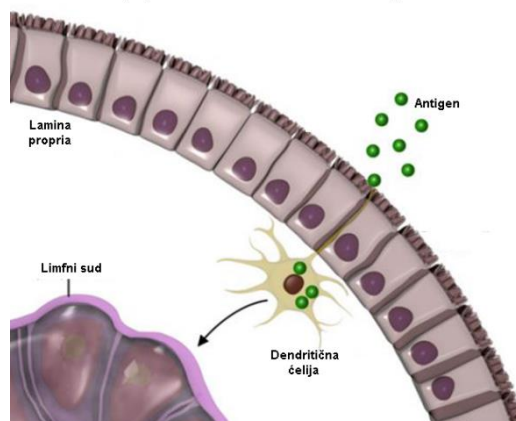
Prvih 20-25 cm tankog creva je ključno za digestiju, jer se u tom momentu gastrični sadržaj meša sa digestivnim sokovima pankreasa i žučnim solima. Ovaj deo tankog creva je nazvan “duodenum”, a pored njega postoji još i jejunum i ileum. Nakon mešanja gastričnog sadržaja sa pankreasnim sokovima, dolazi do neutralizacije kiseline iz želuca, i omogućava se dalji neometan rad enzima (tripsin, himotripsin, elastaza i karboksipeptidaza, koji se takođe luče u svojim neaktivnim formama) izlučenih u lumen tankog creva.

U zavisnosti od načina ulaska antigena u organizam i prikazivanja antigena mukoznom imunskom sistemu, zavisi i odgovor imunskog sistema gastrointestinalnog trakta. Najvažniji put ulaska antigena, prisutnih u lumenu creva, predstavljaju organizovane strukture limfoidnog tkiva poznate kao Pejerove ploče (*engl. Peyer's Patches, PP*) koje su distribuirane u submukozi intestinalnog zida, ispod M ćelija (mikrofold ćelije). M ćelije (Slika 2A) predstavljaju podgrupu ćelija intestinalnog epitela, koje su specijalizovane za preuzimanje antigena iz lumena i njihovo prebacivanje (transcitozu) u subepitel creva do antigen-prezentujućih ćelija (dendritične ćelije ili ćelije makrofaga). Nakon preuzimanja i fagocitoze antigena, antigen-prezentujuće ćelije migriraju u Pejerove ploče, gde pokreću imunski odgovor. Antitela koja se proizvode u Pejerovim pločama su uglavnom IgA i/ili IgG klase. Koja će se klasa antitela proizvoditi, zavisi od citokina koji su prisutni u Pejerovim pločama [48, 49].

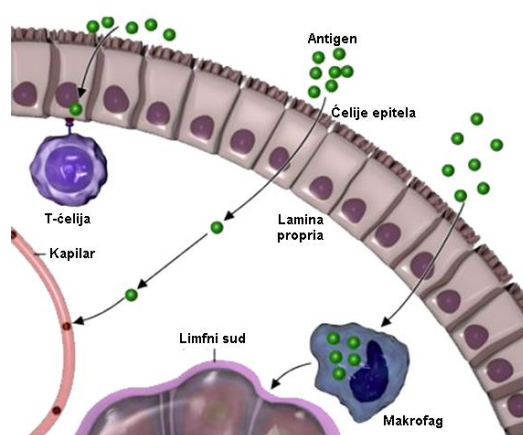
A Preuzimanje posredstvom M ćelija



B Preuzimanje posredstvom dendritičnih ćelija



C Preuzimanje posredstvom ćelije epitela



Slika 2 Načini ulaska antigena iz lumena creva u organizam. A-Preuzimanje posredstvom M ćelija, B- Preuzimanje posredstvom dendritičnih ćelija, C- Preuzimanje posredstvom ćelija epitela. Adaptirano iz Journal of Allergy and Clinical Immunology, 115/3, Mirna Chehade, Lloyd Mayer, Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities (2005) [50] .

Drugi put ulaska (Slika 2B) antigena u organizam i prikazivanja antigena mukoznom imunskom sistemu se odvija preko podepitelskih dendritičnih ćelija. Dendritične ćelije svojim nastavcima, izbačenim u lumen creva, mogu da zahvate solubilne antigene [48, 51]. Podepiteljalne dendritične ćelije su dominantno naivnog fenotipa. Mogu da dospeju do perifernih limfnih organa, tako izazivajući perifernu tolerancu [52]. U prisustvu patogenih bakterija, dendritične ćelije se aktiviraju posredstvom Toll-like receptora na površini i uz pomoć enterocita proizvode proinflamatorni citokin IL-8 [49, 53]. Intestinalne epitelne ćelije (Slika 2C) mogu da se ponašaju kao neprofesionalne antigen-prezentujuće ćelije tako što fagocitiraju antigene (ekspresirajući MHC klase I i MHC klase II, ali ne i kostimulatorne molekule). U tom slučaju dolazi do anergije antigen specifičnih CD4⁺ ćelija, ili do moduliranja lokalnog imunskog odgovora, aktiviranjem regulatornih T ćelija [53-55].

2.3 Alergije na hranu

Alergije na hranu predstavljaju problem koji se sve više javlja u modernom društvu. Najčešće pogađa 2-8 % dece i 3-4 % odraslih ljudi u industrijalizovanim zemljama. Alergija na hranu predstavljaju skup nepoželjnih reakcija koji se odražavaju na zdravlje. Neželjena reakcija proizilazi iz specifičnog imunskog odgovora, nakon ponovnog izlaganja organizma određenoj hrani [56]. Prilikom svakog ponovnog kontakta određene hrane dolazi do pojave alergijske reakcije, čak i pri najmanjim dozama. Klinička slika se javlja u obliku: povraćanja, abdominalnih bolova, dijareje, svraba, oticanja sluzokože usta, nesvestice i ponekad sistemske anafilaktičke reakcije.

Najčešći uzročnici alergija su svrstani u čuvenu formaciju “Velikih 8” (*engl.* Big Eight). Organizacija za hranu i poljoprivredu (*engl.* FAO - Food and Agriculture Organization), osnovana pri Ujedinjenim nacijama je kategorisala grupu od 8 potencijalno najvećih izazivača alergija. Namirnice koje dovode do alergijskih reakcija u preko čak 92%

slučajeva pripadaju ovoj “osmici”: mleko, žitarice koje sadrže gluten, morski plodovi i ljuskari, jaja, kikiriki, soja, riba i koštunjavo voće.

2.4 Alergije na kikiriki

Od svih navedenih alergija na hranu, alergija na kikiriki predstavljaju jednu od najopasnijih. Ukoliko se posmatra koja je hrana je izazvala najveći broj anafilaktičkih šokova kod osetljivih pojedinaca, to je definitivno kikiriki i alergija na kikiriki [57, 58]. Bock i saradnici su [59] publikovali da je kikiriki najopasniji izvor alergena, gde su od ukupnog broja alergijskih reakcija čak 63% bile fatalne. Većina alergena hrane imaju tendenciju prevazilaženja u detinjstvu, međutim alergije na kikiriki predstavljaju doživotni problem za oko 80% pacijenata alergičnih na kikiriki [57, 58, 60]. Za sada, uzdržavanje od kikirikija, i izbegavanje hrane koja je potencijalno kontaminirana kikirikijem je jedini vid terapije.

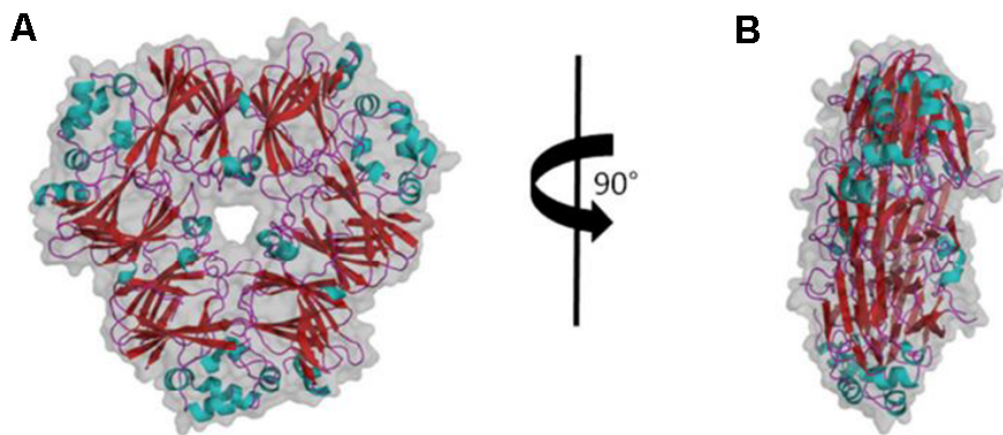
2.5 Alergeni kikirikija

Do sada je identifikovano 16 alergena kikirikija, razvrstanih u sedam različitih proteinskih familija. Alergeni su imenovani kao Ara h 1- 3, Ara h 4 (preimenovan u Ara h 3.02) i Ara h 5-17 (dostupno na URL <http://www.allergen.org/search.php?allergenSource=Arachis+hypogaea>). Senzitivizacija pojedinaca na alergene kikirikija varira sa geografskim područjem [61]. Tako na primer, Ara h 1, Ara h 2 i Ara h 3 su glavni izazivači alergija u SAD (Sjedinjene Američke Države). U Španiji glavni inicijator alergijske reakcije je lipid transfer protein (Ara h 9). U Švedskoj pacijenti reaguju češće na Ara h 1 i Ara h 3, ali najviše su senzitivizovani na Ara h 8, koji je tesno povezan sa proteinom Bet v 1 iz polena breze. U 11 evropskih zemalja, Ara h 2 je okarakterisan kao glavni alergen kikirikija [62]. U istraživanju izvedenom u Holandiji, Ara h 2 je označen kao najpotentniji alergen [63]. Profilin iz kikirikija, Ara h 5, je još jedan alergen iz grupe profilina, koji je tesno povezan sa alergijama na polen. Serumi pacijenata alergičnih na Ara h 5 su takođe pokazali IgE vezujuće sposobnosti na profileline iz polena trave i polena breze [64]. Ara h 6 prati, Ara h 2, kao izuzetno potentan alergen. Podaci o alergijskim sposobnostima Ara h 7 su za sada nepoznate. Senzitivizacija na oleozine (Ara h 10, Ara h 11, Ara h 14, i Ara h 15) iz kikirikija je usko povezan sa ozbiljnim sistemskim reakcijama [65]. Takođe postoje

studije koje su pokazale IgE vezujuće sposobnosti, defensina (Ara h 12 i Ara h 13) iz kikirikija [66].

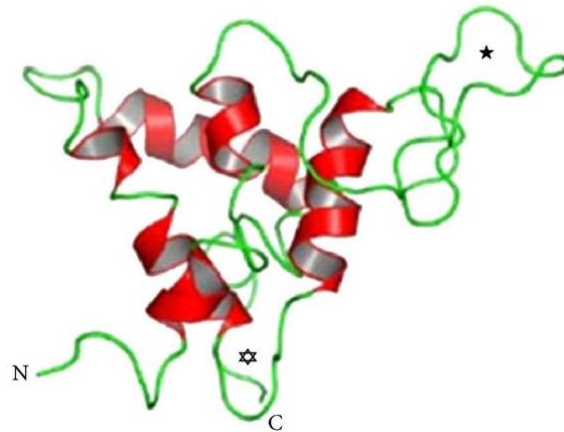
Obzirom da se alergičnost ovih proteina aktivno istražuje, debata o samoj definiciji ko su glavni izazivači alergijskih reakcija je i dalje aktuelna. 1991. godine Burks i saradnici su [67] okarakterisali Ara h 1 i Ara h 2 alergene kikirikija. Pokazalo se da su, Ara h 1 i Ara h 2 odgovorni za preko 90% alergijskih reakcija kod hipersenzitivnih pacijenata [60]. Takođe su napravljene i kristalne strukture proteina od Ara h 1 - Ara h 6. Trenutni konsenzus za glavne alergene kikirikija je uspostavljen na četiri proteina Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 i Ara h 6, koji su ujedno i najdominantniji u izazivanju alergijskog odgovora.

Skladišni proteini su prisutni kao jedna ili više grupa proteina u velikim količinama u semenima, kako bi se obezbedilo skladištenje aminokiselina neophodno tokom klijanja i rasta semena. Ara h 1 i Ara h 3 pripadaju skladišnim proteinima, koji dalje pripadaju kupinskoj superfamiliji [68]. U mahunarkama, kao što je kikiriki, skladišni proteini globulinskog tipa (vicilini), postoje u dva oblika, a to su 7S (Ara h 1) i 11S (Ara h 3) [69]. Ara h 1 je glikoprotein, i čini između 12-16% ukupne količine proteina [70] sa oko 45-95% osetljivih pacijenata u odnosu na ukupnu populaciju subjekata alergičnih na kikiriki [71]. Nativni Ara h 1 je zapravo trimer formiran iz tri identična monomera, i kristalna struktura njegovog jezgra je temeljno istražena (Slika 3) [72]. Molekularna masa monomera Ara h 1 je oko 63.5 kDa, otporan je na toplotu, relativno stabilan na digestiju, i visoko mu je uređena sekundarna struktura [73]. Osnovna struktura je vrlo slična drugim poznatim strukturama proteina koji pripadaju 7S globulinima, i ove sličnosti ukazuju da postoji velika verovatnoća u međusobno unakrsnoj reaktivnosti između proteina 7S globulina [72]. Poznat je 21 linearni epitop koji je identifikovan na kompletnom Ara h 1 proteinu [74, 75], i 14 epitopa koji su nađeni u samom jezgru proteina [72]. Ustanovljeno je da se većina epitopa nalazi ili na površini trimera, ili je zatvorena u trimersku formaciju Ara h 1. Razlog male IgE reaktivnosti nativnog (trimera) leži u tome što su epitopi zatvoreni unutar samog jezgra, ali dolazi do jakog vezivanja IgE antitela kad se trimer denaturiše do monomera [74, 76, 77].



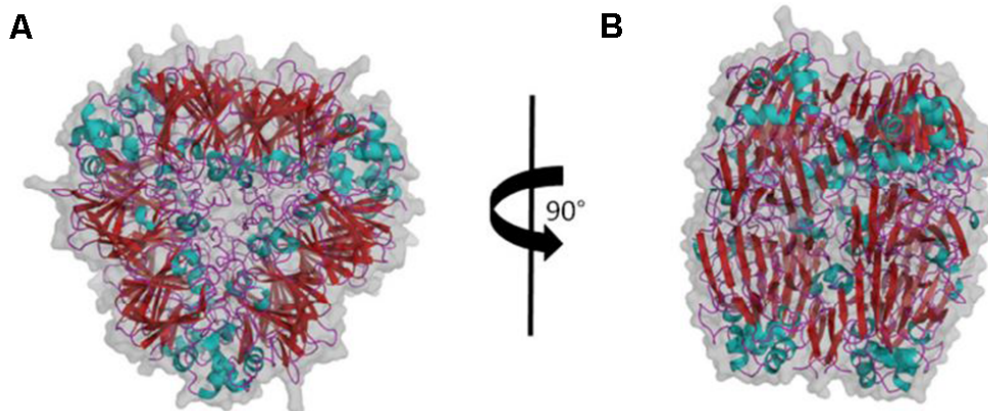
Slika 3 Struktura Ara h 1 trimera. Sekundarne strukture su obojene drugom bojom: α -heliks tirkizno plavom, β -pločice crvenom, a petlje ljubičastom. Molekularna površina oligomera je obojena sivom. Adaptirano i preuzeto od Offermann i saradnika [78].

Ara h 2 i Ara h 6 su 2S albumin skladišni proteini [79], koji pripadaju prolaminskoj super familiji [80]. Ara h 2 je konglutin, molekularne mase od oko 17 kDa, čija je izoelektrična tačka 5.2 [81]. Od ukupnih proteina zastupljen je između 5.9% - 9.3%, zavisno od vrste kikirikija [82]. Ara h 2 istovremeno funkcioniše i kao inhibitor tripsina [83]. Više od 95% pacijenata alergičnih na kikiriki u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) imaju specifična IgE antitela na Ara h 2, i stoga je ustanovljeno da je Ara h 2 potentniji alergen od Ara h 1 [63, 77]. Ara h 2 se sastoji iz pet α -heliksa organizovanih u desno orijentisani super heliks i povezanih u nekoliko produženih petlji (Slika 4). Trodimenzionalna struktura je dodatno stabilizovana sa 4 disulfidna mosta [84]. Pokazano je da njegova tercijarna struktura i funkcija tripsin-inhibitora ostaju očuvane čak i nakon termičke obrade (pečenja) zahvaljujući prisustvu disulfidnih veza [24, 32, 83]. Na Ara h 2 proteinu je pronađeno 10 epitopa, koji su izloženi na površini [85]. Amino kiselinska sekvenca je bogata glutaminskom i asparaginskom aminokiselinom, kao i glicinom, i argininom, koje pokazuju sličnosti sa skladišnim proteinima konglutinske familije.



Slika 4 α -heliksi su prikazani crveno na 3D modelu Ara h 2; Preuzeto i modifikovano od Bare i saradnika (2005) [85]. Petlje na N- i C- terminalnom kraju su obeleženi sa zvezdicama.

Struktura i funkcija Ara h 3 je prvi put objašnjena 1996. godine [86, 87]. Prepoznaje ga oko 50% pacijenata alergičnih na kikiriki, a takođe funkcioniše i kao inhibitor tripsina [88]. Kompletan Ara h 3 protein je heksamer (360-380 kDa) formiran sa dva trimera, orijentisanih jedan naspram drugog (Slika 5) [89]. Svaki monomer sadrži 4 linearna epitopa [87]. Proteolitičko procesovanje Ara h 3 se ne odvija na uređeni način, tako da bazna i kisela subjedinica variraju u masi, a prilikom elektroforeze Ara h 3 se detektuje kao mnoštvo traka u opsegu od 14-60 kDa [90]. Obzirom da se alergijska reakcija na Ara h 3 ne javlja pojedinačno, već u kombinaciji sa drugim alergenima kikirikija, senzitivizacija na Ara h 3 se javlja kao sekundarna reakcija i predstavlja posledicu povećane propustljivosti intestinalnog epitela usled alergijske reakcije pri susretu sa primarnim alergenima [91]. Koppelman je sa svojim saradnicima pokazao da se IgE vezuje u većoj meri za baznu subjedinicu, nego za kiselu subjedinicu [69].



Slika 5 Struktura Ara h 3 heksamera. Sekundarne strukture su obojene drugom bojom: α -heliks tirkizno plavom, β -pločice crvenom, a petlje ljubicastom. Molekularna površina oligomera je obojena sivom. Adaptirano i preuzeto od Offermann i saradnika [78].

Ara h 6 je protein od oko 15 kDa i pripada konglutinskoj porodici. Oko 59% sekvence se preklapa sa Ara h 2 proteinom, i slično vezuju IgE antitela [92, 93], tako da im se i epitopi poklapaju. Ara h 6 je stabilan na proteolizu i termičku obradu [94, 95]. Važno je napomenuti, iako prilično neuobičajena, monosenzitizacija na Ara h 6 postoji, i izaziva jake alergijske reakcije [96].

2.6 Termalna obrada alergena hrane

Dovođenje u vezu alergnosti i termičke denaturacije je konstantno pod naučnom raspravom, jer koliko ima onih koji ne osporavaju datu hipotezu, toliko ima onih koji tu vezu osporavaju [97]. Termička obrada može da utiče na IgE vezujuća mesta alergeni proteina u hrani, na način da povećava ili smanjuje alergeni potencijal [98]. Sam ishod zavisi od strukture i hemijskih sposobnosti alergena, tipa termičkog procesovanja (da li se procesovanje odvija u vodenim, ili bezvodnim uslovima), temperature i vremena zagrevanja [99]. Termička obrada dovodi do strukturnih i hemijskih promena na proteinu, odnosno alergenu. Proteini se denaturišu, agregiraju, vezuju za lipide, podležu možda i najvažnijim kovalentnim modifikacijama proteina, glikozilaciji ili glikaciji tzv. Majarovoj reakciji (*engl.* Maillard reaction). Druge modifikacije uzrokovane zagrevanjem su: oksidacija lipida [100, 101], izvrtnje disulfidnih veza, deamidacija asparagina [99], itd. Gubitak tercijarne strukture počinje sa odmotavanjem proteina.

Generalno, gubitak sekundarne strukture počinje na oko 55-70 °C, raskidanje disulfidnih mostova se odvija na temperaturi između 70-80 °C, formiranje novih intra- i inter- molekularnih interakcija, ponovno sklapanje disulfidnih mostova se odvija na temperaturi od oko 80-90 °C, a formiranje agregata započinje između 90-100 °C [99]. Kikiriki se obično kuva na 100 °C, 20 minuta [4], a za laboratorijske svrhe, temperature pečenja se odvijaju između 160 °C do 176 °C u različitim vremenskim intervalima [4] od po 5-50 minuta. Agregacija podrazumeva proteinsko kovalentno modifikovanje (spajanje proteina), ali ne preko disulfidne veze. Povećana imunogenost agregiranih antigena je davno objašnjen fenomen u imunologiji. Takođe, postoje snažne indicije da agregacija alergena može da poveća alergnost [102]. Na molekularnom nivou, ukoliko koristimo termičku obradu, linearne epitope proteina je mnogo teže neutralisati nego konformacione epitope. Linearni epitopi pripadaju primarnoj strukturi, koju je teško narušiti čak i na temperaturama većim od 125 °C. Sa druge strane, strukturu konformacionih epitopa je vrlo lako narušiti, samo ako se poremeti sekundarna ili tercijarna struktura proteina, dovoljno je da se temperatura poveća između 50-125 °C, u slučaju kazeina i proteina surutke [103].

Usled visokih temperatura, kovalentna veza između lizina na proteinu i bilo koje druge komponente iz matriksa hrane, može da dovede do formiranja raznih adukata [104]. Amino grupa proteina se modifikuje sa nekim redukujućim šećerom, ketozom, aldehidom i dolazi do formiranja Amadorijevih proizvoda. Nakon toga, Amadorijevi produkti se degraduju do dikarbonil intermedijera. Ove komponente su mnogo reaktivnije nego sam šećer koji je započeo reakciju, i dalje nastavlja da reaguje sa drugom amino grupom i formira stabilnije krajnje Majarove proizvode. Dodatno, Majarova reakcija može da dovede do gubitka ili do modifikacije nekih aminokiselina, kao što su lizin i cistein, tom prilikom dolazi do stvaranja malanoidina [105, 106].

Studije koje su rađene na kivanom kikirikiju pokazuju znatno manju senzitivaciju i IgE reaktivnost kivanog kikirikija u odnosu na pečeni kikiriki. IgE vezivanje monomernog Ara h 1 i Ara h 1 trimera kivanog kikirikija prikazuje značajno smanjenje, u poređenju sa imunoblotovima koji su rađeni na pečenom kikirikiju. Termički tretirani Ara h 1 može da formira stabilne dimere, trimere i velike komplekse. Al-Mussawir je sa saradnicima [107] istražio razlike u alergnom potencijalu između kivanog i pečenog

kikirikija, i njihovi rezultati su pokazali da kuvanje u vodi dovodi do smanjivanja alergenosti, dok je pečenje povećava. Sličnu studiju je radila i Maleki sa svojim saradnicima [30], i ustanovila da ekstrakt pečenog kikirikija vezuje IgE antitela kod alergičnih pacijenata, čak do 90 puta više, nego sirovi kikiriki. Maleki je u ovoj studiji zaključila da je zapravo Majarova reakcija odgovorna za pojačani efekat vezivanja kod pečenog kikirikija. Maleki je nastavila da se bavi ovom temom [83], i u daljim studijama ustanovila da pečenje kikirikija dovodi do toga da Ara h 2 alergen iz kikirikija, postaje snažniji tripsin inhibitor (čak za 3.5 puta više), što ga dalje štiti od tripsinske hidrolize tokom intestinalne digestije. U ovoj studiji, je takođe pokazano da Ara h 2 štiti Ara h 1 u toku digestije. U pojedinim slučajevima, termička obrada može da dovede do smanjena proteolize određenog alergena, kao što su Ara h 1 i Ara h 2 u kikirikiju [4]. Chung i Champaigne [108] su objavili da protein–šećer kompleks nastao u toku Majarove reakcije može da dovede do umrežavanja sa proteinima, i da je to momenat kada se formiraju složeni glikacijski završni proizvodi (*engl.* advanced glycation end-products; AGE) koji povećavaju IgE vezivanje. Oni su zaključili da dolazi do formiranja karboksi- metil- lizina na površini proteina, što dalje dovodi do jačeg vezivanja IgE za Ara h 1 i Ara h 2. Termička obrada može još da dovede do proteinske agregacije i umrežavanja, i to dovodi do posrednog uticaja na pojačanu alergenost. Npr., IgE vezivanje alergena Ara h 1 i Ara h 2 se povećava nakon pečenja, a smanjuje nakon kuvanja [109, 110]. U ovoj studiji je pokazano da pečenje agregira i umrežava proteine, dok kuvanje i dužina kuvanja utiče na alergenost proteina kikirikija, obzirom da je pokazano da proteini tokom kuvanja izlaze iz samog zrna kikirikija [111]. Ara h 1 kao trimer ima visoku termičku stabilnost i otporan je na gastrointestinalnu proteolizu, i tako uspeva da zaštiti svoja IgE vezujuća mesta. IgE reaktivnost kod Ara h 2 i Ara h 3, je znatno manja u slučaju kuvanog kikirikija [32]. Schmitt sa saradnicima [4] je detektovao, IgE reaktivnost u rastvorljivoj i nerastvorljivoj frakciji, što je ukazalo da kuvani kikiriki ima znatno manju IgE reaktivnost u rastvorljivoj frakciji u poređenju sa nerastvorljivom frakcijom pečenog kikirikija. Naučna javnost veruje da smanjnje IgE reaktivnosti u kuvanom kikirikiju nije u vezi sa njegovim strukturnim promenama, već dominantno zbog izlaska (curenja) proteina iz matriksa u vodu u kojoj se odvija kuvanje. Ovim se objašnjavaju i manji procenat alergije na kikiriki u onim zemljama gde se kikiriki jede kuvani [110].

2.7 Digestibilnost alergena kikirikija

Stabilnost na proteolizu je jedna od pretpostavljenih osobina alergena iz hrane. Proteini koji imaju sposobnost da senzitivizuju mukozni imunski sistem gastrointestinalnog trakta moraju da prežive sam proces varenja, i da ostanu ili intaktni ili u obliku velikih fragmenata [112]. Različiti modeli *in vitro* digestije su bili predlagani, sa ciljem boljeg razumevanja alergene stabilnosti i potencijalne alergnosti. Astwood i saradnici [5], su došli do zaključka da stabilnost na digestiju, u izuzetno kiselim uslovima, u prisustvu pepsina, je važan i po njima jedini validni parameter za razlikovanje alergernih proteina od nealergernih, u hrani. Astwood-ova studija dalje implicira da alergeni hrane koji su sposobni da dospeju u intestinalnu mukozu kao intaktni, mogu potencijalno da izazovu alergijsku reakciju. Fu je sa saradnicima [6] kritikovao Astwood-ovu teoriju, demonstrirajući da odnos između stabilnosti određenog proteina u simuliranoj gastričnoj tečnosti i alergnosti tog proteina nije konstantna u različito izvođenim studijama.

Poređenje digestovanih alergena kikiriki ekstrakta je vrlo teško interpretirati, i to je jedan od razloga zašto se većina naučnika odlučuje da u svojim eksperimentima koristi komercijalno dostupne alergene [7, 76], ili prečišćene alergene [11]. Studije digestibilnosti izvođene na alergenima hrane su bazirane obično na odnosu mase enzima i alergena, ili na odnosu molarnosti između enzima i alergena. Ofori-Anti i saradnici [78] smatraju da korišćenje konstante mase enzima omogućava najpouzdanije poređenje, i primeri odnosa masa enzima i alergena je prikazano u Tabeli 1. Najpouzdaniji način za poređenje je na osnovu enzimske aktivnosti izražene u jedinicama po miligramu čvrste supstance enzima. Primeri ovog načina izvođenja testa digestibilnosti je prikazano u Tabeli 1. Vreme same degradabilnosti proteina, je variralo od proteina do proteina. Takođe degradabilnost pojedinačnih proteina se razlikovalo od uslova do uslova same digestije. Stabilnost peptidnih fragmenata nastalih u toku digestije, nedovoljno je istražena, kao i veličina dobijenih fragmenata (Tabela 1). Thomas sa svojim saradnicima [7], kao i Ofori-Anti sa svojim saradnicima [8], su naglasili značaj koji se mora dati dobijenim fragmentima nakon digestije alergena hrane. Važan značaj moraju da dobiju i fragmenti alergena kikirikija Ara h 1 i Ara h 2, koji formiraju stabilne fragmente nakon digestije koji zadržavaju značajne IgE vezujuće osobine [113].

Tabela 1 Pregled objavljenih podataka o digestibilnosti glavnih alergena kikirikija nakon *in vitro* gastrične digestije.

Alergen	Velčina (kDa)	Pepsin/ alergen (w/w) (u finalnoj smeši)	Enzimska aktivnost (U/mg)/ alergen (u finalnoj smeši)	pH	Ekstrakt kikirikija (PE) ili prečišćen protein (PP)	Vreme digestije [min.]	Stabilnost proteina [min.]	Velčina peptidnog fragmenta (kDa)	Ref.
Ara h 1, Kupin (Vicilin tip, 7S globulin)	64	nd	170	2.5	PP	120	< 10	<4	[114]
		0.025	80	2.1	PP		1	<20	[115]
		0.05	162	2.5	PP	120	1	5.5	[116]
		12.8	nd	1.2	PP	120	5	nd	[6]
		3.04	10,000	1.2	PP	60	0.5	nd	[11]
		0.3	1,000	1.2	PP	60	0.5	nd	[11]
		0.03	100	1.2	PP	60	0.5	nd	[11]
		3.04	10,000	1.2	PE	60	0.5	nd	[11]
		0.63	2540	1.2	PE	60	1	nd	[9]
		0.0001	nd	2	PE	1200	30	<35	[10]
Ara h 2, Konglutin (2S albumin)	17	3	10,000	1.2	PP	60	0-2	10	[7]
		3	10,000	2	PP	60	0-30	10	[7]
		19	nd	1.2	PP	60	/	/	[5]
		12.8	nd	1.2	PP	120	0.5	nd	[6]
		3.04	10,000	1.2	PP	60	16	10	[11]
		0.3	1,000	1.2	PP	60	/	/	[11]

		0.03	100	1.2	PP	60	/	/	[11]
		3.04	10,000	1.2	PE	60	16	/	[11]
		0.63	2540	1.2	PE	60	15	nd	[9]
Ara h 3, kupin (Legumin- tip, 11S globulin, Glicinin)	60	3.04	10,000	1.2	PP	60	0.25	nd	[11]
		0.3	1,000	1.2	PP	60	0.25	nd	[11]
		0.03	100	1.2	PP	60	0.25	nd	[11]
		0.002	nd	2	PP	120	<2	<14	[117]
		3.04	10,000	1.2	PE	60	0.25	nd	[11]
		0.63	2540	1.2	PE	60	1	nd	[9]
Ara h 6 Konglutin (2S albumin)	15	3.04	10,000	1.2	PP	60	4	10	[11]
		0.3	1,000	1.2	PP	60	16	10	[11]
		0.03	100	1.2	PP	60	/	/	[11]
		3.04	10,000	1.2	PE	60	60	10	[11]
		0.63	2540	1.2	PE	60	15	nd	[9]

Eksperimenti [118] su takođe pokazali da matriks iz hrane ima ogroman uticaj na dostupnost alergena. Ovi autori su objasnili kako prilikom digestije u kiselim uslovima, hrana bogata mastima može da zakloni alergene epitope od uticaja digestivnih proteaza [119]. U toj studiji predložen je model interakcije alergena Ara h 1 sa lipidnim komponentama, koja doprinose alergnosti Ara h 1.

2.7.1 Harmonizovani, statički *in vitro* test digestibilnosti: COST INFOGEST protokol

Testovi digestibilnosti, pomenuti u Tabeli 1, nisu bili dizajnirani da oponašaju relevantno fiziološko stanje humane oralne, gastrične ili gastrointestinalne digestije. Interakcije komponenti matriksa hrane mogu da utiču na otpornost pojedinih proteina ka

digestiji, zaklanjajući ih od enzima, kao i na druge brojne načine koji su nedovoljno istraženi.

Procena hidrolize proteina hrane u uslovima koji se odvijaju u humanom gastrointestinalnom traktu jeste jedan od prvih koraka u analizi alergena hrane. Minekus i saradnici [15] su u svojoj publikaciji predložili *in vitro* test digestibilnosti sa uzastopnim dodavanjem digestivnih enzima i elektrolita u koncentracijama kakve su fiziološke, što omogućava realniji uvid u multifazni digestivni proces. Tradicionalni *in vitro* digestivni testovi se obično odnose na *in vitro* gastričnu digestiju, a INFOGEST protokol omogućava izvođenje sve faze *in vitro* digestije: usitnjavanje hrane (simulacija žvakanja) koje se javlja u oralnoj fazi uz dejstvo enzima amilaze, potom digestija pepsinom u gastričnoj fazi, kao i proteoliza enzimima intestinalne faze.

Protokol je naširoko korišćen, npr. u proceni otpuštanja karoteonoida i fenolnih jedinjenja iz različitih voćnih matriksa [120, 121]. Najviše studija je rađeno na evaluaciji digestije proteina, lipida i skroba u hrani. Proteini i njihovi proteolitički produkti su procenjivani u mlečnim proizvodima [122, 123], pasti [124], lešniku [125] i kikirikiju [16, 17]. Oralnu-gastrointestinalnu digestibilnost celog zrna sirovog kikirikija su procenjivali Di Stasio i saradnici [16], dok je Rao sa saradnicima procenjivao oralno-gastrointestinalnu digestibilnost, ali termički (kuvanog i pečenog) tretiranog kikirikija [17].

2.8 OMIKS tehnologije u alergijama na hranu

Fudomika (engl. Foodomics), predstavlja disciplinu koja istražuje hranu i ishranu uz pomoć omics tehnologija [126]. Digestomika kao grana fudomike se bavi i istraživanjima dobijenih peptida nakon digestija, i predstavlja poseban značaj, jer proizvodi proteinske degradacije mogu da dovedu do pozitivnog uticaja na organizam, ali mogu i da dovedu do neželjenih reakcija, kakve su alergije, intolerancije itd.

Digestomika (engl. Digestomics) predstavlja relativno novi koncept u proteomici, tj., novu platformu za istraživanje digestije proteina hrane i bolje razumevanje funkcionalnih i aktivnih peptida. S obzirom da svarena hrana može da izazove određeni

tip imunog odgovora, digestomika je i ovde pronašla primenu u identifikaciji i dijagnostici alergena hrane.

Alergenomika (*engl.* Allergenomics) se bavi ispitivanjem alergena i njihovih fragmenata dobijenih iz hrane putem detekcije, identifikacije, kvantifikacije, sa biohemijskog, imunološkog i dijagnostičkog stanovišta [127]. Sinteza omics tehnologija, poput digestomike i alergenomike je dovela do boljeg uvida u fragmente alergena i proteina (male ili velike) nastale nakon enzimskih hidroliza, i potencijalno boljeg razumivanja porekla alergijskog odgovora.

3. Ciljevi rada

Stabilnost proteina hrane u toku varenja je bitna pretpostavka alergnosti. Digestija alergena kikirikija koja se odvija pod fiziološki relevantnim uslovima se razlikuje od brojnih drugih *in vitro* preporučenih testova, ne samo zbog drugačije pH vrednosti, aktivnosti pepsina, nego prvenstveno i zbog kompleksnog matriksa u kom se proteini nalaze. Takođe, pokazano je da termička obrada hrane, ima različite efekte na alergene, od smanjivanja do povećavanja alergnosti, čak i kada se nalaze u složenom matriksu hrane.

Stoga, imajući u vidu osobine alergena kikirikija i matriksa njegovog zrna, kao i nepostojanje studija koje izučavaju fiziološki oponašano varenje celog zrna sirovog, barenog i pečenog kikirikija na osnovu standardizovanog INFOGEST protokola, definisano je tri glavna cilja:

1. Ispitivanje ekstraktoma i digestoma celog zrna sirovog, kuvanog i pečenog kikirikija, dobijenih nakon *in vitro* simulacije fizioloških uslova oralno-gastrične i oralno-gastrointestinalne digestije, uz striktnu primenu harmonizovanog INFOGEST protokola, kako bi se dobili relevantni rezultati vezani za otpornost alergena kikirikija na razne faze digestije.
2. Pronalaženje optimalnog metoda odmašćivanja digestovanog uzoraka hrane bogate lipidima, poput kikirikija, u datom kontekstu istraživanja, kao i daljeg razvoja i optimizacije elektroforetskih tehnika kojim bi odmašćivanje uzoraka bilo izbegnuto, čime bi se sačuvao originalni ekstraktom/digestom, bez gubitaka proteina i njihovih fragmenata.
3. Identifikacija malih i velikih peptida proteina celog zrna sirovog kikirikija otpornih na proteolizu nakon simulirane oralno-gastrične digestije metodama proteomike, njihove strukturne analize i istraživanje njihovog alergnog potencijala pomoću testova vezivanja IgE antitela iz seruma pacijenata alergičnih na kikiriki.

Da bi se ovi ciljevi postigli, urađeni su sledeći eksperimentalni zadaci:

1. Optimizacija kvantitativnog izolovanja i pripreme uzorka digestovanog sirovog i termički tretiranog kikirikija, sa reproduktivnim profilima ekstraktoma, digestoma i nerastvornih frakcija (talog nakon digestije).
2. Obzirom na istovremene procese oslobađanja proteina iz zrna kikirikija i njihove oralno-gastroične/oralno-gastrointestinalne digestije, analize ekstraktabilnosti i digestibilnosti sirovog i termički obrađenog kikirikija sprovedene su određivanjem koncentracije proteina metodama BCA i denzitometrije, kao i jednodimenzionalnim elektroforetskim tehnikama.
3. Poređenje različitih metoda odmaščivanja uzoraka sirovog, barenog i pečenog kikirikija nakon oralno-gastroične/oralno-gastrointestinalne digestije, kako bi se elektroforetskim tehnikama i merenjem koncentracija proteina i peptida pomoću BCA eseja i denzitometrije stekao realan uvid u uticaj lipida na digestiju alergena kikirikija.
4. Optimizacija dvodimenzionalnih elektroforetskih tehnika, tj. izoelektričnog fokusiranja na model sistemima sa visokim sadržajem lipida i polifenola poput lešnika i neodmaščenog polena trave mačiji repak (*Phleum pratense*).
5. Adekvatna i tačna primena INFOGEST protokola (stroga komplijansa ka protokolu) širenjem asortimana digestovanih uzoraka sa različitom prirodom matriksa hrane (pileće belo meso, orah, spanać, mleko, lešnik) kako bi se ukazalo na neophodnost striktnog poštovanja protokola, usled zaštitnih ili suprotnih efekata matriksa na digestiju alergena.
6. Analiza efikasnosti oralno-gastroične digestije alergena sirovog i termički obrađenog kikirikija u vremenu, a obzirom na njen značaj u fazama izlaska gastroičnog bolusa u duodenum i potencijala za senzitivaciju.
7. Razvoj semi kvantitativne proteomičke metode za procenu efikasnosti pepsinske digestije, određivanja specifičnih mesta pepsinske proteolize u sekvenci glavnih alergena kod sirovog kikirikija i kvalitativno profilisanje njihovih posttranslacionih modifikacija.

8. Analiza velikih fragmenata dobijenih nakon oralno-gastroične digestije sirovog kikirikija proteomičkim metodama.
9. Analiza malih fragmenata dobijenih nakon oralno-gastroične digestije sirovog kikirikija proteomičkim metodama.
10. Analiza IgE vezujućih sposobnosti malih i velikih fragmenata dobijenih nakon oralno-gastroične digestije sirovog kikirikija proteomičkim metodama jednodimenzionalnog i dvodimenzionalnog imunolota, kao i ELISA testovima.
11. Strukturna karakterizacija fragmenata otpornih na proteolizu dobijenih nakon oralno-gastroične digestije sirovog kikirikija spektroskopijom cirkularnog dihroizma.

4. Materijal i metode

4.1 Priprema sirovog i termički obrađenog kikirikija

Sirovi kikiriki (*Arachis hypogaea* L.) sa ljuspicom (100 g), je kupljen u lokalnoj prodavnici. Jedan deo sirovog kikirikija je ispečen u prethodno zagrejanom rerni (170 °C, 20 minuta), drugi deo kikirikija je kuvan u ključaloj vodi u zatvorenom sudu (100 °C, 20 minuta) [32], dok je treći deo ostao netretiran. Sva tri preparata kikirikija su samleveni u mlinu za kafu (800 W; Bosh, Nemačka), 3 puta po 5 minuta, kako bi se dobile čestice veličine manje od 1.5 mm.

4.2 Priprema i termička obrada različitih tipova hrane

Sirovi spanać (*Spinacia oleracea* L.), sirovi orah (*Juglans regia* L.), sirovi lešnik (*Corylus avellane* L.) i pileće belo meso su kupljeni u lokalnoj prodavnici. Pileće belo meso je kuvano 30 minuta na 75 °C [128]. Svi preparati su samleveni u mlinu za kafu (800 W; Bosh, Nemačka), 3 puta po 5 minuta, kako bi se dobile čestice veličine manje od 1.5 mm. Pasterizovano (iz tetrapaka) mleko (3.2% masti) je kupljeno u lokalnoj prodavnici, i kao takvo je korišćeno za eksperimente.

4.3 Priprema štok rastvora simuliranih digestivnih sokova

Koncentracija elektrolita u koncentrovanim rastvorima simuliranih sokova varenja u usnoj duplji (SSF), želucu (SGF) i tankom crevu (SIF) je prikazana u Tabeli 2. Takođe su prikazane i finalne koncentracije elektrolita u digestivnoj smeši. Svi rastvori su pre upotrebe zagrejani do temperature od 37 °C.

Tabela 2 Koncentracije štok rastvora za pripremu simuliranih tečnosti.

Supstanca	SSF štok rastvor	Finalna koncentracija u oralnoj fazi reakcione smeše	SGF štok rastvor	Finalna koncentracija u oralno-gastroičnoj fazi reakcione smeše
KCl	15.1 mM	6.04 mM	6.9 mM	6.67 mM
KH ₂ PO ₄	3.7 mM	1.48 mM	0.9 mM	1.19 mM
NaHCO ₃	13.6 mM	5.44 mM	25 mM	15.22 mM
NaCl	-	-	47.2 mM	23.6 mM
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0.15 mM	0.06 mM	0.1 mM	0.08 mM
(NH ₄)CO ₃	0.06 mM	0.024 mM	0.5 mM	0.263 mM
HCl	1.1 mM	0.44 mM	240 mM	122.45 mM
pH	7.05	6.68 ± 0.12	3.00	2.91 ± 0.18

4.4 Simulacija fizioloških uslova oralno-gastroične i oralno-gastrointestinalne faze digestije

Oralna faza: Samleven kikiriki (200 mg sirovog, 246 mg kuvanog i 170 mg pečenog) sa ljuspicom je pomešan sa 100 µL 2x SSF štok rastvora. Humana salivarna α -amilaza (20 µL, 1500 U/mL u vodi) je dodata kako bi se postigla finalna koncentracija od 75 U/mL u digestivnoj smeši. Nakon amilaze dodat je CaCl₂ (20 µL, 15 mM), da bi se finalno se postigla koncentracija CaCl₂ od 0.75 mM. U uzorke sirovog, kuvanog i pečenog kikirikija dodata je različita količina vode, tj. je 60, 14 i 90 µL, respektivno, kako bi se nivelisao gubitak (kod pečenja) i absorpcija (kod kuvanja) vode u toku termičkog procesovanja, tj. dopunila se smeša do 400 µL. Svi reagensi su prethodno

zagrejeni na 37 °C. Reakciona smeša je inkubirana 2 minuta na 37 °C uz konstantno mešanje. Nakon 2 minuta, gastrična faza se nadovezala na oralnu fazu.

Kontrolni uzorci su tretirani na isti način, osim što je u kontrolnim uzorcima bez kikirikija, kikiriki je zamenjen sa istom zapreminom kvarcnog peska (200 µL), dok je u kontrolne uzorke bez amilaze dodato 20 µL vode.

Gastrična faza: Kompletna oralna faza (400 µL) je pomešana sa pepsinom poreklom iz svinje (356 µL; 4500 U/mL u 1x SGF), a finalna koncentracija je bila 2000 U/mL u reakcionoj smeši. sa 20 µl CaCl₂ (3 mM u 1x SGF), da bi se postigla finalna koncentracija jona kalcijuma od 75 µM u smeši. pH smeše je podešen na ~pH 3 pomoću 1 M HCl i 1x SGF je dodat do finalne zapremine od 800 µL. Reakciona smeša je inkubirana 120 minuta na 37 °C sa pojačanim mešanjem (600 obrtaja ili trešenja u minuti). Digestija je stopirana dodatkom 200 µL 2 M NaHCO₃. pH reakcione smeše nakon dodatka 2 M natrijum karbonata iznosila je 8.0. Svi uzorci su centrifugirani na 10 000 g, 20 minuta. Nakon centrifugiranja, gastrična tečna faza je odvojena od čvrstog taloga i odmah zamrznuta na -20 °C.

Kontrolni uzorci digestije su rađeni paralelno, ali bez prisustva digestivnih enzima. Kontrolni uzorak kikirikija je bio oralni bolus bez amilaze sa dodatkom od 356 µL 1x SGF umesto rastvora pepsina. Kontrola pepsina je bila 0.2 mL koncentrovanog 1x SSF rastvora i 0.2 g kvarcnog peska umesto oralnog bolusa na nultom minutu (Pepsin 0') i 120. minutu (Pepsin 120').

Oralno-gastrointestinalna faza: Kompletan gastrični bolus od 800 µL je nakon 120 minuta pomešan sa suspenzijom pankreatina pripremljenoj u 400 µL 1x SIF, sa 400 U/mL tripsinske aktivnosti u simuliranoj intestinalnoj tečnosti. Finalna aktivnost tripsina u smeši je iznosila 100 U/mL [15]. Žučne soli su dodate kako bi se postigla finalna koncentracija od 10 mM (61 µL; 263 mM), a CaCl₂ je dodat da bi se postigla koncentracija od 0.3 mM u finalnoj digestivnoj smeši (50 µL; 20 mM). Neophodna zapremina od 1 M NaOH (100 µL) je dodata kako bi se postigla finalna vrednost od pH 7.0. Na kraju, dodato je 189 µL dejonizovane vode kako bi se postigla koncentracija elektrolita od 1x SIF. Uzorci su inkubirani 120 minuta, na 37 °C. Digestija je stopirana dodatkom 50 µL inhibitora proteaza, 4-(2-aminoetil) benzensulfonil fluorid hidrohlorida

(AEBSF), koncentracije 32 mM, čija je finalna koncentracija u oralno-gastrointestinalnoj tečnosti bila 1 mM.

Kontrolni uzorci (negativna kontrola oralno-gastrointestinalne digestije) su rađeni paralelno uz prave digestovane uzorke kikirikija. Kontrola kikirikija je bio gastrični bolus bez pankreatina sa dodatkom od 400 μ L 1x SIF umesto rastvora pankreatina i ostalim komponentama kao kod uzoraka digesta.

Kontrola pankreatina je bila u nultom minutu (Pankreatin 0') i 120. minutu (Pankreatin 120'). Kontrolni uzorak pankreatina, napravljen sa kvarcnim peskom (umesto kikirikija, 200 μ l), sadržao je kompletnu simuliranu salivarnu i gastričnu tečnost od 800 μ L. Ovaj uzorak je pomešan je sa pankreatičnom suspenzijom pripremljenoj u 400 μ L 1x SIF, i ostalim komponentama kao kod uzoraka digesta. Za kontrolu pankreatina u nultom minutu je dodato 50 μ L AEBSF (32 mM) pre pankreatina, a za kontrolu u 120. minutu (nakon isteka intestinalne digestije). Nakon centrifugiranja, tečna faza je odvojena od čvrstog taloga i odmah zamrznuta na -20 °C.

4.5 Tretmani odmaščivanja tečne faze uzoraka kikirikija n-heksanom i trihlorsirćetnom kiselinom u acetonu (TCA/aceton) nakon oralno-gastrične i oralno-gastrointestinalne faze digestije

Nakon oralno-gastrične i oralno-gastrointestinalne faze digestije uzorci su centrifugirani na 10, 000 g 20 minuta, i tečna faza je odvojena u svakom uzorku i podeljena na tri jednaka dela radi testiranja različitih načina odmaščivanja. Jedan alikvot je sačuvan kao netretiran tj. neodmašćen. U drugom alikvotu lipidi su uklonjeni tako što su proteini potaloženi sa TCA/aceton metodom: 200 μ L tečne faze je pomešano sa istovetnom zapreminom 20% TCA u acetonu, i ostavljeno preko noći na -20 °C. Centrifugiranjem na 13, 000 g u periodu od 30 minuta, uklonjeni su supernatanti. Potaloženi proteini su oprani dva puta sa 1 mL hladnog acetona, a tokom ispiranja talog je razbijan inkubiranjem u ultrazvučnom kupatilu, a potom intenzivno vorteksovan, pa centrifugiran na 13, 000 g u trajanju od 15 minuta. Isprani talozi su osušeni na sobnoj temperaturi, 1 h, a potom resuspendovani u 200 μ L 1.5 x Laemmli pufera za elektroforezu (u redukujućim i neredukujućim uslovima) [129]. Treći alikvot tečne faze

nakon digestije (400 μ L) je odmašćen sa n-heksanom: 9 zapremina n-heksana sa jednom zapreminom uzorka je mešano tokom 60 minuta na sobnoj temperaturi, a potom centrifugirano 30 minuta na 4 000 rpm (2150 g). Gornji n-heksanski sloj je odbačen, a reekstrakcija lipida je ponovljena dva puta na isti način. Postupak je bio identičan za sve preparate (sirovi, pečeni i kuvani kikiriki).

4.6 Priprema nerastvornih frakcija (taloga) sirovog, barenog i pečenog kikirikija nakon gastrične digestije za SDS-PAGE analizu

Talog nakon gastrične faze digestije, koji potiče od 0.2 g kikirikija, je posmatran kao nerastvorna (nesolubilna) frakcija i ekstrahovan je sa denaturišućim puferom (8 mL; 7 M urea, 2 M Thiourea, 2% 3- [(3 – holamidopropil) dimetil amonio] – 1 - propanesulfonat (CHAPS), 1% Triton X-100 in 200 mM NaHCO₃ pH 8.0). Uzorci su vorteksovani (3x, 30 s), a potom dodatno ekstrahovani na ultrazvučnom kupatilu 45 minuta uz hlađenje, tako da temperatura vode u kupatilu nije prelazila 30 °C. U dobijenoj suspanziji pH je podešen na 8,5 pomoću 1 M NaHCO₃ (pH 9.0), i suspenzija je ostavljena preko noći (oko 18 h). Narednog dana, pH je potvrđena indikatorskom hartijom i uzorci su centrifugirani na 13 000 rpm, 20 minuta. Supernatan je odvojen i korišćen za SDS-PAGE analizu.

4.7 1D SDS PAGE analiza tečne faze sirovog, barenog i pečenog kikirikija nakon oralno-gastrične i oralno-gastrointestinalne digestije

Proteini tečne faze oralno-gastrične i oralno-gastrointestinalne digestije sirovog i termički tretiranog kikirikija, pre i nakon različitih tretmana za odmašćivanje (TCA/acetone i n-heksan), su analizirani na 14% poliakrilamidnom (PAA) gelu pod redukujućim i neredukujućim uslovima po protokolu koji je predložio Laemmli [129]. Takođe, proteini koji su dobijeni iz nerastvorne frakcije su analizirani u redukujućim i neredukujućim uslovima. Gelpvi su bojeni sa Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka) [130]. Po preporuci INFOGEST protokola [15], po bunaru je aplicirana je količina proteina na osnovu iste zapremine: po

10 μ L tečne faze svakog ekstrakta i digesta oralno-gastroične faze, tj. 20 μ L ekstrakta i digesta oralno-gastrointestinalne faze.

4.7.1 1D SDS PAGE analiza tečne faze uzoraka digestovane hrane sa kvalitativno različitim matriksom nakon gastrične digestije

Sirovi spanać (*Spinacia oleracea* L.), sirovi orah (*Juglans regia* L.), lešnik (*Corylus avellane* L.) i pileće belo meso su kupljeni u lokalnoj prodavnici. Pileće belo meso je kuvano 30 minuta na 75 °C [131]. Svi preparati su dalje tretirani kao u odeljku 4.1. Pasterizovano mleko (3.2% masti) je kupljeno u prodavnici, i korišćeno bez bilo kakve obrade.

Uzorci su podlegli oralnoj i gastričnoj digestiji kao što je opisano u odeljku 4.4, a zatim tretmanu taloženja proteina tečne faze sa TCA/acetonom, koji je opisan u odeljku 4.5.

4.7.2 1D SDS PAGE analiza tečne faze sirovog, barenog i pečenog kikirikija nakon oralno-gastroične digestije u različitim vremenskim intervalima

U cilju praćenja dinamike oralno-gastroične digestije, obzirom na njen značaj u fazama izlaska gastričnog bolusa u duodenum, postavljane su digestivne smeše za sirovi, bareni i pečeni kikiriki u različitim vremenskim intervalima (1, 5, 15, 30, 60, 90 i 120 minuta). Digestija pepsinom je rađena kao u odeljku 4.4 sa malim izmenama u pripremi kontrolnog uzorka sirovog kikirikija, kao i kikirikija za svaki termički tretman posebno. Kontrolni uzorci su bili oralni bolusi bez amilaze, sa dodatim 200 μ L 2 M natrijum karbonata kako bi se pH zabazio na 8.0. Tek nakon postizanja bazne sredine je dodato od 356 μ L rastvora pepsina, i kontrole su inkubirane 120 minuta. Proteini tečne faze oralno-gastroične digestije sirovog i termički tretiranog kikirikija, su bili potaloženi sa TCA/acetonom (odeljak 4.5), a onda analizirani na 14% PAA gelu pod redukujućim i neredukujućim uslovima po protokolu koji je predložio Laemmeli [129].

4.7.3 1D SDS PAGE analiza vode u kojoj se kikiriki kuvao

Sirovi kikiriki je kuvan u ključaloj vodi u zatvorenom sudu (100 °C, 20 minuta, u odnosu težine i zapremine 1:10) [32]. Nakon kuvanja voda je koncentrovana 10 puta, na dva načina taloženjem sa TCA/acetonom (opisano u odeljku 4.5) i uparivanjem na vakuum uparivaču (SpeedVac, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) u eppendorf tubama sa

niskim potencijalom vezivanja peptida i proteina. Potom je urađena 14% SDS-PAGE, u redukujućim uslovima, i gel obojen sa CBB R250.

4.8 Određivanje koncentracije proteina u ekstraktima i digestima kikirikija

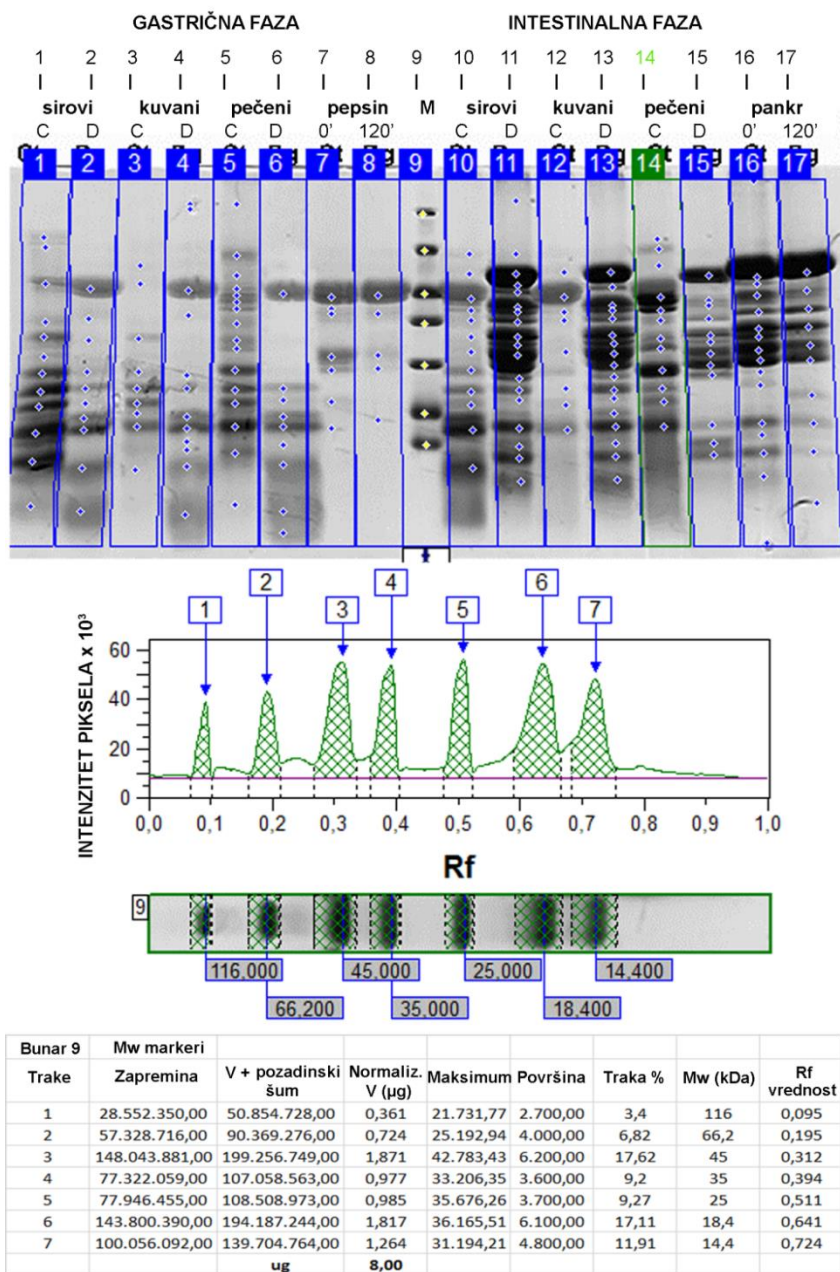
4.8.1 Određivanje koncentracije proteina bicinoninskom metodom

U slučaju neodmašćene tečne faze i n-heksanom odmašćene tečne faze, digestivna smeša je razblažena 20 puta sa fosfatom puferisanim rastvorom soli (PBS) i izmerena je koncentracija proteina BCA testom (Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen, Nemačka). Neodmašćena tečna faza je taložena sa TCA/acetonom, i nakon ispiranja acetonom dobijeni talozi su rastvoreni u zapremini PBS jednakoj 20-tostrukoj zapremini uzete tečne faze. Nakon toga, određena je takođe koncentracija proteina BCA metodom [132], uz primenu viših temperatura tokom inkubacije (60 °C) kako bi se favorizovao put formiranja kompleksa na peptidnoj vezi umesto bočnih aminokiselinskih ostataka [133].

4.8.2 Određivanje koncentracije proteina kikirikija denzitometrijom na ImageQuant TL 8.1 i procena efikasnosti digestije pepsinom

SDS-PAG elektroforetskog profila termički tretiranih uzoraka kikirikija, skenirani su laserskim biomolekulranim imidžerom (Typhoon FLA 7000 series, GE Healthcare, SAD) a rezultati su obrađeni na Image 1D Quant TL 8.1 softveru (GE Healthcare, SAD). Kako bi se kvantifikovao intenzitet CBB obojenih proteinskih traka, izabran je način pretvaranja piksela relativnom kalibracijom sa automatskom detekcijom širine trake, uz podešavanje ostalih parametara kao što sledi: nagib signalnog pika od 75-125, nivo šuma manji od 5, minimalna visina vrha pika $\geq 2\%$ od najvišeg vrha pika u uzorku, a za oduzimanje šuma pozadine, korišćen je pristup minimalnog profila. Thermo Scientific™ Pierce markeri (8 μ L, Thermo Fisher Scientific Inc.), koji se sastoje od mešavine sedam nativnih proteina (14.4 kDa do 116 kDa, čija je koncentracija 1 mg/mL) korišćeni su za normalizaciju volumena uzorka proteina u svakoj individualnoj traci (pik) u kolektivnom režimu uzimajući u obzir zbir svih sedam volumena markera čija je ukupna količina 8 μ g (zapremina = površina x intenzitet piksela). Slika 6 daje reprezentativan primer celokupnog procesa digitalizacije (pikselizacija) i kvantifikacije

traka u elektroforetskim profilima oralno-gastroične i oralno-gastrointestinalne digestije termički obrađenog kikirikija. Kubični model kalibracione krive izabran je kao najbolji model fitovanja molekulske masa korišćenih markera, sa dobijenim Rf vrednostima.



Slika 6 Primer denzitometrijske obrade gela pomoću ImageQuant TL v 8.1 (GE Healthcare, Čikago, SAD), koji je skeniran Typhoon FLA 7000 biomolekularnim imidžerom (GE Healthcare, Čikago, SAD). Na slici je pored gornjeg gela prikazana i kvantifikacija molekulske masa i pripadajući deo eksel tabele.

Denzitometrijski pristup je u većini slučajeva omogućio isključenje određenih traka iz kvantifikacije (kao što su proteini koji potiču od pepsina ili pankreatina). Efikasnost hidrolize pepsina je procenjena na osnovu denzitometrije pomoću Image 1D Quant TL 8.1 softvera (GE Healthcare, SAD). Količina proteina u trakama koje odgovaraju kontroli je poređen sa odgovarajućim digestovanim uzorcima. Procenat efikasnosti izražen je kao: $(\text{normalizovani volumen kontrolnog uzorka} - \text{normalizovani volumen u digestovanom uzorku}) \times 100 / \text{normalizovani volumen u kontrolnom uzorku}$.

4.8.3 Statističke analize

Statističke analize rađene su na rezultatima dobijenim određivanjem proteinske koncentracije BCA metodom i denzitometrijom, kako za oralno-gastrične, tako i za oralno-gastrointestinalne uzorke sirovog, kuvanog i pečenog kikirikija, kao i za njihove kontrole. Sve analize, uključujući i testove ispitivanja pripadnosti normalne distribucije, "two-way" ANOVA sa uparenim uzorcima, kao i post- testovi poput Dunnett-ovog i Sidak-ovog testa, su izvedene sa GraphPad Prisma 7.0 softverom (GraphPad, San Dijego, SAD).

4.9 Analize 1D SDS-PAGE profila ekstraktoma i digestoma sirovog kikirikija tandemskom masenom spektrometrijom visoke rezolucije (*nano-LC-MS/MS*)

4.9.1 Isecanje traka iz gela i priprema uzoraka iz gela za digestiju tripsinom i za nanošenje na *nano-LC-MS/MS*

Celokupni proteinsko-peptidni profili ekstraktoma i digestoma na 14% PAA gel traci (kontrolni uzorak-ekstraktom i uzorak nakon oralno-gastrične digestije sirovog kikirikija-digestom), je isečen na delove pomoću skalpela (dužine od 2 do 16 mm), i nakon toga isečeni delovi gela su bili digestovani tripsinom po Shevchenko-voj metodi [134]. Ukratko, radi uklanjanja zaostale boje iz gela, isečci gela su prvo ispirani u 25 mM amonijum-bikarbonatnom puferu (*engl.* ammonium bicarbonate buffer, ABC), a zatim u rastvoru 50% acetonitrila (ACN) u 25 mM ABC. Potom su isečci gela tretirani sa 10 mM ditiotreitolum (DTT) radi raskidanja disulfidnih veza, a potom su proteini alkilovani pomoću 55 mM jodacetamidom (IAA). Proteini u isečcima gela su

digestovani 18 h, na 37 °C primenom 10-20 µL 5 ng/µL tripsina (proteomics grade, Merck, Nemačka) po isečku.

Odnos tripsin:uzorak = 1:30 je održavan konstantnim uz pomoć određivanja količine proteina u isečku gela denzitometrijom. Posebno se vodilo računa da se promenom volumena radnog rastvora tripsina od 5 ng/mL održi pomenuti odnos u trakama gde kontrolni i digestovani sirovi kikirikiki imaju izrazito različite količine proteina. Količina tečnosti dodata prilikom pripreme za masenu spektrometriju bila je jednaka između odgovarajućih tj. uparenih traka gela iz kontrolnog i digestovanog uzorka sirovog kikirikija.

Peptidi, nastali dejstvom tripsina izlaze iz gela u rastvor. Pre analize na masenom spektrometru, peptidi su propuštani kroz zip tip kolonu, koja predstavlja standardnu proceduru prečišćavanja pre analize na masenom spektrometru. Kontaminanti se uklanjaju iz peptidnih uzoraka zip tip metodom na sledeći način. Nastavak koji sadrži C18 reverzno fazni (RP od engl. Reverse phase) materijal (Hypersep tip C18, 10-200 µL, 60109-209, Thermo Fisher Scientific Inc., Nemačka) se pričvrsti za pipetu koja odmerava do 200 µL. Uzorak prolazi kroz C18 kolonu uvlačeći se kroz nastavak, a potom se izbací (postupak se ponavlja između 3 - 5 puta), vodeći računa da ne uđe vazduh. Prvi korak je kvašenje C18 kolone sa 0.1% FA u 70% ACN, a onda se C18 kolona ekvilibriše 0.1% FA u vodi. U sledećem koraku u nastavak se uvlači peptidni uzorak, gde se peptidi vezuju za C18 kolonu (uzorak se uvlači i ispušta minimum 20 puta). Potom ide korak ispiranja ne-peptidnih komponenti vodom sa 0.1% FA (3-5 puta). Peptidi se eluiraju sa C18 kolone sa 0.1% FA u 70% ACN u tube specijalizovane za slabo vezivanje proteina (*engl.* low protein binding tubes) (Eppendorf, Nemačka). Uzorci se potom uparavaju vakum centrifugiranjem na sobnoj temperaturi u Eppendorf isparivaču (Hamburg, Nemačka), a potom rastvore u 0.1% FA. Ovako pripremljeni uzorci su spremni za analizu masenom spektrometrijom.

Dobijeni triptični, semitriptični i atriptični peptidi su analizirani visoko-rezolutivnom, nano-tečnom hromatografijom (LC)-tandemskom masenom spektrometrijom (MS/MS), po prethodno objavljenoj metodi [135, 136], rađenoj na LTQ Orbitrap XL masenom spektrometru i EASY- nLC ii sistemu (Thermo Fisher Scientific inc., Bremen, Nemačka).

4.9.2 Nano-LC-MS/MS i pretraga proteina na osnovu zadate databaze

Uzorci peptida su hromatografski razdvojeni na sistemu EASI-nLC II (Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen, Nemačka) na dve kolone: kolona C18-A1, 2 cm x 100 μ m, 5 μ m čestice, i 120 Å veličina pore (SC001, Thermo Fisher Scientific, Valtham, MA, SAD) i kolona PepMap C18, 15 cm x 75 μ m, 3 μ m čestice, i 100 Å veličine pore (ES800, Thermo Fisher Scientific, Valtham, MA, USA). Nakon razdvajanja uzorci (4–8 μ L) su analizirani pomoću LTQ Orbitrap XL hibridnog masenog spektrometra (Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen, Nemačka). MS podaci su dobijeni u MS² režimu. Prikupljanje podataka je kontrolisano softverom XCalibur 2.1 (Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen, Nemačka).

Identifikacija proteina sirovog kikirikija obavljena je u PEAKS Suite X (Bioinformatics Solutions Inc., Kanada). MS/MS spektri su obrađeni koristeći PEAKS algoritam za pretragu post-translacionih modifikacija (PTM). Korišćena je baza podataka za kikiriki (*Arachis hypogaea*), napravljena iz UniProtKB ručno proverenih i neproverenih sekvenci, preuzetih dana 01.10.2018 sa <http://www.uniprot.org/>. Takođe, u bazu podataka je ubačena i lista proteina sa kojima se obično susrećemo u proteomičkim istraživanjima kao vid kontaminacije proteinskog uzorka tj. Max Quant preuzet 01.03.2019 sa http://www.coxdocs.org/doku.php?id=maxquant:start_downloads.htm. Promenljive ili dinamičke modifikacije koje su uzete u obzir su: oksidacija metionina, deamidacija glutamina i asparagina, i hidrosilacija prolina, dok se karbamidometilacija cisteina posmatrala kao fiksna modifikacija. U algoritmu PEAKS PTM, PTM pretraga izvršena je koristeći dostupnu listu od 313 prirodno nastajućih post-translacionih modifikacija iz Unimod baze. Parametri peptidne pretrage uključili su tolerisanje do 2 mesta izostavljenog, tj. preskočenog sečenja tripsinom (triptični peptidi), uključujući i peptide sa nespecifično hidrolizovanim krajevima (semitriptični i atritični peptidi). Tolerancija mase je podešena na ± 10 ppm za roditeljski jon i ± 0.5 Da za fragmentisani jon. Proteinski filteri su podešeni tako da se uvrsti najmanje jedan unikatan peptid, gde je $-10 \log P$ vrednost podešena na ≥ 20 . Takođe, podešen je i AScore za pouzdanu PTM identifikaciju od najmanje 20. Za verovatnoću, tj score = $10 \log P$ poklapanja teorijskih peptidnih spektara sa eksperimentalnim (*engl.* Peptide-Spectrum Matches – PSM), je podešena takva najmanja vrednost da osigura verovatnoću manju od 0.5% da je u

pitanju netačno poklapanje spektara. *De novo* ALC (engl. Alignment Local Confidence), važan činilac u iznalaženju sekvence peptida bez oslonca ponuđene proteinske databaze (DeNovo algoritam PEAKS X platforme), je podešen tako da se dobije više od 80% pouzdanosti nalaza aminokiseline u DeNovo sekvenci.

4.10 Optimizacija izoelektričnog fokusiranja kod uzoraka bogatih lipidima u cilju eventualnog izbegavanja delipidacije

4.10.1 Priprema ekstrakata polena trave mačiji repak (*Phleum pratense*)

Pre izvođenja 2D elektroforeze na sirovom kikiriki ekstraktu, optimizovali su se uslovi za izvođenje 2D elektroforeze sa neodmašćenim ekstraktom polena trave, kao pozitivnom kontrolom. Čestice neodmašćenog polena trave mačijeg repka (*Phleum pratense* L.) su ekstrahovane uz snažno vorteksovanje u dejonizovanoj vodi (1g polena u 10 mL, 4 °C, preko noći). Polenska suspenzija (1 mL, 1/10 w/v) je centrifugirana na 14, 000 g, 20 minuta na 4°C i profiltrirana kroz polipropilenski filter sa porama od 0.45 µm. Koncentracija proteina je određena Bradford-ovom metodom [137]. Ukupna količina proteina je potvrđena sa 1D SDS PAGE na Image Quant TL version 8.1 softveru (GE Healthcare, USA), kao što je opisano u odeljku 4.8.2.

4.10.2 Optimizacija izoelektrofokusiranja na neodmašćenim ekstraktima polena trave mačijeg repka

Neodmašćeni proteinski ekstrakt polena mačijeg repka (45 µg) je izoelektrofokusiran na 7 cm IPG traci (GE Healthcare, Chicago, IL, SAD), koristeći sistem za izoelektrofokusiranje Ettan IPGphor 3 IEF (GE Healthcare, Chicago, IL, SAD) i metodu opisanu u Tabeli 3. Druga dimenzija je urađena na 12% SDS-PAGE koristeći MiniProtean sistem za elektroforezu (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD). 2D gelovi su obojeni sa koloidnom bojom Coomassie Brilliant Blue 250G [130], a potom skenirani sa laserskim skenerom Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). 2D gel tačke su kvantifikovane i uparene sa Image Master 2D Platinum v7.0 softverom (GE Healthcare, Chicago, IL, SAD).

Tabela 3 Optimizacija uslova izoelektrofokusiranja na neodmašćenim ekstraktima polena trave, koji su kasnije primenjeni na ekstrakte sirovog kikirikija.

Korak	Voltaža (V)	Vreme (h)
1. Aktivna rehidracija	10	12 : 00
2. Skok sa zadržskom napona	100	1 : 00
3. Skok sa zadržskom napona	300	1 : 00
3. Skok sa zadržskom napona	500	1 : 00
4. Gradijent	1000	0 : 45
5. Gradijent	5000	1 : 30
6. Skok sa zadržskom napona	5000	0 : 20
7. TOTAL	6061	17: 35

4.11 2D SDS-PAG elektroforeze kontrolno-standardnog ekstrakta sirovog kikirikija i ekstraktoma i digestoma kikirikija na osnovu INFOGEST protokola

Inicijalni eksperimenti izoelektrofokusanja i 2D SDS-PAGE su izvođeni na ekstraktu, kontrolnom uzorku i digestovanom uzorku sirovog kikirikija prema protokolu prethodno optimizovanom na neodmašćenom ekstraktu polena trave [138]. Osušeni TCA/acetone talozi su resuspendovani u rehidracionom puferu neophodnom za izoelektrofokusanje (8 M Urea, 2% CHAPS, 0.5% IPG buffer 3-10 NL, 50 mM ditiotreitola (DTT), i 0.002% bromofenol plavo). Proteinski uzorak (250 µg) je nanešen na traku od 13 cm, sa imobilizovanim pH gradijentnim gelom pH 3-10 NL (GE Healthcare, Upsala, Švedska), gde su proteini razdvojeni na prvoj dimenziji na Ettan IPGPhor 3 sistemu (GE Healthcare, Uppsala, Švedska) prateći uputstva proizvođača. Nakon izoelektrofokusanja, trake su prvo isprane od zašitnog mineralnog ulja u ekvilibracionom puferu (75 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6M Urea, 30% glycerol, 10% SDS, 1% brom fenol plavo). Nakon toga trake se redukuju sa DTT (65 mM) u ekvilibracionom puferu 15 minuta u mraku, a potom se alkiluju sa IAA (140 mM) takođe u ekvilibracionom puferu, 15 minuta u mraku.

Druga dimenzija je nastavljena na 14% PAA gelu. Nakon druge dimenzije gelovi su bojeni metodom koloidnog bojenja sa Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva) [130]. Svi 2D gelovi su skenirani na Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare), a proteinske tačke su kvantifikovane i uparene na Image Master 2D Platinum software v7.0 (GE Healthcare).

4.11.1 Priprema proteinskih tačaka sa 2D SDS-PAG elektroforeze kontrolnog i digestovanog sirovog kikirikija

Proteinske tačke od interesa sa 2D gelova su ručno isečene i digestovane u gelu, prema metodi koju je opisao Shevchenko i saradnici [139] i kao što je 4.10.1. Dobijeni peptidi su analizirani, po prethodno objavljenom metodi [135, 136] rađenoj na LTQ Orbitrap XL masenom spektrometru i EASY- nLC iL sistemu (Thermo Fisher Scientific inc., Bremen, Nemačka). Ukratko, 2 mikrolitra (koncentracije oko 50 µg/mL) uzorka je naneseno na kolonu (EasyColumn C18, 2 cm dužine, ID 100 µm, 5 µm veličina čestice) i razdvajanje je izvedeno na Easy spray PepMap C18 koloni (dužine 15 cm, ID 75 µm, veličina čestice 3 µm). Vrednosti parametara Nano-electro Spray jonizacije (NSI) su bili: voltaža spreja +2.0 kV, kapilarna voltaža 6 V, kapilarna temperatura 250 °C. Spektri visoke rezolucije na Orbitrapu sa 30 000 na 60 000 su snimljeni u pozitivnom modu u opsegu m/z 300-2000 U toku snimanja na visoko rezolutivnom masenom spektrometru, fragmentisano je pet najintenzivnijih monoizotopskih pikova u spektru pomoću CID (*engl.* collision-induced- kolizijom izazvana disocijacija) i detektovano u linearnoj jonskoj zamci.

4.11.2 Identifikacija standardnog ekstrakta, kontrolnih i digestovanih proteina sirovog kikirikija dobijenih sa 2D SDS-PAGe

Identifikacija proteina je urađena u PEAKS Studio 8.5 softveru (Bioinformatics Solutions inc., Waterloo, ON, Kanada). MS/MS spektri su obrađivani koristeći PEAKS DB algoritam naspram hibridne baze podataka koja se sastojala iz kikiriki (*Arachis hypogaea*) UniprotKB/Swiss-Prot baze podataka (baza podataka je napravljena 14/08/2017 na internet stranici <http://www.uniprot.org/>). Takođe, u bazu podataka je ubačena i cRAP baza podataka. cRAP baza podataka je skinuta 18/01/2017 sa internet stranice <http://www.thegpm.org/crap/>. Promenljive modifikacije koje su uzete u obzir su: oksidacija metionina, deamidacija glutamina i asparagina, i hidrosilacija prolina, dok se karbamidometilacija cisteina posmatrala kao fiksna modifikacija. Ostali parametri pretrage su isti kao u odeljku 4.9.2 i tamo su detaljno opisani.

4.12 Izolovanje malih peptida otpornih na proteolizu (MPOP) dobijenih nakon oralno-gastroične digestije i razdvajanje gel hromatografijom

Etanol (2.4 mL) je dodat na tečnu fazu dobijenu nakon oralno-gastroične digestije (800 μ L), i smeša je inkubirana na 4 °C, 20 h. Nakon centrifugiranja na 4 °C i 12 000 g, u periodu od 10 minuta, odvojen je talog i supernatant. Supernatant, koji je sadržao male peptide otporne na proteolizu, je odvojen i uparen na vakum uparivaču (SpeedVac, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) u ependorf tubama sa niskim potencijalom vezivanja peptida i proteina. Upareni peptidi rastvoreni su u 10 mM HCl (500 μ L) i razdvojeni na gel hromatografiji. Gel filtraciona kolona, Sephadex G25 column (0.8 \times 30 cm), je ekvilibrisana prethodno sa 10 mM HCL, a za kasnije razdvajanje je korišćen 10 mM HCl. Protok na sobnoj koloni je bio 5 mL/h. Frakcije od 500 μ L su sakupljane, a razdvajanje je praćeno na 214 nm, 280 nm, i 220 nm. Kako bi se minimizirao uticaj molekula malih masa koji nisu peptidi (npr. polifenoli) a apsorbuju na 214 nm, frakcije sa najvišim vrednostima absorbance na 214 nm i najmanjim vrednostima absorbance na 280 nm su spojene. Spojene frakcije su analizirane elektorforezom i imunoblotom sa antitelima specifičnim na Ara h 2, kako bi se potvrdilo odsustvo intaktnog Ara h 2 alergena. Spojene frakcije su podeljene na dva dela. Jedan deo je koncentrovan 4 puta na vakum uparivaču i korišćen za ImmunoCAP test. Drugi deo je uparen i podvrgnut nLC-MS/MS analizi, u potrazi za intaktnim peptidima.

4.12.1 Identifikacija MPOP putem masene spektrometrije intaktnih i trisinom digestovanih peptida u rastvoru i upareni sa imunoepitop bazom IEDB

Deo spojenih frakcija, koji je sadržao MPOP, je uparen i podvrgnut nLC-MS/MS analizi, u potrazi za intaktnim pepsinskim peptidima. Ovaj deo spojenih frakcija je podeljen na dva dela. Jedan deo je redukovan, pa alkilovan u rastvoru, a onda tripsinski digestovan na osnovu metode koju je opisao Johnson i saradnici [140], gde je vreme za redukciju produženo na 1.5 h, na temperaturi od 80 °C. Drugi deo je analiziran kao intaktan. Dobijeni peptidi, i intaktni i redukovani/alkilovani/digestovani su analizirani prema metodi koju je objavila Apostolović i saradnici. [135, 136], koristeći LTQ Orbitrap XL maseni spektrometar sa EASY-nano tečnom hromatografijom (nLC) sistem (Thermo Fisher Scientific inc., Bremen, Nemačka), sa promenom rezolucije na

Orbitrapu sa 30 000 na 60 000. Peptidi su identifikovani koristeći PEAKS Studio 8.5 (Bioinformatics Solutions inc., Kanada). MS/MS spektri su analizirani kroz PEAKS DB algoritam opisanim u odeljku 4.9.2.

Peptidi su pretraživani u IEDB bazi podataka specijalizovanoj za imunoepitope (IEDB-Immuno Epitope Database and Analysis, <http://www.iedb.org>), sa ciljem da se pronađu preklapanja sa već prethodno okarakterisanim epitopima. Prilikom pretrage IEDB baze podataka, korišćeni su sledeći parametri: linearna sekvenca za strukturu epitopa, BLAST kao opcija, i čovek kao domaćin.

4.13 IgE vezujuće sposobnosti digestovanog uzorka sirovog kikirikija

4.13.1 ELISA inhibicije

Sa inhibitornim ELISA testom ispitane su IgE vezujuće sposobnosti tečne faze iz digestivne smeše, kao i standardnog ekstrakta kikirikija. Odmašćeni standardni ekstrakt kikirikija je pripremljen prema metodi Radosavljević i saradnici [141]. Pola mikrotitar pločice (96 bunara, Greiner bio-one, Frickenhausen, Nemačka) je kuplovano sa 50 µL po bunaru odmašćenog kikiriki ekstrakta koncentracije 10 µg/mL, i inkubirano preko noći na 4 °C u puferu za kuplovanje (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃ pH 9.6). Neokupirana vezujuća mesta u bunarima su blokirana sa 1% BSA u TPBS (20 mM fosfatni pufer sa 0.9% NaCl pH 7.4, koji sadrži 0.05% Tween 20 (w/v)), 1 h na 37 °C. Pul seruma od 10 senzitivizovanih pacijenata (pacijenti #1-10, Tabela 4) je pripremljen prema EMEA (*engl.* European Medicines Agency- Evropska agencija za lekove) uputstvu za rad sa alergenim proizvodima (EMEA/CHMP/BWP/304831/2007). Uzorci (odmašćeni sirovi kikiriki ekstrakt, odmašćena tečna faza kontrolnog i digestovanog kikirikija) su prvo razblaženi dva puta sa 1% BSA u TPBS (u koncentracionom opsegu 10–0.04 µg/mL). Zatim je u tako razblažene uzorke dodat pul seruma u odnosu 1:1, v/v (finalno razblaženje mešavine seruma je 30 u blokirajućem puferu), i smeše uzorak-serum su inkubirane na 37 °C, 1h. Nakon nalivanja smeša uzorak-serum u bunarčice, inkubacija je nastavljena u mikrotitar pločici još sat vremena na 37 °C. Sekundarnim antitelom je urađena detekcija vezanog IgE antitela. U bunarić je dodato 50 µL mišijeg-anti-humanog IgE monoklonskog antitela (Abcam, Kembridž, Velika Britanija)

razblaženog 2 000 puta u 1% BSA TPBS. Za sekundarno antitelo je korišćeno peroksidazom iz rena. Bojenje je vršeno dodavanjem komercijalnog supstrata (*engl.* ready to use) za peroksidazu, 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidin (Biolegend, San Diego, CA, SAD), 100 µL po bunaru na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 minuta. Reakcija je bila zaustavljena dodavanjem 50 µL 0.5 M H₂SO₄ i potom je očitavana apsorbancu na 450 nm. IgE vezujući potencijal je izračunat metodom horizontalnog rasejavanja, upoređivanjem sa inhibicionom krivom prirodnog alergena uzete kao referentne vrednosti od 100%. Inhibitorne krive imale su korelaciju od ≥ 0.9705 . Inhibicija IgE vezivanja je sračunata na sledeći način $[(A_{450nm} \text{ neinhibiranog uzorka} - A_{450nm} \text{ inhibiranog uzorka})/A_{450nm} \text{ neinhibiranog uzorka}] \times 100$, i koncentracija koja inhibira 50% ovog signala je izračunata (IC₅₀). Ovi rezultati su analizirani koristeći GraphPad Prism6 (La Jolla, CA, SAD).

Tabela 4 IgE vrednosti pacijenata osetljivih na kikiriki određene ImmunoCAP metodom.

Pacijentov identifikacioni broj	Kikiriki ekstrakt	rAra h 1	rAra h 2	rAra h 3
		kU _A /L		
1	415	96	192	52
2	11	< 0.10	5	< 0.10
3	65	12.40	36	6.40
4	48	14	20	2.60
5	34	2.60	24	0.66
6	152	2.40	78	< 0.20
7	218	92	68	34
8	225	66	63	3.90
9	23	0.19	0.24	0.58

10	11	3.20	0.14	< 0.10
----	----	------	------	--------

Etička Komisija za upotrebu humanog biološkog materijala za istraživanje Univerziteta u Beogradu-Hemijskog fakulteta je, na osnovu priložene dokumentacije i etičkih dozvola za rad sa humanim materijalom Karolinska instituta u Štokholmu u Švedskoj, rešenjem broj 2-7/19, odobrila korišćenje humanog materijala uzorkovanog na Karolinska institutu u Štokholmu, Švedska za eksperimente u ovoj doktorskoj tezi.

4.13.2 ImmunoCAP inhibicija

Određivana je IgE vezujuća sposobnost frakcije u kojoj su se nalazili MPOP koristeći ImmunoCAP metodu inhibicije (ImmunoCAP sistem, Phadia/Thermo Fisher Scientific, Upsala, Švedska). Sedam nerazblaženih individualnih seruma (200 µL; pacijenata #1–7, Tabela 4) su prethodno inkubirani sa 200 µL rastvora peptida, pre merenja alergena specifičnih na IgE: kikiriki (f13), Ara h 1 (f422), Ara h 2 (f423) i Ara h 3 (f424). Količina peptida u 200 µL rastvora peptida poticala je od 3.3 mg samlevenog zrna kikirikija, tj. iz oko 800 µg proteina kikirikija ekstrahovanih iz tečne faze dobijene nakon oralno-gastrointestinalne digestije. Izmereno IgE vezivanje seruma koji nije inhibiran peptidima uzeto je kao 0% inhibicije, dok je, IgE vezivanje seruma koji je bio inhibiran odgovarajućim prirodnim alergenom uzeto kao 100%. Inhibicija IgE vezivanja je izražena kao procenat koristeći sledeću formulu: % IgE inhibicije = 100 - ((IgE vezivanje za čvrstu podlogu u prisustvu prirodnog alergena/IgE vezivanje za čvrstu podlogu u prisustvu MPOP) × 100).

4.13.3 2D imunoblot

Nakon taloženja proteina sa TCA, talog je resuspendovan u 2% SDS-a. Koncentracija proteina sirovog kikirikija određena je BCA metodom. Potom su uzorci razblaženi u rehidratacionom puferu (8 M urea, 2% CHAPS, 0.5% IPG pufer pH opsega 3-10 NL, 0.002% bromofenol plavo i 50 mM DTT), tako da je koncentracija SDS-a bila manja od 0.15%. Za razdvajanje u prvoj dimenziji pripremljeni uzorci (120 µg) su naneti na traku od 7 cm sa imobilizovanim pH gradijentnim gelom pH 3-10 NL (GE Healthcare,

Upsala, Švedska). Proteini su razdvojeni u prvoj dimenziji na Ettan IPGphor sistemu (GE Healthcare) prateći uputstva proizvođača.

Druga dimenzija je nastavljena na 14% PAA gelu. Nakon razdvajanja na drugoj dimenziji proteini su transferovani na nitroceluloznu membranu (Bio-Rad, Solna, Švedska). Efikasan prenos na membranu potvrđen je bojenjem rastvorom 0.5% Ponceau S boje tokom 15 minuta. Membrane su potom blokirane sa 2% BSA u PBS pH 7.4, koji sadrži 0.05% Tween 20 (TPBS) sat vremena na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja, membrana je inkubirana sa pulom seruma pacijenata alergičnih na kikiriki, koji su prethodno razblaženo u PBS-u pH 7,4 u odnosu 1:10. Inkubacija se odvijala preko noći na 4 °C, uz lagano mešanje. Pul seruma se sastojao od sedam pacijenata alergičnih na kikiriki (#4-10 Tabela 4). Nakon toga, membrana je inkubirana sa zečijim anti-humanim IgE antitelom (Miab, Uppsala, Švedska), razblaženim u PBS-u pH 7,4 u odnosu 1:2000 (sekundarno antitelo), tokom sat vremena na sobnoj temperaturi. Potom je membrana inkubirana sa anti-zečijim IgG antitelom (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, SAD) obeleženim sa alkalnom fosfatazom, razblaženim u PBS-u pH 7,4 u odnosu 1:2000 (tercijerno antitelo), tokom sat vremena na sobnoj temperaturi. Vizuelizacija vezivanja je rađena inkubiranjem membrane u rastvoru supstrata za alkalnu fosfatazu (1.5 mg 5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat i 3 mg nitro-plavi tetrazolium) u 10 mL 100 mM Tris puferu koji sadrži 150 mM NaCl i 5 mM MgCl₂, pH 9.6).

4.14 Spektroskopija cirkularnog dihiroizma (CD)

CD spektroskopija je rađena na kontrolnim i digestovanim uzorcima kikirikija nakon resolubilizacije proteina, staloženih sa TCA, u 2% SDS. Uzorci su razblaženi u 10 mM fosfatnom puferu (pH 7.4), kako bi se postigla koncentracija 1 mg/mL, pri čemu je koncentracija SDS-a u svim uzorcima bila manja od 0.2%. CD spektri su snimani na spektropolarimetru JASCO J-815 (JASCO, Tokio, Japan) u dalekoj ultra-ljubičastoj oblasti (190-260 nm), u kiveti sa dužinom svetlosnog puta od 0.1 mm. CD spektri su snimani u inkrementima od 0.1 nm brzinom od 100 nm/min, na 20 °C. Svi spektri su mereni sa četiri akumulacije, nakon čega je od spektra uzorka oduziman referentni spektar pufera (10 mM fosfatni pufer, pH 7.4). Grafici su predstavljeni u jedinicama srednje vrednosti eliptičnosti po aminokiselinskom ostatku (deg cm² dmol⁻¹residue⁻¹).

Sistem je kalibrisan rastvorom amonijum D-10-kamfor sulfonata koncentracije 0.6 g/L, na već poznatom elipticitetu od +190.4 mdeg na 290.5 nm. Rezultati su predstavljeni kao srednji molarni elipticitet aminokiselinskih ostataka proteina prema jednačini:

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

gde je θ izmereni elipcitet, n je broj aminokiselinskih ostataka u proteinu, C je molarna koncentracija proteina u uzorku, a d je dužina svetlosnog puta u kiveti.

5. Rezultati

Ova disertacija predstavlja obimnu studiju fiziološki oponašanog varenja (digestije) sirovih, kao i termički obrađenih zrna kikirikija, sa ciljem da se što bliže i relevantnije okarakterišu nastali proizvodi digestije. Studija je izvedena prema opšte prihvaćenom INFOGEST statičkom *in vitro* protokolu digestije hrane, koji imitira fiziološke uslove oralno-gastrointestinalnog varenja odraslog čoveka i primenljiv je za simulaciju digestije čvrste i tečne hrane [15]. Posebna pažnja je posvećena uticaju matriksa iz hrane na otpornost alergena ka digestiji, kako gastričnoj, tako i intestinalnoj, kako bi se iznedrili do sada najrelevantniji rezultati u oblasti digestomike proteina kikirikija, obzirom na ozbiljnost i učestalost alergijskih simptoma koje njegova konzumacija proizvodi.

U prvom delu istraživanja, objašnjava se kako termička obrada kikirikija utiče na ekstraktabilnost, tj. oslobađanje proteina iz celog zrna kikirikija, i njihovu oralno-gastričnu/oralno-gastrointestinalnu digestibilnost. Analizirajući efekte termičkog tretmana na efikasnost oslobađanja i digestije proteina kikirikija, omogućava se uvid u moguće situacije koje dovode do povećanja alergenosti kikirikija. Rezultati ove disertacije su pokazali da termička obrada kuvanjem i pečenjem utiče na oslobađanje proteina tokom procesa digestije. Posebno je ekstrakcija proteina velikih molekulskih masa (alergeni Ara h 1 i Ara h 3) otežana u gastričnoj fazi. U intestinalnoj fazi se javlja suprotan efekat, gde su se proteini sirovog kikirikija najmanje ekstrahovali, dok su se najviše ekstrahovali proteini iz pečenog kikirikija. Trendovi efikasnosti ekstrakcije proteina detektovani u termičkim tretmanima se poklapaju sa trendovima efikasnosti digestije proteina u obe faze, pri čemu je evidentno da termička obrada, a posebno pečenje otežava finalnu, intestinalnu digestiju alergena kikirikija.

U drugom delu istraživanja pažnja je bila usmerena na proteine sirovog kikirikija, kako bi se fragmenti otporni na gastričnu digestiju identifikovali. Nakon toga ovi fragmenti su strukturno okarakterisani, i potom je ispitana IgE reaktivnost peptida otpornih na proteolizu, kako velikih tako i malih molekulskih masa. Rezultati ove disertacije pokazuju da oralno-gastrična digestija celog zrna kikirikija stvara IgE reaktivne peptide velikih i malih molekulskih masa. Međutim, deo Ara h 2 i Ara h 6 zaostaje u intaktnoj

formi, dok su Ara h 1 i bazna subjedinicica Ara h 3 bili samo delimično proteolizovani. Mnogi MPOP iz Ara h 1, Ara h 2 i Ara h 3 su se sa svojom sekvencom preklapili sa sekvencama već poznatih linearnih IgE epitopa alergena kikirikija, pri čemu su se MPOP iz Ara h 2 pokazali kao najpotentiji nosioci IgE vezujućeg kapaciteta.

5.1 Procena uticaja termičke obrade na oslobađanje proteina kikirikija i njihove digestibilnosti tokom *in vitro* oralno-gastrointestinalne i oralno-gastrointestinalne digestije

Mlevena zrna sirovog, kuvanog i pečenog kikirikija su podvrgnuta oralno-gastrointestinalnoj i oralno-gastrointestinalnoj *in vitro* digestiji. Nakon uklanjenja čvrstog nedigestovanog ostatka, u neodmašćenju rastvornoj fazi je određivana koncentracija proteina BCA esejem, kao i denzitometrijski.

Naši podaci merenja koncentracije proteina BCA esejem pokazuju da se kod termički obrađenog kikirikija smanjilo oslobađanje proteina tokom oralno-gastrointestinalne digestije (Slika 7A). Statistička analiza je pokazala da je proteinska koncentracija digestovanih uzoraka kuvanog i pečenog kikirikija značajno smanjena u odnosu na sirovi kikiriki (Slika 7A), tj. iznosila je 16.0 mg/mL za sirovi, 9.0 mg/mL za kuvani i 6.0 mg/mL za pečeni kikiriki.

Isti trend oslobađanja proteina proteina tokom oralno-gastrointestinalne digestije dobijen i kod kontrolnih uzoraka (inkubiranih u oralno-gastrointestinalnoj tečnosti bez pepsina), ali sa značajno većim vrednostima: od 21.0 mg/mL za sirovi i po 13.0 mg/mL za kuvani i pečeni kikiriki, koje su bliske teorijski izračunatoj koncentraciji proteina koji se ekstrahuju na pH 3.0 [142].

Rezultati dvostranog ANOVA testa, pored očekivanih signifikantnih razlika kako između digesta i kontrola, tako i između različitih termičkih tretmana kikirikija, pokazuje i značajan stepen interakcije ova dva procesa, što znači da termička obrada kikirikija utiče ne samo na oslobađanje proteina iz čvrstog materijala zrna kikirikija, već i na njihovu digestiju pepsinom. O prirodi zavisnosti ovih kompleksnih pojava potrebno je još ispitivanja kako bi se sa sigurnošću mogao utvrditi smer i intenzitet njihove interakcije.

Nakon inkubiranja kikirikija u simuliranoj intestinalnoj tečnosti bez pepsina (kontrolni uzorci), uočen je suprotni efekat, gde dolazi do statistički značajnog porasta oslobađanja, tj. ekstraktabilnosti proteina barenog (14%) i pečenog kikirikija (37%) u odnosu na sirovi (BCA esej, Slika 7B). Sličan trend rasta koncentracije proteina, uočen je i u uzorcima digesta intestinalne faze, ako se posmatra kroz niz termičkih tretmana, međutim sa uočljivo nižim apsolutnim vrednostima u odnosu na kontrolne uzorke (BCA esej, Slika 7B). Ovaj fenomen nižih vrednosti koncentracija proteina kod obe faze digesta u odnosu na njihove kontrole posledica je proteolize proteina dejstvom pepsina, sa konsekvantnim smanjenjem peptidnih veza koje se detektuju BCA esejem (BCA esej, Slike 7A i 7B).

Međutim, mnogo je interesantnije to što procentualni pad ovih vrednosti intestinalnih digesta nije ravnomeran, kao što je to slučaj kod parova digest-kontrola u oralno-gastrointestinalnoj fazi. Sveukupna efikasnost proteolize u obe faze digestije je bila 49%, 18%, i 16% za sirovi, kuvani i pečeni kikiriki, respektivno (BCA esej, Slike 7A, 7B, Prilog Tabela 8.1). To nam dalje govori, da je efikasnost celokupnog procesa oralno-gastrointestinalne digestije, usled termičkih tretmana ipak smanjena u odnosu na sirovi kikiriki, bez obzira na njihove apsolutne povišene vrednosti, obzirom na način kako u ovim slučajevima iskazujemo, tj posmatramo efikasnost digestije. Naime u sirovom kontrolnom uzorku koncentracija je iznosila 17.3 mg/mL, a u digestovanom 8.8 mg/mL, što znači da je od ukupne količine oslobođenih proteina iz sirovog zrna kikirikija najmanje oko 50% podleglo hidrolizi enzimima. Stoga, bez obzira na to što termički tretmani dovode do većeg nivoa oslobađanja proteina iz mlevenog zrna u simuliranu digestivnu tečnost, čime oni postaju lako dostupni enzimima, dolazi do njihove manje proteolize, tj. usled termičkih tretmana postaju rezistentniji na proteolizu. Čak i ako preračunamo razliku koncentracija tj. „gubitak“ proteina izazvan digestijom, vidimo da su te apsolutne vrednosti razlike među koncentracijama kod kuvanog (3.5 mg/mL) ili pečenog (3.7 mg/mL) kikirikija, umnogome manje nego kod sirovog kikirikija (8.5 mg/mL), (Slika 7 i Tabela 8.1).

Iako je BCA esej pouzdaniji izbor za određivanje koncentracije proteina u neodmašćenim uzorcima u odnosu na denzitometriju, zbog velikog viška lipida koje doprinose fonu signala, u ovom delu je urađena i procena koncentracije proteina

denzitometrijskim putem u uzorcima oralno-gastroične digestije kikirikija (denzitometrija, Slika 7A). Na Slici 8 je prikazana SDS PAGE neodmašćenih tečnih faza nakon oralno-gastrointestinalne digestije zrna kikirikija, a na osnovu SDS PAGE pod redukujućim uslovima je procenjivana koncentracija proteina denzitometrijom. Na Slici 7A opaža se trend koji je sličan rezultatima u BCA eseju, s tom razlikom da je koncentracija kako oslobođenih, tako i digestovanih uzoraka u pečenom kikirikiju znatno viša, do nivoa sirovog kikirikija. Ovo može biti posledica nejednake distribucije lipida među 3 uzorka koja su rađena, u smislu da je pri odvajanju tečne faze u pečenom kikirikiju zahvaćen deo masnog čepa ili pak mali deo nerastvorne frakcije. U svakom slučaju, ovde je prioritet u smislu relevantnosti dat rezultatima BCA eseja, a u narednom poglavlju sa odmašćenim digestima kikirikija, biće razmotrene dobre i loše strane obe metode.

5.2 Uticaj izbora metode odmašćivanja digesticione smeše na koncentraciju proteina oslobođenih nakon *in vitro* oralno-gastroične i oralno-gastrointestinalne digestije kikirikija

Metodološki preduslov za analizu digestibilnosti proteina iz hrane čiji je matriks veoma bogat lipidima, uključuje i procedure odmašćivanja. Stoga upoređena su dva različita načina odmašćivanja proteina nakon digestije celog zrna kikirikija, u smislu njihovog uticaja na koncentraciju proteina u rastvornoj fazi: uklanjanje lipida organskim rastvaračem n-heksanom i uklanjanje lipida njihovim odvajanjem nakon taloženja proteina pomoću TCA/acetona. Pomenute metode odmašćivanja su primenjene na uzorcima sirovog, kuvang i pečenog kikirikija nakon njihove oralno-gastroične i oralno-gastrointestinalne digestije, a rezultati su upoređeni sa rezultatima dobijenim na neodmašćenim uzorcima iz Poglavlja 5.1.

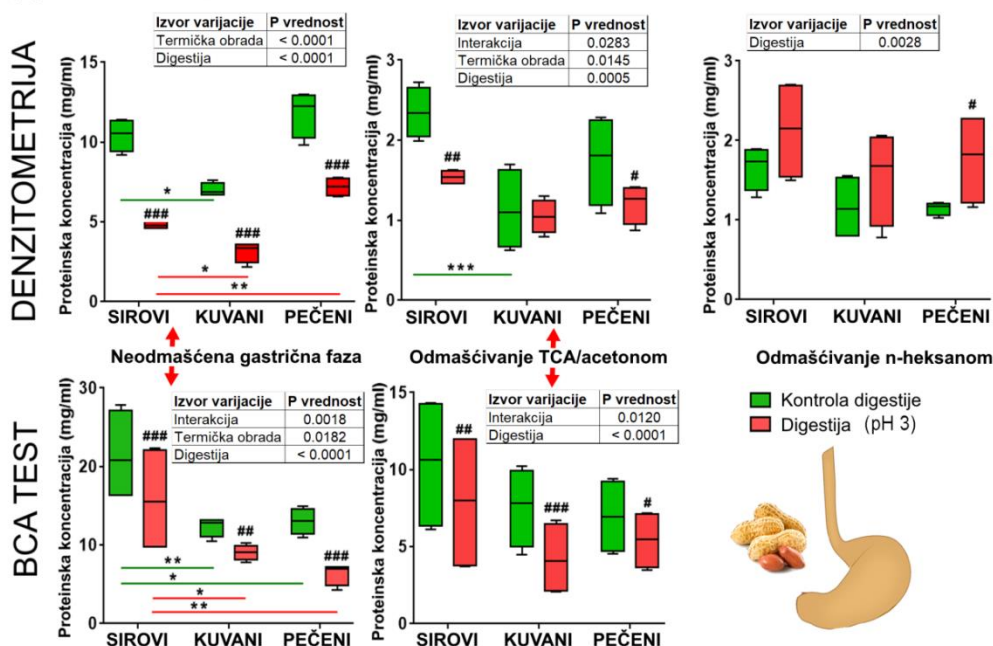
Nakon odmašćivanja taloženjem proteina sa TCA/acetonom dobijeni su slični rezultati kao sa neodmašćenim uzorcima, osim što je nakon intestinalne faze u kuvanom kikirikiju (BCA esej i denzitometrija) i pečenom kikirikiju (denzitometrija) detektovano više proteina u digestima nego u kontrolnim uzorcima (Slika 7A i 7B). Međutim, nakon odmašćivanja n-heksanom može se primetiti suprotan fenomen, tj. da je koncentracija

proteina u digestima veća od one u kontrolnim uzorcima nakon oralno-gastrointestinalne faze (Slika 7A), odnosno da nema razlike nakon intestinalne faze (Slika 7B).

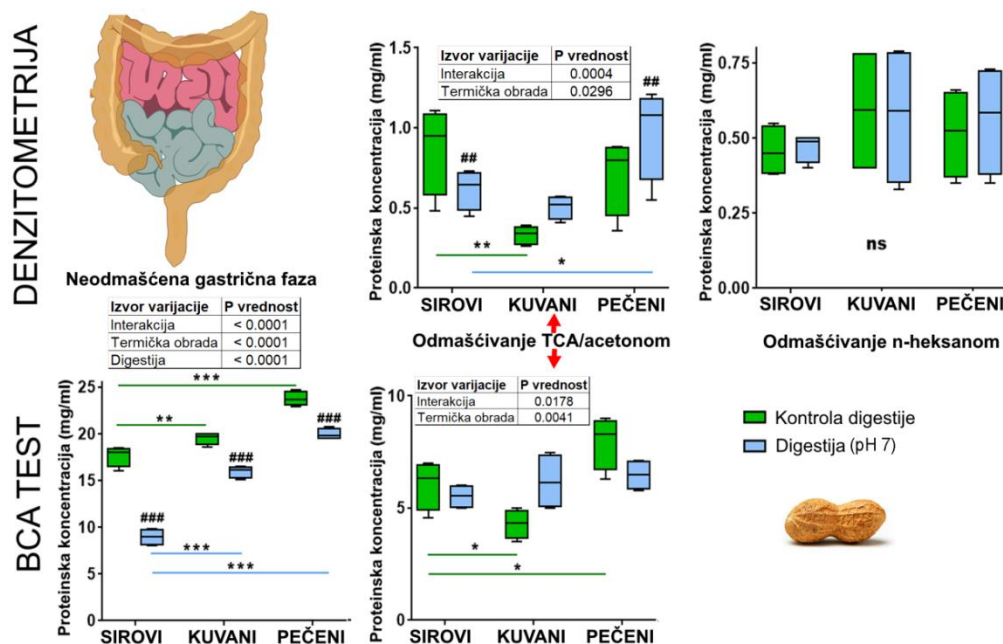
Poređenjem dobijenih koncentracija proteina u neodmašćenim i odmašćenim uzorcima, može se uočiti da odmašćivanje rezultira u znatnom gubitku proteina, i da je taj gubitak veći nakon odmašćivanja organskim rastvaračem. Gubici proteina pri odmašćivanju TCA/acetonom mogu se objasniti činjenicom da primenjena 20% TCA u acetonu zapravo ne može kvantitativno da staloži sve proteine, već samo proteine i peptidne fragmente većih molekularnih masa, ostavljajući u rastvoru proteine manjih masa i kraće fragmente.

Nakon oralno-gastrointestinalne faze efekat različitih tretmana kikirikija ima isti trend kod odmašćenih uzoraka i onih koji su odmašćeni sa TCA/acetonom. Ovo ukazuje na to da je taloženje proteina sa TCA/acetonom iz kisele gastrointestinalne faze iako nije potpuno, rezultuje u koncentracijama proteina analogno neodmašćenim uzorcima, i tako ipak odražava sliku efikasnosti oslobađanja ukupnih proteina u zavisnosti od tretmana kikirikija.

A Gastrična faza



B Gastrointestinalna faza



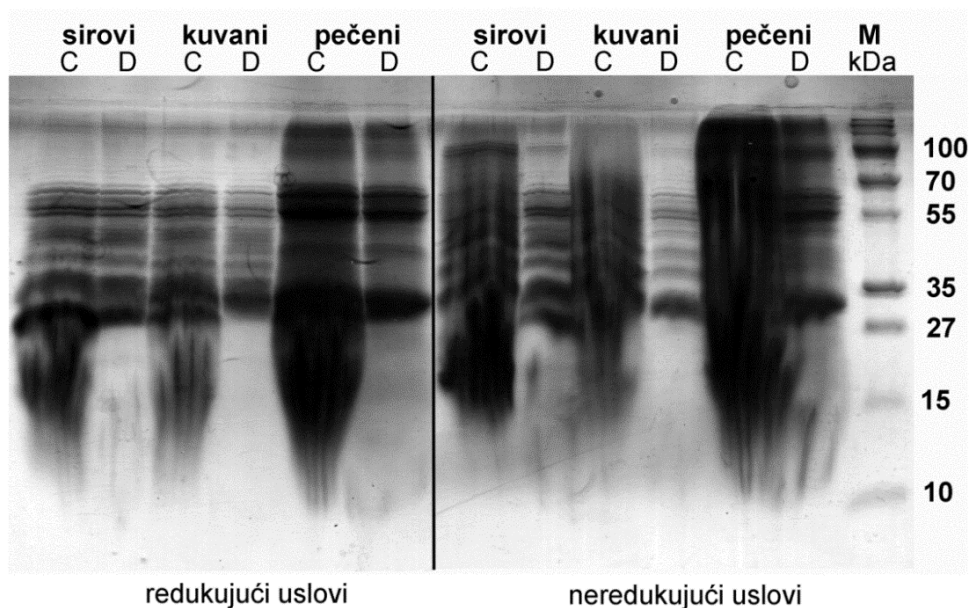
Slika 7. Koncentracija proteina u tečnoj fazi odvojenoj nakon, *in vitro* oralno-gastrične (A) i oralno-gastrointestinalne digestije (B) sirovog, kuvanog i pečenog kikirikija. Koncentracija proteina je određivana BCA esejem i denzitometrijski. Koncentracija proteina je određivana u neodmašćenoj tečnoj fazi, kao i u tečnoj fazi nakon odmašćivanja n-heksanom ili TCA/acetonском precipitacijom protina. Za statističku

obradu je korišćena dvosmerna ANOVA primenjena na najmanje dve nezavisno izvedene digestije (nakon tretmana odmaščivanja, ukoliko se radilo odmaščivanje). U BCA test i denzitometrijsku metodu (izvođena na ImageQuant TL), su uključeni i tehnički duplikati. Višestruko upoređivanje je urađeno, a za statističku obradu je korišćena dvosmerna ANOVA sa Sidak-ovim i Dunnett-ovim post-testom, sa idejom da se testiraju razlike u digestiji za svaki termički tretman zasebno, a onda međusobno; ns-razlike smatrane statistički neznačajne pri vrednosti $p > 0.05$; #, ## i ### - razlike smatrane statistički značajnim (ukoliko su poređeni digestovani sa kontrolnim uzorkom) pri vrednosti $p < 0.05$, $p < 0.005$ i $p < 0.0001$; *, **, i ***- razlike smatrane statistički značajnim (ukoliko su poređeni kuvani/pečeni sa sirovim uzorkom) pri vrednosti $p < 0.05$, $p < 0.005$ i $p < 0.0001$. Preuzeto i modifikovano iz Prodić i saradnici [143].

U svakom slučaju, evidentno je da su gubici proteina nakon odmaščivanja bili veliki. Nakon izračunavanja procenata gubitka proteina koji se dešava pri primeni protokola za delipidaciju (normalizacija prema neodmašćenim uzorcima (Slika 8), upoređena je efikasnost zadržavanja proteina nakon TCA/acetona i n-heksan procedura odmaščivanja denzitometrijskom metodom (Slike 7-10, Prilog Tabela 8.1).

U oralno-gastročnim kontrolama sirovog, kuvanog i pečenog kikirikija, nakon TCA/acetona taloženja proteina, koncentracija proteina je smanjena za 76%, 76% i 85%, respektivno. U slučaju intestinalnih uzoraka sirovog, kuvanog i pečenog kikirikija nakon TCA/acetona taloženja, gubitak proteina je iznosio 68%, 66%, i 81%, tim redom.

Isti princip kalkulacije je primenjen i na tretman izveden sa n-heksanom, i u ovom slučaju situacija je bila malo nepovoljnija u odnosu na TCA/acetona metodu; u oralno-gastročnim kontrolama sirovog, kuvanog i pečenog kikirikija, gubitak proteina je iznosio 84%, 83%, i 90%, respektivno. Gubitak proteina u uzorcima digestovanog sirovog, kuvanog i pečenog kikirikija, je iznosio 55%, 50%, i 75% od ukupne količine proteina, respektivno. Veći gubici proteina nakon delipidacije n-heksanom, kao i neanalogno ponašanje neodmašćenih i n-heksanom odmašćenih uzoraka kikirikija, opredelili su nas za taloženje proteina TCA/acetonom, kao metodom za odmaščivanje u budućim eksperimentima.



Slika 8 SDS-PAGE proteinski profil neodmašćene rastvorne faze sirovog, kuvanog pečenog kikirikija nakon simulirane gastrične digestije. SDS PAGE je izvođen u redukujućim i neredukujućim uslovima na 14% gelu. C- kontrola,; D – digest,. M - molekularni markeri. Preuzeto i modifikovano iz Prodić i saradnici [143].

5.3 Uticaj izbora metode odmašćivanja digesticione smeše na elektroforetske profile nakon *in vitro* oralno-gastrične i oralno-gastrointestinalne digestije sirovog, barenog i pečenog

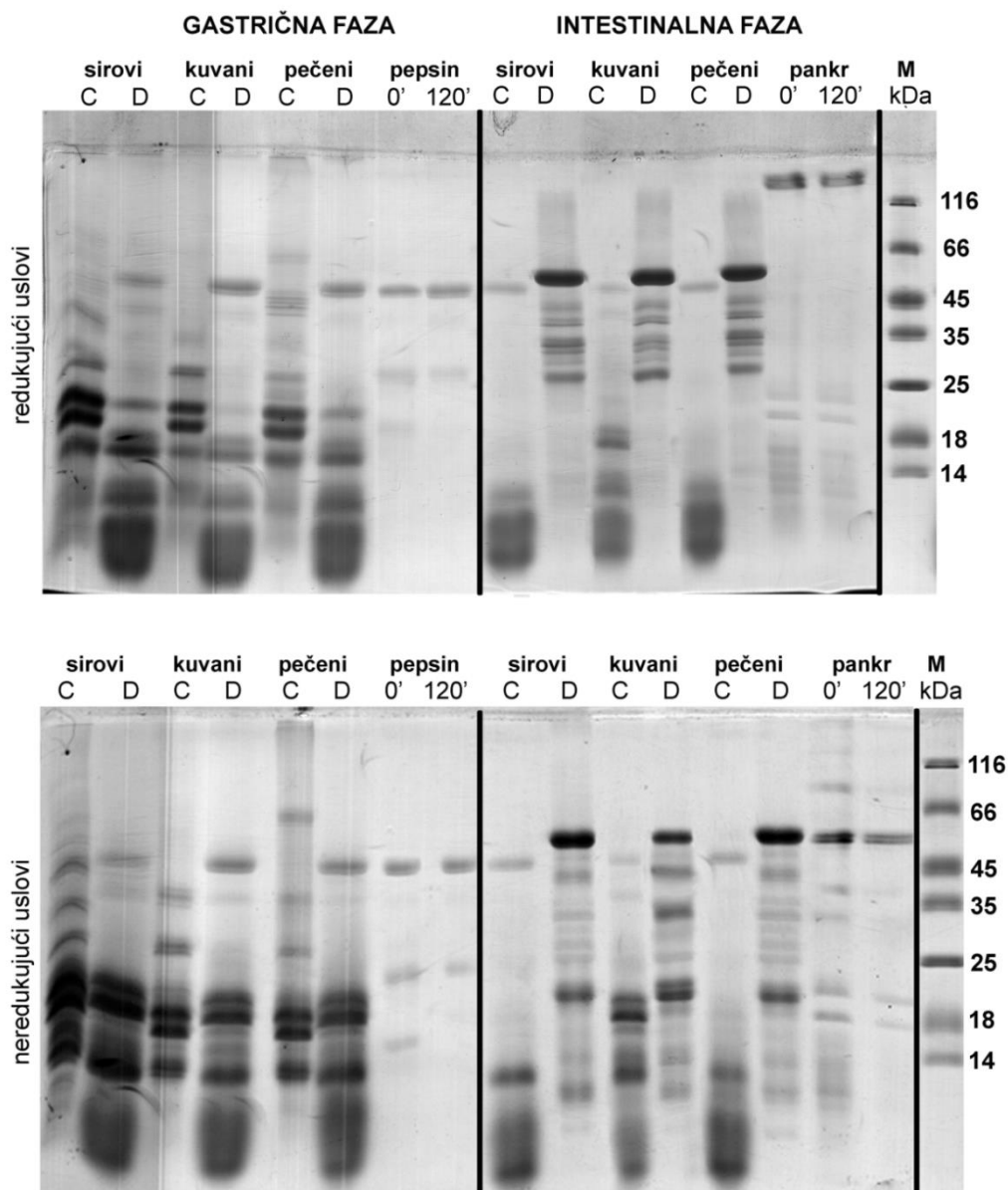
U daljem radu upoređena su dva različita načina odmašćivanja, proteina nakon digestije celog zrna kikirikija, n-heksanom i TCA/acetonom, takođe i sa aspekta njihovog uticaja na proteinske profile u rastvornoj fazi digestione smeše. Pomenute metode odmašćivanja su primenjene na uzorcima sirovog, kuvanog i pečenog kikirikija nakon njihove oralno-gastrične i oralno-gastrointestinalne digestije, proteinski profili su upoređeni sa profilima dobijenim na neodmašćenim uzorcima.

Slike 9 i 10 pokazuju proteinske profile kontrolnog i digestovanog uzorka termički tretiranog kikirikija, u redukujućim i neredukujućim uslovima nakon odmašćivanja n-heksanom i TCA/acetonom. Generalno posmatrano, odmašćivanje TCA/acetonom i n-heksanom omogućava bolji uvid u SDS PAGE profile uzoraka (Slike 9 i 10), u poređenju sa profilima dobijenim od neodmašćenih uzoraka (Slika 8). U svim trakama

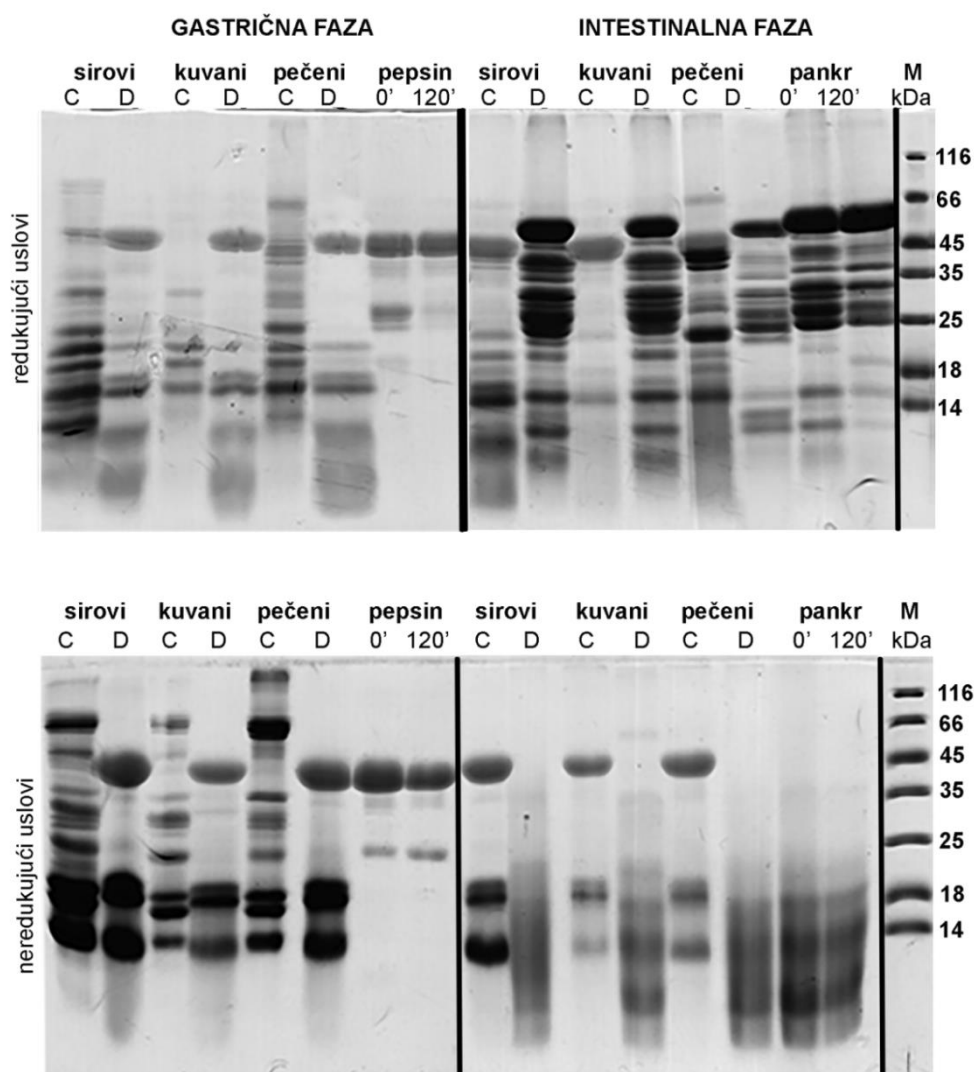
odmašćenih uzoraka (Slika 9 i 10) nema razmaza koji potiče od lipida, a koje se vide u neodmašćenim uzorcima (Slika 8). Profili omogućavaju i znatno bolju uočljivost proteina malih molekulskih masa, kakvi su Ara h 2 i Ara h 6 koji su prisutni u obliku tripleta između 15-18 kDa.

Studiju koju je izvodila Wacyzk i kolege [144], koja je bazirana na odmašćivanju sirovog i termički tretiranog kikirikija pre same ekstrakcije proteina, ukazuje da odmašćivanje utiče na naknadnu ekstrakciju proteina. Studija je pokazala da odmašćivanje sa n-heksanom omogućava veći prinos Ara h 1 i Ara h 2 u kikiriki ekstraktu. Međutim, u ovoj disertaciji, uočen je veći prinos Ara h 1 (Slika 9 i 10) kada je odmašćivanje rađeno sa TCA/acetonom.

Dodatni razlog zašto se u ovoj tezi favorizuje taloženje proteina sa TCA/acetonom, kao povoljniji način odmašćivanja, je taj što je jedna od ideja ove teze da se podrobno istraže veliki peptidni fragmenti dobijeni nakon digestije (> 10 kDa). TCA/acetom taloženje nije pogodno za istraživanje malih peptida otpornih na proteolizu, jer primenjena TCA/acetom smeša (sa finalnom koncentracijom TCA od 10%) ne može da staloži male peptide, a dodatno u toku ispiranja taloga nakon taloženja može doći do njihovih gubitka, tako da oni zahtevaju drugačiji pristup [145]. Generalno, nastavak istraživanja u ovoj doktorskoj studiji je nastavljen sa taloženjem TCA/acetonom jer je količina velikih peptidnih fragmenata (> 10 kDa) nakon digestije bila veća nego u slučaju sa n-heksanom.



Slika 9 SDS-PAGE proteinski profil n-heksanom odmašćene rastvorne faze digesta sirovog, kuvanog i pečenog kikirikija, dobijene nakon simulirane oralno-gastroične i oralno-gastrointestinalne digestije. SDS PAGE je izvođen u redukujućim i neredujućim uslovima na 14% gelu. C- kontrola, 120 minut; D – digest, 120 minut. pepsin – kontrola koja sadrži samo pepsin na 0 i 120 minutu; pankr – kontrole koje sadrže samo pankreatin na 0 i 120 minutu; M - molekularni markeri. Preuzeto i modificovano iz Prodić i saradnici [143].

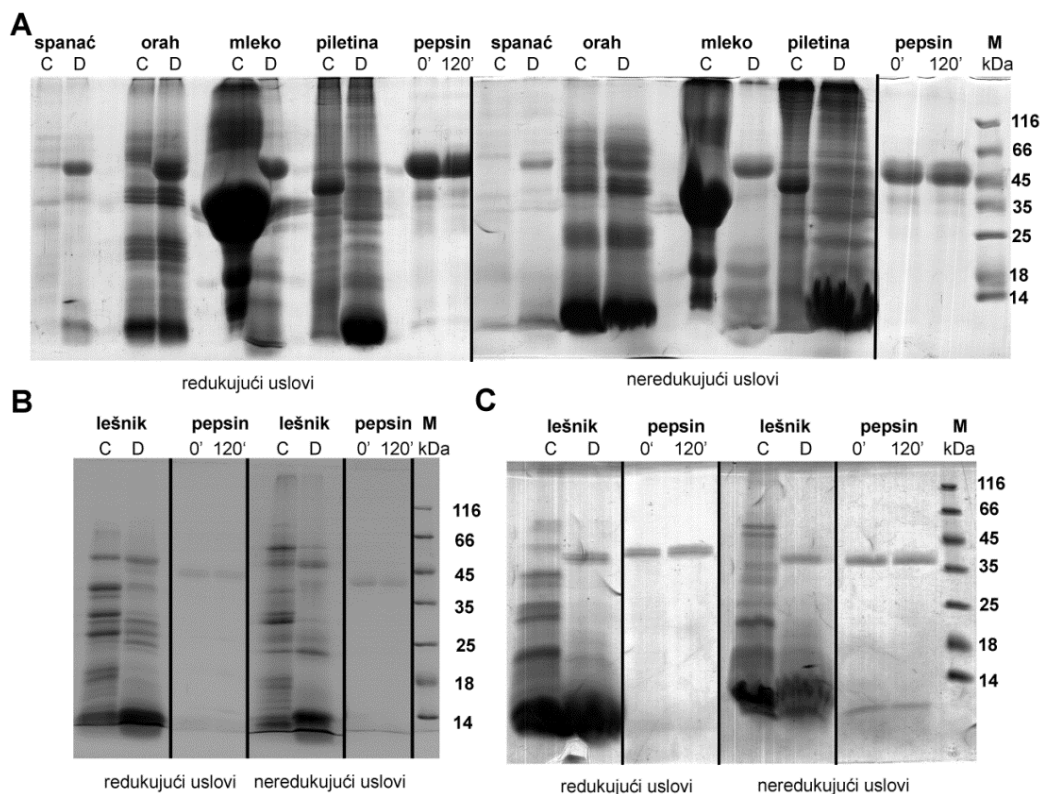


Slika 10 SDS-PAGE proteinski profil TCA/acetonom odmašćene rastvorne faze digesta sirovog, kuvanog pečenog kikirikija, dobijene nakon simulirane oralno-gastroične i oralno-gastrointestinalne digestije. SDS PAGE je izvođen u redukujućim i neredujućim uslovima na 14% gelu. C- kontrola, 120 minut; D – digest, 120 minut; pepsin – kontrola koja sadrži samo pepsin na 0 i 120 minutu; pankr – kontrole koje sadrže samo pankreatin na 0 i 120 minutu; M - molekularni markeri. Preuzeto i modificovano iz Prodić i saradnici [143].

5.4 Uticaj matriksa hrane na simuliranu *in vitro* oralno-gastroičnu digestiju proteina

U cilju ispitivanja uticaja različitih matriksa hrane na oralno-gastroičnu *in vitro* digestiju proteina, praćena je digestibilnost nekoliko namirnica, kako svežih, tako i preraćenih, sa razlićitim sadržajem lipida. Digestija je raćena korišćenjem statičkog INFOGEST protokola *in vitro* oralno-gastroične digestije, pri ćemu su kao namirnice korišćeni svež spanać, pasterizovano mleko, sirovi orah, kuvano pileće belo meso i sirovi lešnik. Nakon digestije, uzorci su odmašćeni sa TCA/acetom metodom, u istom maniru kao i sirovi i termički obraćeni kikiriki (Odeljak 4.5). Pretpostavljamo da se se i ovde tokom odmašćivnja izgubila većina malih peptida, kao što je već opisano na primeru kikirikija. Prikaz sposobnosti razlićutih matriksa hrane da zaštititi proteine od pepsinske hidrolize ilustrovan je na Slici 11 A. Nakon gastroične digestije pasterizovanog mleka i dalje je zaostala izvesna kolićina nedigestovanih proteina, i to većinom proteina surutke, dok je velika većina kazeina podlegla dejstvu pepsina. Proteini sirovog oraha manji od 50 kDa gotovo da nisu podlegli digestiji, dok su proteini većih masa slabo proteolizovani. Za razliku od mleka i oraha, proteini pilećeg belog mesa i spanaća su proteolizovani u većoj meri, mada je i u tim uzorcima zaostala znatna kolićina nedigestovanih proteina. Veći stepen hidrolize belog mesa i spanaća se najbolje ogleda u generisanju fragmenata molekulskih masa manjih od 10 kDa, a na konto smanjenja proteinskih traka većih masa. Ove razlike u digestibilnosti se mogu u najvećoj meri pripisati zaštitnoj ulozi lipida tokom digestije, kojima su bogati mleko i orah za razliku od spanaća i belog mesa. Naime, u uzorku mleka, mada je sadržaj lipida svega 3.2%, tokom digestije svi lipidi su bili prisutni u tećnoj fazi. Orak pak, sadrži oko 65% lipida, i mada nisu svi lipidi osloboćeni iz ćvrste faze tokom digestije, ta kolićina je bila dovoljna da zaštititi većinu proteina od proteolize. Premda belo meso sadrži oko 4% lipida, tokom digestije je osloboćena samo mala kolićina lipida iz ćvrste faze, oćigledno nedovoljna da zaštititi protein od digestije. Mećutim, treba napomenuti da je ovo samo grub prikaz uticaja razlićutih matriksa na digestibilnost proteina, imajući u vidu da proteini iz razlićutih izvora imaju inherentno razlićite digestibilnosti, tj. kao prećišćeni proteini. Samim tim, za temeljno ispitivanje uticaja razlićutih matriksa u budućim studijama neophodno je prvo ispitati digestibilnost svakog od proteina testiranih namirnica u prećišćenoj formi, i onda je uporediti sa digestibilnoću proteina u okviru matriksa hrane. Jedino ovim

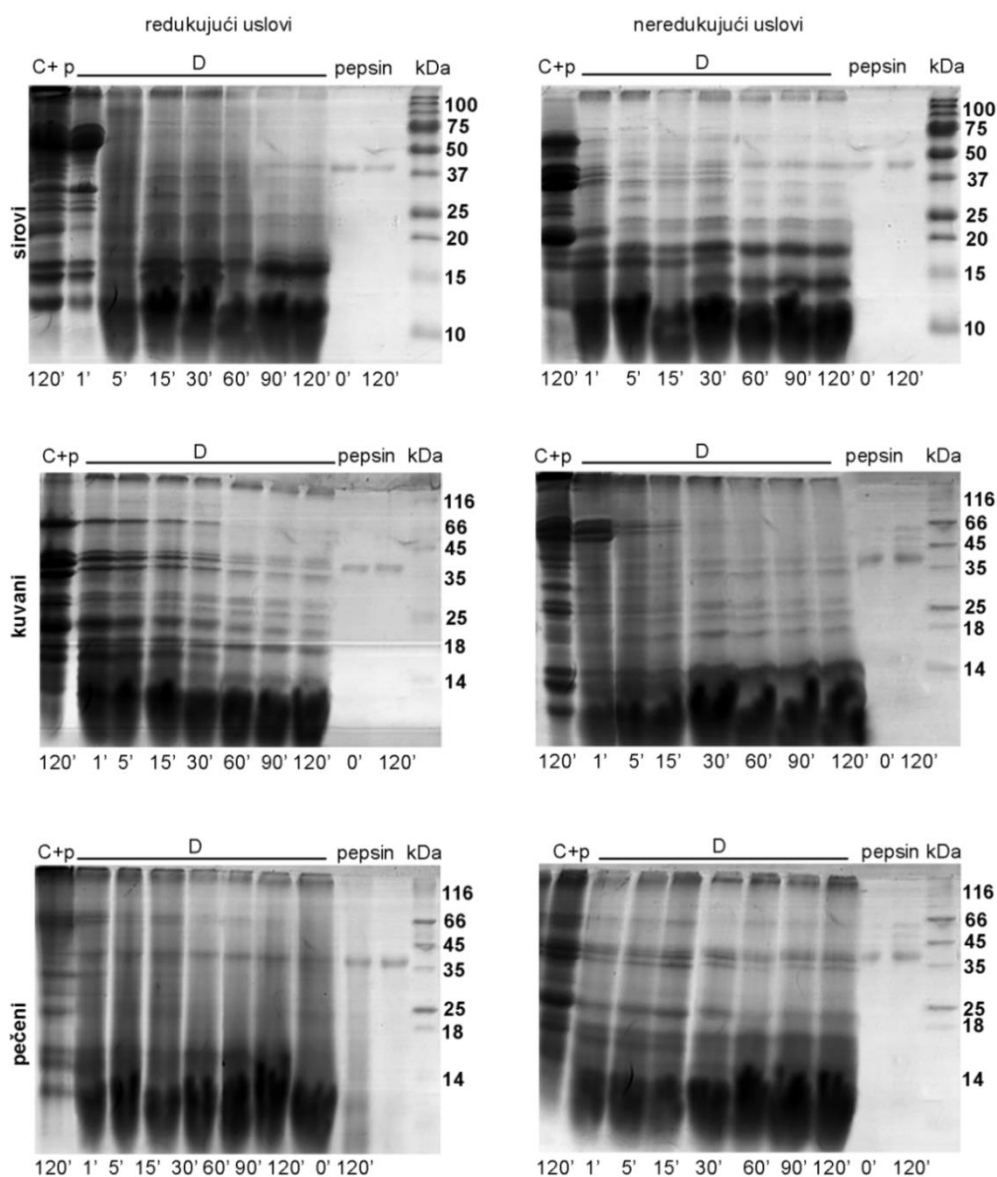
pristupom se može sistematski utvrditi u kojoj meri proteini neke namirnice slabo podležu digestiji usled efekta matriksa, a u kojoj meri usled rezistencije samih proteina na proteolizu. Na ovo ukazuje i primer *in vitro* oralno-gastroične digestije lešnika (Slika 11 B i C). Iako je lešnik bogat lipidima u nivou oraha, može se uočiti veći nivo digestibilnosti proteina lešnika, verovatno usled njihove bolje inherentne digestibilnosti nevezano za efekat matriksa.



Slika 11 14% SDS-PAGE proteinskih profila rastvorne faze digesta različitih namirnica nakon *in vitro* oralno-gastroične digestije (sa odgovarajućim kontrolama) A. spanaća oraha, mleka i piletine, dobijenog nakon odmašćivanja rastvorne faze TCA/acetonskim taloženjem proteina. B. Lešnika dobijenog nakon odmašćivanja rastvorne faze TCA/acetonskim taloženjem proteina; C. neodmašćenog lešnika. SDS PAGE je izvođen u redukujućim i neredukujućim uslovima na 14% gelu. C- kontrola, 120 minut; D – digest, 120 minut; pepsin – kontrola koja sadrži samo pepsin na 0 i 120 minutu; M - molekularni markeri. Preuzeto i modifikovano iz Prodić i saradnici [143].

5.5 Kinetika oralno-gastroične digestije sirovog, barenog i peēenog kikirikija

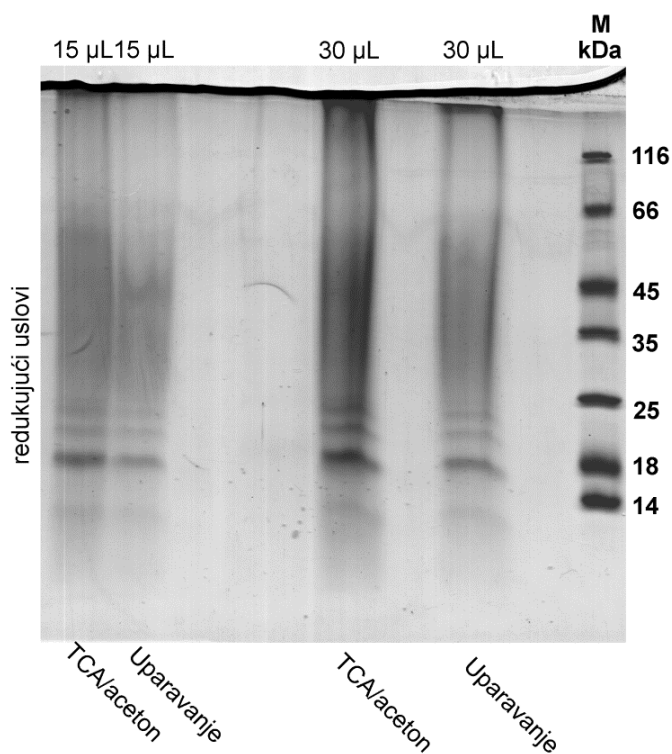
Obzirom na istaknutu važnost koraka gastroične digestije i njenih proizvoda, tj., fragmenata alergena u procesu senzitivacije, okarakterisani su proizvodi oralno-gastroične digestije sirovog i termički obraēenog kikirikija u vremenskim intervalima zaključno sa 120 minuta. Fokus je bio na proteinima kikirikija velikih molekulskih masa kao što su Ara h 1 i Ara h 3. U sirovom kikirikiju, ova dva proteina se pepsinski hidrolizuju između 60 i 90 minuta (Slika 12). U toku tog kritičnog momenta samo Ara h 1 (oko 65 kDa) se digestuje i u kivanom i u peēenom kikirikiju, dok je Ara h 3 i dalje vidljiv u oralno-gastroičnom digestu termički tretiranog kikirikija. Ovo ukazuje da se dobijanje oralno-gastroičnih proizvoda mora izvoditi do krajnjih 120 minuta, koliko je propisano po INFOGEST protokolu da traje gastroična digestija, i ne sme da se skraćuje kao što su u svojoj studiji uradili Rao i saradnici [17].



Slika 12 SDS-PAGE proteinski profili digesta sirovog, kuvanog i pečenog kikirikija, dobijenog nakon *in vitro* oralno-gastrointestinalne digestije odmašćivanja rastvorne faze TCA/acetonskim taloženjem proteina (sa odgovarajućim kontrolama). SDS PAGE je izvođen u redukujućim i neredukujućim uslovima na 14% gelu. C+p – kontrola koja sadrži pepsin, 120 minut; D – digest, 120. minut; pepsin – kontrola koja sadrži samo pepsin na 0. i 120. minutu; M - molekularni markeri. Digestija je praćena kinetički, i svaka traka odgovara različitom vremenskom intervalu. Preuzeto i modifikovano iz Prodić i saradnici [143].

5.5.1 Efekat „curenja” proteina u vodu tokom pripreme kuvanog kikirikija

Na Slici 13 je prikazan proteinski profil vode u kom se pripremao bareni kikiriki. Uočljivi su fragmenti manji od 25 kDa, sa izraženim trakama na 18 kDa koje odgovaraju Ara h 2 proteinu, kao baznim subjedinicama Ara h 3 nižih masa, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima [16, 17]. Iz ovog rezultata se može zaključiti da tokom kuvanja kikirikija mahom dolazi do oslobađanja proteina malih molekulskih masa, kao i da kuvanje, kao termički proces, bar delimično rezultuje u zrnima kikirikija osiromašenim sa Ara h 2 i Ara h 6. Ovaj rezultat dodatno sugerise da bi kuvanje usitnjenog zrna kikirikija moglo još znatno više da osiromaši kikiriki od ovih najpotentnijih alergena, jer bi se usitnjavanjem povećala dodirna površina sa vodom i njihovo efikasno oslobađanje u okolni rastvor.



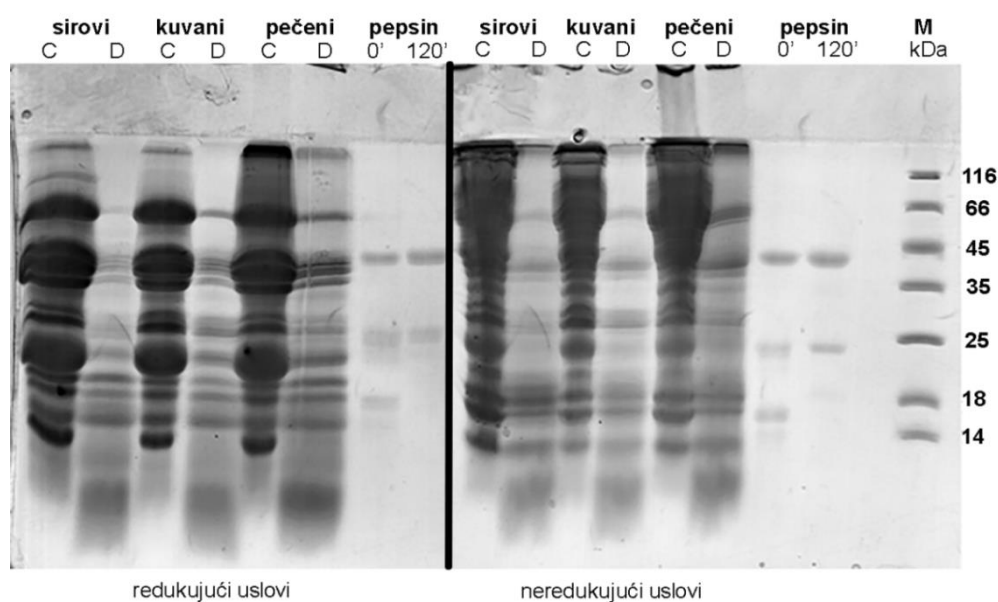
Slika 13 SDS-PAGE proteinski profili vode nakon kuvanja kikirikija. SDS PAGE je izvođen u redukujućim uslovima na 14% gelu. Voda je koncentrovana 10 puta na dva načina: taloženjem proteina sa TCA/acetonom i uparavanjem. Uzorci su nanaseni u bunare u dve različite zapremine (15 µL i 30 µL); M - molekularni markeri Preuzeto i modifikovano iz Prodić i saradnici [143].

5.6 SDS-PAGE proteinski profili nerastvorne frakcije nakon *in vitro* oralno-gastroične digestije kikirikija

Kako bi se dobio kvalitativan i semi-kvantitativan uvid u profil proteina kikirikija koji nakon *in vitro* oralno-gastroične digestije zaostaju u nerastvornom čvrstom materijalu, talog zaostao nakon oralno-gastroične digestije je solubilisan u denaturišućem puferu i analiziran na SDS PAGE pod redukujućim i neredukujućim uslovima. Kada se kaže talog, u ovom slučaju se misli na nesolubilni materijal dobijen centrifugiranjem nakon oralno-gastroične digestije od 120 minuta. Na Slici 14 je prikazan elektroforetski profil taloga nakon simulirane oralno-gastroične digestije kontrolnog i digestovanog uzorka sirovog, kivanog i pečenog kikirikija. Pod neredukujućim uslovima kod kontrolnih uzoraka vidi se prisustvo kovalentnih agregata velikih molekulskih masa (na vrhu gela za razdvajanje), pri čemu su kod pečenog kikirikija dodatno prisutni i agregati još znatno većih masa koji su nisu uspeli da uđu u gel za razdvajanje. Pod redukujućim uslovima u kontrolnim uzorcima sirovog i kivanog kikirikija ovih agregata ima jako malo, ukazujući na to da su oni mahom umrežni disulfidnim vezama. Međutim, kod pečenog kikirikija agregati velikih masa su prisutni u velikoj meri, a agregata jako visokih masa takoreći nema, što govori o tome da su kod pečenog kikirikija proteinski agregati umreženi kako disulfidnim, tako i nedisulfidnim kovalentnim vezama. Kako, mimo agregata, pod redukujućim uslovima sva tri kontrolna uzorka imaju slične profile, a pod neredukujućim kod kivanog i pečenog kikirikija dominiraju proteini većih masa (većih od 40 kDa), može se zaključiti da generalno termički tretman kikirikija favorizuje formiranje disulfidno vezanih agregata. Kikiriki je jako bogat proteinima sa velikim brojem disulfida, tako da tokom termičkog tretmana dolazi do njihove izmene i formiranja disulfidno vezanih agregata. Sa druge strane, kako je pečeni kikiriki termički tretiran na znatno višoj temperaturi i u suvim uslovima, on je podlegao Majarovoj reakciji između proteina i saharida, tokom koje je zapravo i došlo i do formiranja nedisulfidnih agregata. Ovi nedisulfidni agregati su nastali preko ostataka lizina, najverovatnije kao petozisinski ili kao agregati nastali od inicijalnih Amadorijevih adukata saharida i ostataka lizina [146].

Za razliku od kontrola, svi digestovani uzorci sadrže znatno manju količinu proteina, jasno ukazujući da je i u samom nerastvornom materijalu došlo do digestije. Naime, u

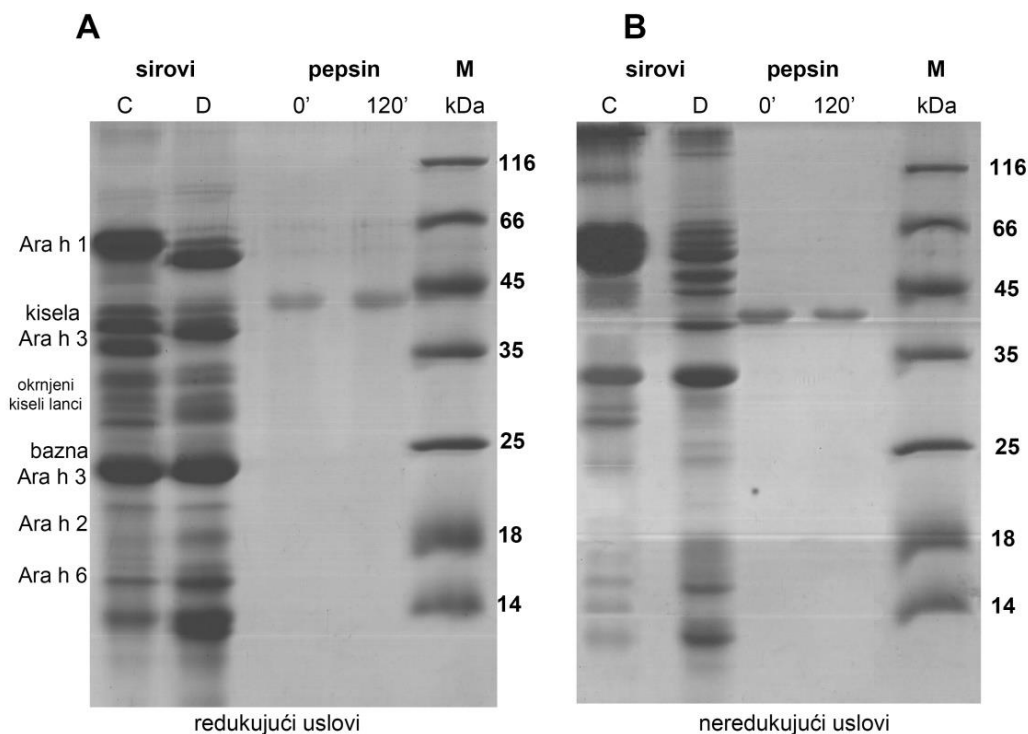
simuliranoj gastričnoj tečnosti nerastvorni materijal je bio dobro hidratiran, čime je bio potpuno omogućen pristup pepsina proteinima koji su ostali imobilisani u nerastvornom materijalu, a time i njegovo efikasno dejstvo. Međutim, može se primetiti, kako pod redukujućim, tako i pod neredukujućim uslovima, da je digestibilnost proteina termički tretiranog kikirikija nešto manja od sirovog. Najmanja digestibilnost se može uočiti kod pečenog kikirikija, uključujući njegove nedisulfidne agregate. Pored toga, vidno je da su Ara h 1 i Ara h 3 u velikoj meri izdigestovani, dok je oko polovine količine Ara h 2 i Ara h 6 ostalo neizdigestovano u svim uzorcima. Ovo ukazuje na to da su čak i u fizički imobilizovanoj formi Ara h 1 i Ara h 3 podložni pepsinskoj proteolizi, za razliku od Ara h 2 i Ara h 6. Ovi rezultati ukazuju da nerastvorni materijal koji iz želuca ulazi u duodenum sadrži znatnu količinu alergena, i to mahom Ara h 2 i Ara h 6, i da je ova količina nedigestovanih alergena znatno veća kod termički tretiranog kikirikija, a naročito pečenog, što podržava činjenicu na mogućnost većeg senzitivizujućeg kapaciteta pečenog u odnosu na sirovi i kuvani kikiriki.



Slika 14 SDS-PAGE proteinskih profila insolubilne frakcije nakon *in vitro* oralno-gastrogastrične digestije (sa odgovarajućim kontrolama) sirovog, kuvanog i pečenog kikirikija. SDS PAGE je izvođen u redukujućim i neredujućim uslovima na 14% gelu. C- kontrola, 120. minut; D – digest, 120. minut; pepsin – kontrola koja sadrži samo pepsin na 0. i 120. minutu; M - molekularni markeri. Preuzeto i modifikovano iz Prodić i saradnici [143].

5.7 SDS-PAGE proteinski profili odmašćene rastvorne faze nakon *in vitro* oralno-gastroične digestije sirovog kikirikija

U cilju dobijanja kvalitativnog uvida u profil proteina netretiranog kikirikija koji ostaju neizdigestovani u rastvornoj fazi digestione smeše nakon *in vitro* oralno-gastroične digestije, izdvojena tečna faza dobijena nakon oralno-gastroične digestije sirovog kikirikija je odmašćena precipitacijom proteina pomoću TCA/acetona analizirana na SDS PAGE pod redukujućim i neredukujućim uslovima. Proteinski profil digestovanih proteina je upoređen sa kontrolnim uzorcima, koji su inkubirani bez prisustva pepsina. (Slika 15). Pažljivim taloženjem proteina pomoću TCA/acetona se može da se istaloži oko 30% proteina oslobođenih iz kikirikija u toku digestije, što bi bilo oko 10% ukupnih proteina u zrnju kikirikija. U neredukujućim uslovima (Slika 15B), pre ulaska u razdvajajući poliakrilamidni gel, u kontrolnom uzorku su uočeni agregati velikih molekularskih masa koje, pripadaju Ara h 1 proteinu, dok su te mase sa manjim intenzitetom uočene u digestovanom uzorku. Publikovano je da kada Ara h 1 prelazi iz kisele (pH 2) u baznu sredinu (pH 8) dolazi do formiranja disulfidno umreženih agregata sa molekularskim masama od oko 250 kDa, a pepsinska proteoliza onemogućava formiranje ovakvih agregata Ara h 1 [147]. U kontrolnom (nedigestovanom) uzorku uočavaju se intenzivne trake u regionu između 55 - 65 kDa. Ove trake sadrže Ara h 1 i disulfidno povezane kiselu i baznu subjedinicu Ara h 3 [90]. U digestovanom uzorku, umesto ovih traka uočavamo seriju diskretnih traka između 45 - 65 kDa, koji potiču od proteolize Ara h 1 i Ara h 3. Takođe, trake čije su molekularske mase oko 30 kDa, 15 kDa i 12 kDa, su mnogo intenzivnije u digestovanom uzorku. U redukujućim uslovima (Slika 15A), sasvim je očigledno da Ara h 1 potpuno podleže proteolizi do forme od oko 50 kDa, i verovatno do fragmenata veličine od oko 12 kDa i 16 kDa. Proteoliza kisele subjedinice Ara h 3 (obuhvata region između 35 - 45 kDa) se takođe može videti u redukujućim uslovima. Nasuprot kiseljoj subjedinici je bazna subjedinica koja izgleda potpuno netaknutno, što navodi na zaključak da je otporna na proteolizu. Ovi rezultati nedvosmisleno potvrđuju da se pod ovim uslovima Ara h 1 i Ara h 3 delimično proteolizuju. Za Ara h 2 i Ara h 6 nije moguće da se izvede takav zaključak jer imaju male molekularske mase koje se preklapaju sa generisanim fragmentima Ara h 1 i Ara h 3 niske molekularske mase.



Slika 15. SDS-PAGE proteinski profili oralno-gastroičnog uzorka (sa odgovarajućom kontrolom) sirovog kikirikija dobijenog nakon odmaščivanja TCA/acetonskim taloženjem proteina. SDS PAGE je izvođen u redukujućim i neredukujućim uslovima na 14% gelu. C- kontrola, 120. minut; D – digest, 120. minut; pepsin – kontrola koja sadrži samo pepsin na 0. i 120. minutu; M - molekularni markeri. Preuzeto i modifikovano iz Prodić i saradnici [143].

5.8 Procena efikasnosti pepsinske digestije proteina sirovog kikirikija na osnovu nLC-MS/MS analize i bioinformatičke analize podataka

Procena efikasnosti oralno-gastroične/oralno-gastrointestinalne digestije pomoću denzitometrijske analize 1D SDS-PAGE elektroforetskog profila ograničena je u smislu da nije uvek u stanju da tačno proceni udeo pojedinačnih proteina i proteoformi i fragmenata koji su digestovani zbog mogućeg preklapanja različitih fragmenata proteina iste/slične mase na istoj poziciji u gelu. Štaviše, ovo saznanje je od velike važnosti za procenu efikasnosti digestije proteina ili fragmenata male molekulske mase. Naime, prisustvo fragmenata dobijenih iz proteina veće molekulske mase u istom položaju na

gelu sa malim proteinom ili fragmentom. Ove poteškoće smo prevazišli pristupom semikvantitativnog poređenja sadržaja iseckanih 1D gel traka pomoću „bottom up“ masene spektrometrije i modifikacija standardnog protokola pripreme uzoraka za tripsinku digestiju, kao što je objašnjeno u Odeljku 4.9.1.

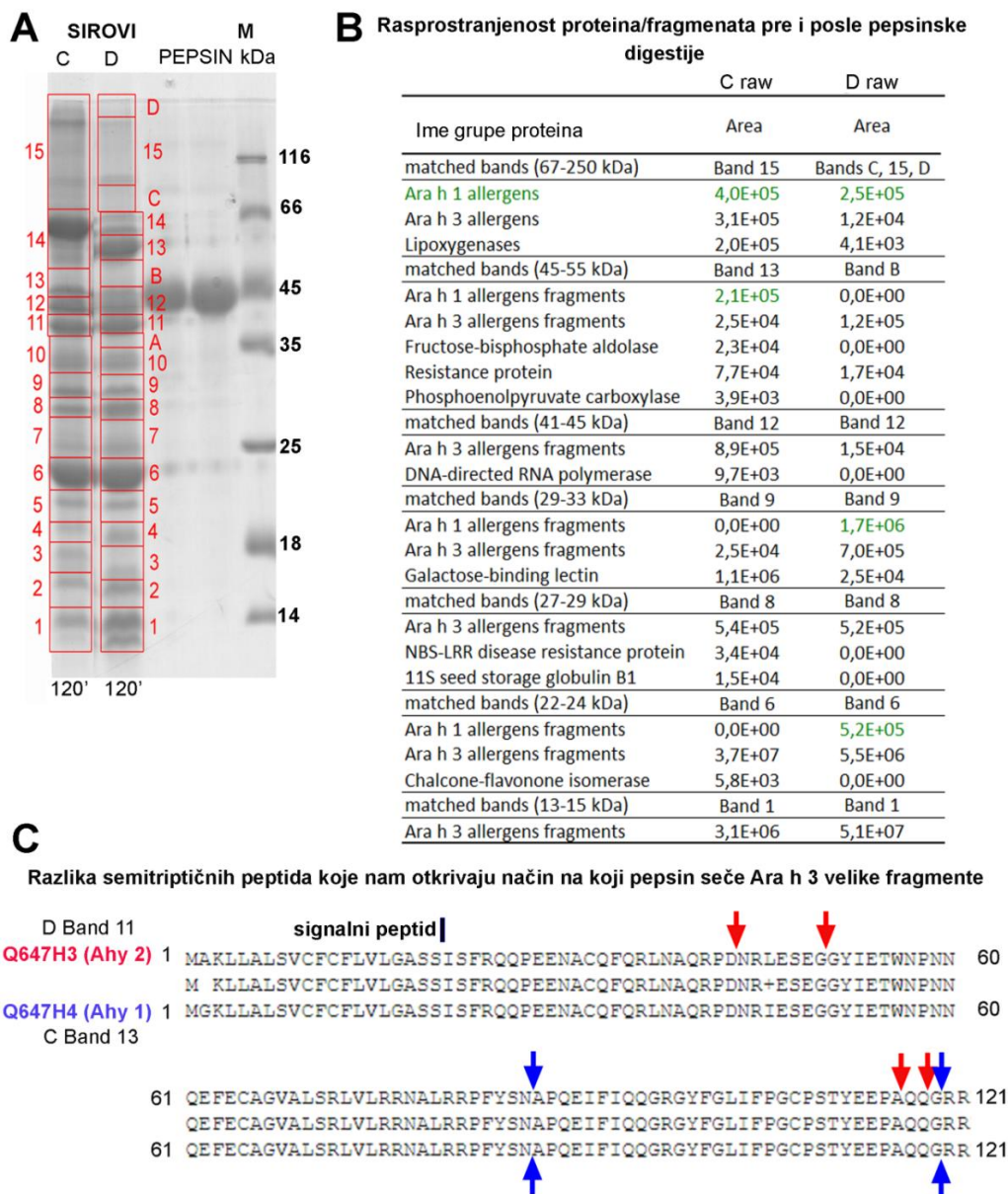
U eksperimentima je primenjena visoko rezolutivna tandemaska masena spektrometrija zajedno sa softverom PEAKS Suite X, i njegovim algoritmom (pretraživačem) za post-translacione modifikacije (PTM), kako bi se istovremeno odredila efikasnost hidrolize pepsina na proteinima sirovog kikirikija, i inicijalno profilisale PTM u kontrolnim i digestovanim uzorcima kikirikija. Primenjeno je semi-kvantitativni poređenje, koje nije uključilo standardnu, „bez obeležavanja“ (*engl.* label free quantification, LFQ) relativnu kvantifikaciju proteina u rastvoru. Razlog tome je što se na osnovu INFOGEST protokola nanose jednake zapremine kontrola i oralno-gastroičnih i oralno-gastrointestinalnih digesta u bunare gela i pri tome se analiziraju dobijeni profili za koje se predpostavlja da imaju različitu količinu proteina i fragmenata u celoj elektroforetskoj traci. To znači one ne sadrže istu količinu proteina ali sadže istu zapreminu uzorka. S tim u vezi, osnovna postavka LFQ algoritma PEAKS platforme predviđa normalizaciju drugih uzoraka na osnovu kontrole, što bi poremetilo rezultate i dovelo do pogrešnih tumačenja. Međutim, u najnovijoj verziji PEAKS-a koju smo koristili, a to je verzija X, postoji opcija i da se ništa ne menja, ili da se vrši normalizacija „po meri“ tj. po izboru operatera. Obzirom na glavni eksperimentalni zahtev INFOGEST protokola, odlučili smo se za prvu varijantu, a to je da se analiziraju rezultati sa odnosom 1:1 (bez normalizacije u odnosu na količinu proteina u kontrolnom uzorku).

Semi-kvantitativnim pristupom upoređena je količina proteina/alergena na osnovu traka iz istog regiona na gelu, kako iz kontrolnog tako i iz digestovanog uzorka, međutim ovakav pristup treba ipak uzeti sa rezervom (Slika 16A) obzirom da je nov, i da neki tripsinski peptidi bolje „lete“ od drugih pa time imaju i intenzivniji signal; no ovo je već odavno poznato u svetu proteomike, te se stoga rezultati ovog inovativnog pristupa uzimaju u kontekstu semi-kvantitativnog poređenja. Pored toga, poređenje profila detektovanih peptidnih sekvenci istog proteina i njegovih fragmenata iz kontrolnih i digestovanih uzoraka sirovog kikirikija je omogućio uvid u informacije o specifičnim

mestima pepsinske hidrolize na osnovu preklapanja atriptičnih i semitriptičnih mapa kod kontrolnog i digestovanog proteoma sirovog kikirikija, a samo jedan reprezentativni prikaz takvih rezultata predstavljen je na Slici 16B.

Intaktna forma Ara h 1 (65 kDa) je parcijalno digestovana, a proteolitički, kaskadni način rada pepsina na njoj i Ara h 3 je prikazan na Slici 16A (vrednosti relativnih količina Ara h 1 su označena zelenim slovima). Nasuprot Ara h 1 proteinu, Ara h 3, takođe detektovan u ovom regionu u kontrolnom uzorku, se pokazao da je kompletno digestovan. Proteini koji su detektovani kao potpuno hidrolizovani pepsinom u digestovanom uzorku su lipoksigenaza (traka 15), glaktoza vezujući lektin (traka 9) i 11S skladišni proteini (traka 8), (Slika 16A). Ovi rezultati su u skladu sa naširoko prihvaćenim mišljenjem da su ovi proteini podložni pepsinskoj proteolizi. Ustanovljeno je da se nagomilavaju fragmenti glavnog alergena kikirikija Ara h 1, nakon hidrolize pepsinom. Ara h 1 fragmenti su detektovani i u trakama 9 (region između 29-33 kDa) i 6 (region između 22-24 kDa) digestovanog uzorka, dok u kontrolnom uzorku uopšte nisu detektovani u datim regionima. Nasuprot Ara h 1 proteinu, Ara h 3 je u određenoj meri otporan na hidrolizu pepsinom, gde traka 6 ne podleže uticaju pepsina (Slika 16A). U ovoj traci detektovani su proteolitički fragmenti kisele subjediniće Ara h 3 i akumulirani fragmenti Ara h 3. Traka 1 (region između 13-15 kDa) digestovanih uzoraka pokazuje akumulaciju malih Ara h 3 peptida u velikom broju. Detaljna analiza je prikazana u Tabeli 5 i daje uvid u fragmente koji su se nagomilali na određenoj molekulskoj masi digestovanog uzorka i fragmente koji su originalno bili prisutni na toj molekulskoj masi, što je analiza kontrolnog uzorka omogućila.

Identifikovana su pepsinska mesta proteolize tako što su se uporedila N-terminalni fragmenti kisele subjediniće nađene u regionu između 25-45 kDa molekulske mase, i uključuju peptidne veze između aminokiselina aspartata i asparagina, između dva glicina, alanine i glutamine, i na kraju glutamina i glicina (Slika 16A). Takođe, nema razlike u kvalitativnom sadržaju PTM između kontrolnog i digestovanog uzorka u sirovom kikirikiju (Prilog Slika 8.1).



Slika 16 Identifikovani proteinski fragmenti u kontrolnom i digestovanom uzorku oralno-gastroične faze digestije sirovog kikirikija sa visoko rezolutivnom tandemskom masenom spektrometrijom. A– mapa sečenja gela proteina/fragmenata i njihova rasprostranjenost po traci na gelu. SDS-PAGE je rađena u redukujućim uslovima, na 14% gelu. C- kontrola, 120. minut; D – digest, 120. minut; pepsin – kontrola koja sadrži samo pepsin na 0. i 120. minutu; M - molekularni markeri. B – Relativna količina proteina prikazana preko integraljenih površina ekstrahovanih hromatografskih pikova masenih jona peptida (engl. Area under extracted ion chromatography curve-XIC). Rasprostranjenost proteina/fragmenata pre i posle pepsinske digestije. C– Poređenje homologne sekvence fragmenta kisele subjedinice Ara h 3 nađenog na molekuloj

masi od 40 kDa, pokazujući nespecifična mesta proteolize označene sa plavim strelicama i jedinstvena mesta koja potiču od hidrolize pepsinom označene sa crvenim strelicama. Preuzeto i modifikovano iz Prodić i saradnici [143].

Tabela 5 Kvalitativni sadržaj post-translacionih modifikacija između kontrolnog i digestovanog uzorka u sirovom kikirikiju.

Traka #1 13-15 kDa na SDSPAGE Gastričnoj KONTROLI, 120'								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
1	20574	A1DZF0	Arachin 6 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	60375	140.52	8	3.46E+05
1	20576	Q9FZ11	Gly1 OS=Arachis hypogaea OX=38	Ara h 3	60449	140.52	8	3.46E+05
1	20578	B5TYU1	Arachin Arah3 isnaorm OS=Arach	Ara h 3	60624	140.52	8	3.46E+05
1	20579	Q5I6T2	Arachin Ahy-4 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	60736	140.52	8	3.46E+05
1	20580	Q647H4	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	61506	140.52	7	3.46E+05
1	20581	Q647H3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	61532	140.52	7	3.46E+05
1	20582	Q8LKN1	Allergen Arah3/Arah4 OS=Arachis	Ara h 3	61738	140.52	7	3.46E+05
1	20577	Q9SQH7	Glycinin OS=Arachis hypogaea OX	Ara h 3	61011	140.52	8	3.46E+05
1	20575	Q8LL03	Trypsin inhibitor (Fragment) OS=	Ara h 3	25499	140.52	18	3.46E+05
								3.11E+06

Traka #1 13-15 kDa na SDSPAGE razdvojenoj Gastričnoj DIGESTIJI, 120', upareno sa Traka #1 u kontroli								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
1	20574	A1DZF0	Arachin 6 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	60375	203.54	18	1.05E+07
1	20578	B5TYU1	Arachin Arah3 isnaorm OS=Arach	Ara h 3	60624	203.54	18	1.05E+07
1	20577	Q9SQH7	Glycinin OS=Arachis hypogaea OX	Ara h 3	61011	203.54	18	1.05E+07
2	20593	Q6IWG5	Glycinin (Fragment) OS=Arachis h	Ara h 3	58061	129.76	19	6.63E+06
2	20595	E5G077	Ara h 3 allergen OS=Arachis hypo	Ara h 3	58305	129.76	19	6.63E+06
2	20594	Q0GM57	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	58263	129.76	19	6.63E+06
								5.14E+07

Traka #2 15-17 kDa na SDSPAGE razdvojenoj gastričnoj KONTROLA na 120'								
Nedovoljno osetljivo								

Traka #2 15-17 kDa na SDSPAGE razdvojenoj gastričnoj DIGESTIJI 120' upareno sa Traka #2 u kontroli								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
1	20574	A1DZF0	Arachin 6 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	60375	108.77	20	1.03E+05
3	20593	Q6IWG5	Glycinin (Fragment) OS=Arachis h	Ara h 3	58061	33.67	7	0.00E+00
3	20595	E5G077	Ara h 3 allergen OS=Arachis hypo	Ara h 3	58305	33.67	7	0.00E+00
3	20594	Q0GM57	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea	Ara h 3	58263	33.67	7	0.00E+00
								1.03E+05

Traka #3 17-20 kDa na SDSPAGE razdvojenoj gastričnoj KONTROLA na 120'								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
2	20879	A0A290FZY6	Resistance protein (Fragment) OS=Arachis hypogaea	n/a	87223	29.52	1	2.64E+04

Traka #3 17-18 kDa na SDSPAGE razdvojenj gastričnoj DIGESTIJI, 120' upareno sa Traka #3 u kontroli								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
3	22696	E9LFE7	7S conarachin (Fragment) OS=Ara	Ara h 1	15873	47.17	9	3.05E+03
3	22695	Q6PSU5	Conarachin (Fragment) OS=Arachi	Ara h 1	33604	47.17	4	3.05E+03
3	21739	Q6PSU6	Conarachin (Fragment) OS=Arachi	Ara h 1	34133	47.17	4	3.05E+03
3	22400	Q6PSU4	Conarachin (Fragment) OS=Arachi	Ara h 1	48095	47.17	3	3.05E+03
3	20849	Q6PSU3	Conarachin (Fragment) OS=Arachi	Ara h 1	66575	47.17	2	3.05E+03
3	20850	P43237	Allergen Ara h 1 clone P17 OS=Ara	Ara h 1	70283	47.17	2	3.05E+03
3	20851	B3IXL2	Main allergen Ara h1 OS=Arachis	Ara h 1	70283	47.17	2	3.05E+03
3	20852	E5G076	Ara h 1 allergen OS=Arachis hypo	Ara h 1	70788	47.17	2	3.05E+03
3	20853	N1NG13	Seed storage protein Ara h1 OS=A	Ara h 1	71345	47.17	2	3.05E+03
3	20854	P43238	Allergen Ara h 1 clone P41B OS=	Ara h 1	71345	47.17	2	3.05E+03
								3.05E+04

Traka #4 21-22 kDa na SDSPAGE razdvojenj gastričnoj KONTROLA na 120'								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
7	21031	Q9M5D3	Lipoxygenase OS=Arachis hypogae	n/a	97616	84.68	5	7.73E+03
9	20574	A1DZF0	Arachin 6 OS=Arachis hypogaea O	Ara h 3	60375	72.5	2	6.09E+03
9	20576	Q9FZ11	Gly1 OS=Arachis hypogaea OX=38	Ara h 3	60449	72.5	2	6.09E+03
9	20578	B5TYU1	Arachin Arah3 isnaorm OS=Arachi	Ara h 3	60624	72.5	2	6.09E+03
9	20577	Q9SQH7	Glycinin OS=Arachis hypogaea OX	Ara h 3	61011	72.5	2	6.09E+03
9	20579	Q516T2	Arachin Ahy-4 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	60736	72.5	2	6.09E+03
9	20580	Q647H4	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	61506	72.5	2	6.09E+03
9	20591	Q6T2T4	Storage protein OS=Arachis hypog	Ara h 3	61499	72.5	2	6.09E+03
9	20581	Q647H3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	61532	72.5	2	6.09E+03
9	20582	Q8LKN1	Allergen Arah3/Arah4 OS=Arachis	Ara h 3	61738	72.5	2	6.09E+03
4	21037	E9LFE8	11S arachin (Fragment) OS=Arach	n/a	28290	94.35	15	5.44E+03
7	21032	Q4JME6	Lipoxygenase OS=Arachis hypogae	n/a	97476	77.44	4	4.88E+03
7	21033	Q4JME7	Lipoxygenase OS=Arachis hypogae	n/a	97596	77.44	4	4.88E+03
11	21034	Q38711	Galactose-binding lectin (Fragme	n/a	29134	53.52	5	1.59E+03
11	21036	A0A089ZXL7	Peanut agglutinin variant OS=Ara	n/a	29407	53.52	5	1.59E+03
11	21035	P02872	Galactose-binding lectin OS=Aracl	n/a	29325	53.52	5	1.59E+03
10	20593	Q61WG5	Glycinin (Fragment) OS=Arachis h	Ara h 3	58061	31.78	5	1.33E+03
10	20595	E5G077	Ara h 3 allergen OS=Arachis hypo	Ara h 3	58305	31.78	5	1.33E+03
10	20594	Q0GM57	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	58263	31.78	5	1.33E+03
							total	8.65E+04
							Ara h 3	5.88E+04

Traka #4 18-20 kDa na SDSPAGE razdvojenj gastričnoj DIGESTIJI, 120' upareno sa Traka #4 u kontroli								
			Nedovoljno osetljivo					

Traka #5 20-22 kDa na SDSPAGE razdvojenj gastričnoj KONTROLA na 120'								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
3	21693	A0A290G0J9	Resistance protein (Fragment) OS=Arachis hypog		57776	22.10	4	3.00E+03
4	21619	A0A290GKJ7	Resistance protein (Fragment) OS=Arachis hypog		54561	20.35	2	2.50E+03
								5.50E+03

Traka #5 20-22 kDa na SDSPAGE razdvojenj gastričnoj DIGESTIJI, 120' upareno sa Traka #5 u kontroli								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
6	20593	Q61WG5	Glycinin (Fragment) OS=Arachis h	Ara h 3	58061	269.16	35	3.67E+07
6	20594	Q0GM57	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	58263	269.16	35	3.67E+07
8	20582	Q8LKN1	Allergen Arah3/Arah4 OS=Arachis	Ara h 3	61738	282.23	28	7.49E+06
2	20581	Q647H3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	61532	309.17	34	5.51E+06
1	20574	A1DZF0	Arachin 6 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	60375	305.89	34	3.92E+06
7	20578	B5TYU1	Arachin Arah3 isnaorm OS=Arach	Ara h 3	60624	300.00	31	2.11E+06
5	20576	Q9FZ11	Gly1 OS=Arachis hypogaea OX=38	Ara h 3	60449	293.74	28	1.91E+05
9	20590	O82580	Glycinin (Fragment) OS=Arachis h	Ara h 3	58350	229.09	24	0.00E+00
								9.26E+07

Traka #6 22-24 kDa na SDSPAGE razdvojenj gastričnoj KONTROLA na 120'								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
9	20593	Q61WG5	Glycinin (Fragment) OS=Arachis h	Ara h 3	58061	258.08	31	1.34E+07
9	20594	Q0GM57	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea (Ara h 3	58263	258.08	31	1.34E+07
3	20581	Q647H3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	61532	301.28	34	7.31E+06
4	20578	B5TYU1	Arachin Arah3 isnaorm OS=Arach	Ara h 3	60624	293.74	32	1.01E+06
10	20590	O82580	Glycinin (Fragment) OS=Arachis h	Ara h 3	58350	251.87	22	6.69E+05
6	20582	Q8LKN1	Allergen Arah3/Arah4 OS=Arachis	Ara h 3	61738	277.56	31	3.61E+05
7	20576	Q9FZ11	Gly1 OS=Arachis hypogaea OX=3E	Ara h 3	60449	286.21	26	2.20E+05
11	20968	AHY3_ARAHY	Arachin Ahy-3 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	54569	130.71	7	2.17E+05
19	21915	J9QGM3	Chalcone-flavonone isomerase fa	n/a	27626	27.75	11	5.78E+03
							total	3.66E+07
							Ara h 3	3.66E+07

Traka #6 22-24 kDa na SDSPAGE razdvojenj gastričnoj DIGESTIJI, 120' upareno sa Traka #6 u kontroli								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
3	20581	Q647H3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	61532	235.17	34	1.63E+05
6	20578	B5TYU1	Arachin Arah3 isnaorm OS=Arachi	Ara h 3	60624	231.54	32	1.17E+03
5	20582	Q8LKN1	Allergen Arah3/Arah4 OS=Arachis	Ara h 3	61738	214.35	34	3.57E+05
8	20590	O82580	Glycinin (Fragment) OS=Arachis h	Ara h 3	58350	182.12	23	3.67E+05
7	20593	Q61WG5	Glycinin (Fragment) OS=Arachis h	Ara h 3	58061	172.18	24	2.29E+06
7	20594	Q0GM57	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea (Ara h 3	58263	172.18	23	2.29E+06
9	22400	Q6PSU4	Conarachin (Fragment) OS=Arachi	Ara h 1	48095	96.82	17	1.24E+05
9	20853	N1NG13	Seed storage protein Ara h1 OS=A	Ara h 1	71345	96.82	12	1.24E+05
9	20854	P43238	Allergen Ara h 1 clone P41B OS=	Ara h 1	71345	96.82	12	1.24E+05
							total	5.84E+06
							Ara h 1	3.72E+05
							Ara h 3	5.47E+06

Traka #7 na 24-27 kDa SDSPAGE razdvojenj gastričnoj KONTROLA na 120'								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
2	20576	Q9FZ11	Gly1 OS=Arachis hypogaea OX=3E	Ara h 3	60449	8	8	3.77E+03
2	20579	Q516T2	Arachin Ahy-4 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	60736	8	8	3.77E+03
2	20581	Q647H3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	61532	8	8	3.77E+03
1	20574	A1DZF0	Arachin 6 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	60375	8	8	2.24E+03
1	20578	B5TYU1	Arachin Arah3 isnaorm OS=Arach	Ara h 3	60624	8	8	2.24E+03
1	20580	Q647H4	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	61506	8	8	2.24E+03
1	20591	Q6T2T4	Storage protein OS=Arachis hypog	Ara h 3	61499	8	8	2.24E+03
								2.03E+04

Traka #7 24-27 kDa na SDSPAGE razdvojenj gastričnoj DIGESTIJI, 120' upareno sa Traka #7 u kontroli								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
6	20593	Q61WG5	Glycinin (Fragment) OS=Arachis h	Ara h 3	58061	95	18	3.06E+05
6	20594	Q0GM57	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea (Ara h 3	58263	95	18	3.06E+05
6	20595	E5G077	Ara h 3 allergen OS=Arachis hypog	Ara h 3	58305	95	18	3.06E+05
1	20581	Q647H3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	61532	285.21	51	2.93E+05
3	20580	Q647H4	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	61506	278.6	42	1.17E+05
12	20968	Q647H2	Arachin Ahy-3 OS=Arachis hypoga	Ara h 3 (alpha cha	54569	23.43	7	2.36E+04
14	25842	A0A109QJMS	Long chain acyl-CoA synthetase 4	n/a	74266	27.33	2	6.54E+03
4	20574	A1DZF0	Arachin 6 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	60375	275.05	42	5.84E+03
13	21034	Q38711	Galactose-binding lectin (Fragmer	n/a	29134	56.3	5	5.67E+03
13	21036	A0A089ZXL7	Peanut agglutinin variant OS=Ara	n/a	29407	56.3	5	5.67E+03
13	21035	P02872	Galactose-binding lectin OS=Arach	n/a	29325	56.3	5	5.67E+03
15	22368	A1E2B0	11S seed storage globulin B1 OS=	n/a	33520	24.77	4	5.41E+03
5	20590	O82580	Glycinin (Fragment) OS=Arachis h	Ara h 3	58350	217.48	25	2.50E+03
							total	1.39E+06
							Ara h 3	1.36E+06

Traka #8 27-29 kDa na SDSPAGE razdvojenj gastričnoj KONTROLA na 120'								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
1	20574	A1DZF0	Arachin 6 OS=Arachis hypogaea O	Ara h 3	60375	194.95	35	4.03E+05
6	21689	Q2KQ45	Resistance protein PLTR (Fragmen	n/a	19632	22.16	7	2.03E+05
2	20581	Q647H3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	61532	181.57	29	6.87E+04
4	20593	Q61WG5	Glycinin (Fragment) OS=Arachis h	Ara h 3	58061	43.35	11	3.29E+04
4	20594	Q0GM57	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	58263	43.35	11	3.29E+04
5	22368	A1E2B0	11S seed storage globulin B1 OS=	n/a	33520	25.85	4	1.52E+04
3	20579	Q5I6T2	Arachin Ahy-4 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	60736	174.98	29	0.00E+00
							total	7.56E+05
							Ara h 3	5.38E+05

Traka #8 27-29 kDa na SDSPAGE razdvojenj gastričnoj DIGESTIJI, 120' upareno sa Traka #8								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
1	20579	Q5I6T2	Arachin Ahy-4 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	60736	93.44	5	1.08E+05
1	20576	Q9FZ11	Gly1 OS=Arachis hypogaea OX=38	Ara h 3	60449	93.44	5	1.08E+05
1	20581	Q647H3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	61532	93.44	4	1.08E+05
5	20834	AOA1B3TNS1	NBS-LRR type disease resistance p	n/a	108583	21.13	1	3.40E+04
3	20593	Q61WG5	Glycinin (Fragment) OS=Arachis h	Ara h 3	58061	38.36	8	3.39E+04
3	20595	E5G077	Ara h 3 allergen OS=Arachis hypo	Ara h 3	58305	38.36	8	3.39E+04
3	20594	Q0GM57	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	58263	38.36	8	3.39E+04
2	20578	B5TYU1	Arachin Arah3 isnaorm OS=Arachi	Ara h 3	60624	80.27	5	2.33E+04
2	20574	A1DZF0	Arachin 6 OS=Arachis hypogaea O	Ara h 3	60375	80.27	5	2.33E+04
2	20580	Q647H4	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	61506	80.27	4	2.33E+04
2	20591	Q6T2T4	Storage protein OS=Arachis hypog	Ara h 3	61499	80.27	4	2.33E+04
							total	5.53E+05
							Ara h 3	5.19E+05

Traka #9 29-33 kDa na SDSPAGE razdvojenj gastričnoj KONTROLA na 120'								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
1	21035	P02872	Galactose-binding lectin OS=Arac	n/a	29325	215.68	70	5.53E+05
1	21034	Q38711	Galactose-binding lectin (Fragmen	n/a	29134	215.68	70	5.53E+05
2	21349	Q43373	Galactose-binding lectin OS=Arac	n/a	29566	96.69	14	1.80E+04
10	20593	Q61WG5	Glycinin (Fragment) OS=Arachis h	Ara h 3	58061	36.74	5	8.49E+03
10	20595	E5G077	Ara h 3 allergen OS=Arachis hypo	Ara h 3	58305	36.74	5	8.49E+03
10	20594	Q0GM57	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	58263	36.74	5	8.49E+03
7	20591	Q6T2T4	Storage protein OS=Arachis hypog	Ara h 3	61499	87.78	4	0.00E+00
7	20574	A1DZF0	Arachin 6 OS=Arachis hypogaea O	Ara h 3	60375	87.78	5	0.00E+00
7	20578	B5TYU1	Arachin Arah3 isnaorm OS=Arachi	Ara h 3	60624	87.78	5	0.00E+00
7	20580	Q647H4	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	61506	87.78	4	0.00E+00
8	20576	Q9FZ11	Gly1 OS=Arachis hypogaea OX=38	Ara h 3	60449	80.32	5	0.00E+00
8	20581	Q647H3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	61532	80.32	4	0.00E+00
8	20579	Q5I6T2	Arachin Ahy-4 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	60736	80.32	5	0.00E+00
							total	1.15E+06
							Galactose	1.12E+06
							Ara h 3	2.55E+04

Traka #9 29-33 kDa na SDSPAGE razdvojenoj gastričnoj DIGESTIJI, 120' matched with Traka #9 u kontroli								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
1	20853	N1NG13	Seed storage protein Ara h1 OS=A	Ara h 1	71345	114.12	5	2.11E+05
1	20854	P43238	Allergen Ara h 1 clone P41B OS=A	Ara h 1	71345	114.12	5	2.11E+05
1	22400	Q6PSU4	Conarachin (Fragment) OS=Arachi	Ara h 1	48095	114.12	7	2.11E+05
1	20849	Q6PSU3	Conarachin (Fragment) OS=Arachi	Ara h 1	66575	114.12	6	2.11E+05
1	20850	P43237	Allergen Ara h 1 clone P17 OS=A	Ara h 1	70283	114.12	5	2.11E+05
1	20851	B3IXL2	Main allergen Ara h1 OS=Arachis	Ara h 1	70283	114.12	5	2.11E+05
1	21739	Q6PSU6	Conarachin (Fragment) OS=Arachi	Ara h 1	34133	114.12	11	2.11E+05
1	22695	Q6PSU5	Conarachin (Fragment) OS=Arachi	Ara h 1	33604	114.12	11	2.11E+05
3	20593	Q6IWG5	Glycinin (Fragment) OS=Arachis h	Ara h 3	58061	106.08	10	1.80E+05
3	20594	Q0GM57	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	58263	106.08	10	1.80E+05
3	20595	E5G077	Ara h 3 allergen OS=Arachis hypo	Ara h 3	58305	106.08	10	1.80E+05
2	20591	Q6T2T4	Storage protein OS=Arachis hypo	Ara h 3	61499	107.8	4	3.12E+04
2	20580	Q647H4	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	61506	107.8	4	3.12E+04
2	20574	A1DZF0	Arachin 6 OS=Arachis hypogaea O	Ara h 3	60375	107.8	5	3.12E+04
2	20578	B5TYU1	Arachin Arah3 isnaorm OS=Arachi	Ara h 3	60624	107.8	5	3.12E+04
8	21034	Q38711	Galactose-binding lectin (Fragmer	n/a	29134	95.54	9	1.42E+04
8	21035	P02872	Galactose-binding lectin OS=Araci	n/a	29325	95.54	9	1.42E+04
4	20579	Q5I6T2	Arachin Ahy-4 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	60736	107.12	5	1.12E+04
4	20576	Q9FZ11	Gly1 OS=Arachis hypogaea OX=38	Ara h 3	60449	107.12	5	1.12E+04
4	20581	Q647H3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	61532	107.12	4	1.12E+04
							total	2.41E+06
							Ara h1	1.69E+06
							Galactose	2.54E+04
							Ara h 3	6.98E+05

Traka #10 33-38 kDa na SDSPAGE razdvojenoj gastričnoj KONTROLA na 120'								
			Nema detekcije					

Traka #10 35-38 kDa na SDSPAGE razdvojenoj gastričnoj DIGESTIJI, 120' upareno sa Traka #10 u kontroli								
			Nema detekcije					

Traka A 33-35 kDa na SDSPAGE razdvojenoj gastričnoj DIGESTIJI 120' upareno sa Traka #10 u kontroli								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
1	20574	A1DZF0	Arachin 6 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	60375	118.86	12	2.14E+04
1	20580	Q647H4	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	61506	118.86	11	2.14E+04
1	20591	Q6T2T4	Storage protein OS=Arachis hypo	Ara h 3	61499	118.86	11	2.14E+04
4	20576	Q9FZ11	Gly1 OS=Arachis hypogaea OX=38	Ara h 3	60449	93.24	5	5.49E+03
4	20581	Q647H3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	61532	93.24	4	5.49E+03
4	20579	Q5I6T2	Arachin Ahy-4 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	60736	93.24	5	5.49E+03
3	20593	Q6IWG5	Glycinin (Fragment) OS=Arachis h	Ara h 3	58061	36.32	5	9.07E+04
3	20595	E5G077	Ara h 3 allergen OS=Arachis hypo	Ara h 3	58305	36.32	5	9.07E+04
3	20594	Q0GM57	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	58263	36.32	5	9.07E+04
								3.53E+05

Traka #11 38-41 kDa na SDSPAGE razdvojenoj gastričnoj KONTROLA na 120'								
			Nema detekcije					

Traka #11 38-41 kDa na SDSPAGE razdvojenj gastričnoj DIGESTIJI, 120' upareno sa Traka #11 u kontroli								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
7	20595	E5G077	Ara h 3 allergen OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	58305	93.15	16	8.13E+05
7	20594	Q0GM57	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	58263	93.15	16	8.13E+05
7	20593	Q61WG5	Glycinin (Fragment) OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	58061	93.15	16	8.13E+05
5	22697	T2B9M0	Fructose-bisphosphate aldolase C	n/a	38383	134.89	19	4.75E+05
6	20849	Q6PSU3	Conarachin (Fragment) OS=Arachis hypogaea C	Ara h 1	66575	144.98	18	4.03E+05
6	20850	P43237	Allergen Ara h 1 clone P17 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 1	70283	144.98	17	4.03E+05
6	20851	B3IXL2	Main allergen Ara h1 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 1	70283	144.98	17	4.03E+05
1	20581	Q647H3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	61532	245.95	45	1.90E+05
2	20576	Q9FZ11	Gly1 OS=Arachis hypogaea OX=3E	Ara h 3	60449	249.49	46	6.66E+04
12	21994	A0A0A6ZDT0	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	n/a	20099	61.73	8	6.80E+03
12	21405	A0A0A6ZDP1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	n/a	20101	61.73	8	6.80E+03
							total	4.4E+06
							Ara h 1	1.2E+06
							Ara h 3	2.7E+06

Traka #12 41-45 kDa na SDSPAGE razdvojenj gastričnoj KONTROLA na 120'								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
1	20593	Q61WG5	Glycinin (Fragment) OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	58061	123.43	17	2.72E+05
1	20594	Q0GM57	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	58263	123.43	17	2.72E+05
1	20595	E5G077	Ara h 3 allergen OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	58305	123.43	17	2.72E+05
2	20590	O82580	Glycinin (Fragment) OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	58350	168.47	23	7.13E+04
3	20787	A0A191UJ63	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	n/a	156977	25.61	1	9.71E+03
							total	9.0E+05
							Ara h 3	8.9E+05

Traka #12 41-45 kDa na SDSPAGE razdvojenj gastričnoj DIGESTIJI 120' upareno sa Traka# 12 u kontroli								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
1	20576	Q9FZ11	Gly1 OS=Arachis hypogaea OX=3E	Ara h 3	60449	40.98	4	1.65E+03
1	20578	B5TYU1	Arachin Arah3 isnaorm OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	60624	40.98	4	1.65E+03
1	20579	Q5I6T2	Arachin Ahy-4 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	60736	40.98	4	1.65E+03
1	20581	Q647H3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	61532	40.98	4	1.65E+03
1	20574	A1DZF0	Arachin 6 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	60375	40.98	4	1.65E+03
1	20577	Q9SQH7	Glycinin OS=Arachis hypogaea OX=3E	Ara h 3	61011	40.98	4	1.65E+03
1	20580	Q647H4	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	61506	40.98	4	1.65E+03
1	20582	Q8LKN1	Allergen Arah3/Arah4 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	61738	40.98	4	1.65E+03
1	20575	Q8LL03	Trypsin inhibitor (Fragment) OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	25499	40.98	11	1.65E+03
							Ara h 3	1.49E+04

Traka #13 45-55 kDa na SDSPAGE razdvojenj gastričnoj KONTROLA na 120'								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
9	22400	Q6PSU4	Conarachin (Fragment) OS=Arachis hypogaea C	Ara h 1	48095	129.6	18	3.50E+04
9	20853	N1NG13	Seed storage protein Ara h1 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 1	71345	129.6	12	3.50E+04
9	20854	P43238	Allergen Ara h 1 clone P41B OS=Arachis hypogaea C	Ara h 1	71345	129.6	12	3.50E+04
9	20849	Q6PSU3	Conarachin (Fragment) OS=Arachis hypogaea C	Ara h 1	66575	127.53	13	3.50E+04
9	20850	P43237	Allergen Ara h 1 clone P17 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 1	70283	127.53	12	3.50E+04
9	20851	B3IXL2	Main allergen Ara h1 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 1	70283	127.53	12	3.50E+04
1	20580	Q647H4	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	61506	233.78	54	2.45E+04
14	22697	T2B9M0	Fructose-bisphosphate aldolase C	n/a	38383	35.36	6	2.30E+04
85	21693	A0A290G0J9	Resistance protein (Fragment) OS=Arachis hypogaea C	n/a	57776	27.13	2	7.72E+04
17	22425	C9W981	Phosphoenolpyruvate carboxylase	n/a	116425	22.72	1	3.94E+03
							total	3.39E+05
							Ara h 1	2.10E+05
							Ara h 3	2.45E+04

Traka B 47-55 kDa na SDSPAGE razdvojennoj gastričnoj DIGESTIJI 120' upareno sa Traka #13 u kontroli								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
1	20593	Q61WG5	Glycinin (Fragment) OS=Arachis h	Ara h 3	58061	43.22	5	9.75E+04
1	20595	E5G077	Ara h 3 allergen OS=Arachis hypo	Ara h 3	58305	43.22	5	9.75E+04
1	20594	Q0GM57	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	58263	43.22	5	9.75E+04
2	20576	Q9FZ11	Gly1 OS=Arachis hypogaea OX=38	Ara h 3	60449	103.35	7	2.70E+04
85	21693	A0A290G0J9	Resistance protein (Fragment) OS=	n/a	57776	27.13	2	1.72E+04
2	20580	Q647H4	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	61506	89.78	2	1.28E+04
2	20591	Q6T2T4	Storage protein OS=Arachis hypog	Ara h 3	61499	89.78	2	1.28E+04
2	20582	Q8LKN1	Allergen Arah3/Arah4 OS=Arachis	Ara h 3	61738	89.78	2	1.28E+04
2	20581	Q647H3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	61532	89.78	2	1.28E+04
2	20574	A1DZF0	Arachin 6 OS=Arachis hypogaea O	Ara h 3	60375	89.78	2	1.28E+04
2	20578	B5TYU1	Arachin Arah3 isnaorm OS=Arachi	Ara h 3	60624	89.78	2	1.28E+04
2	20579	Q5I6T2	Arachin Ahy-4 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	60736	89.78	2	1.28E+04
2	20577	Q9SQH7	Glycinin OS=Arachis hypogaea OX	Ara h 3	61011	89.78	2	1.28E+04
							total	3.37E+05
							Ara h 3	1.25E+05

Traka #14 na SDSPAGE razdvojennoj gastričnoj KONTROLA na 120'								
			Bez pouzdane detekcije					

Traka #13 55-60 kDa na SDSPAGE razdvojennoj gastričnoj DIGESTIJI 120' upareno sa Traka #14 u kontroli								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
1	20853	N1NG13	Seed storage protein Ara h1 OS=A	Ara h 1	71345	367.01	54	9.50E+06
1	20854	P43238	Allergen Ara h 1 clone P41B OS=	Ara h 1	71345	367.01	54	9.50E+06
2	20849	Q6PSU3	Conarachin (Fragment) OS=Arach	Ara h 1	66575	354.63	56	3.88E+06
2	20850	P43237	Allergen Ara h 1 clone P17 OS=A	Ara h 1	70283	354.63	53	3.88E+06
2	20851	B3IXL2	Main allergen Ara h1 OS=Arachis	Ara h 1	70283	354.63	53	3.88E+06
5	20577	Q9SQH7	Glycinin OS=Arachis hypogaea OX	Ara h 3	61011	88.43	2	1.85E+04
5	20581	Q647H3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	61532	88.43	2	1.85E+04
5	20580	Q647H4	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	61506	88.43	2	1.85E+04
5	20582	Q8LKN1	Allergen Arah3/Arah4 OS=Arachis	Ara h 3	61738	88.43	2	1.85E+04
5	20576	Q9FZ11	Gly1 OS=Arachis hypogaea OX=38	Ara h 3	60449	88.43	2	1.85E+04
5	20579	Q5I6T2	Arachin Ahy-4 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	60736	88.43	2	1.85E+04
5	20591	Q6T2T4	Storage protein OS=Arachis hypog	Ara h 3	61499	88.43	2	1.85E+04
5	20574	A1DZF0	Arachin 6 OS=Arachis hypogaea O	Ara h 3	60375	88.43	2	1.85E+04
5	20578	B5TYU1	Arachin Arah3 isnaorm OS=Arachi	Ara h 3	60624	88.43	2	1.85E+04
							total	3.08E+07
							Ara h 1	3.06E+07
							Ara h 3	1.67E+05

Traka #14 60-66 kDa na SDSPAGE razdvojennoj gastričnoj DIGESTIJI 120' upareno sa Traka #14 u kontroli								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
1	20853	N1NG13	Seed storage protein Ara h1 OS=A	Ara h 1	71345	75.17	14	1.09E+05
1	20854	P43238	Allergen Ara h 1 clone P41B OS=	Ara h 1	71345	75.17	14	1.09E+05
1	22400	Q6PSU4	Conarachin (Fragment) OS=Arach	Ara h 1	48095	75.17	21	1.09E+05
1	20849	Q6PSU3	Conarachin (Fragment) OS=Arach	Ara h 1	66575	75.17	15	1.09E+05
1	20850	P43237	Allergen Ara h 1 clone P17 OS=A	Ara h 1	70283	75.17	14	1.09E+05
1	20851	B3IXL2	Main allergen Ara h1 OS=Arachis	Ara h 1	70283	75.17	14	1.09E+05
2	21956	E5FHY1	Late embryogenesis abundant pro	n/a	10140	30.2	14	0.00E+00
							Ara h 1	6.54E+05

Traka #15 67-250 kDa na SDSPAGE razdvojenoj gastričnoj KONTROLA na 120'								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
2	20850	P43237	Allergen Ara h 1 clone P17 OS=A	Ara h 1	70283	173.86	17	9.78E+04
2	20851	B3IXL2	Main allergen Ara h1 OS=Arachis	Ara h 1	70283	173.86	17	9.78E+04
2	20849	Q6PSU3	Conarachin (Fragment) OS=Arach	Ara h 1	66575	173.86	18	9.78E+04
6	20593	Q6IWG5	Glycinin (Fragment) OS=Arachis h	Ara h 3	58061	57.81	5	9.74E+04
6	20595	E5G077	Ara h 3 allergen OS=Arachis hypo	Ara h 3	58305	57.81	5	9.74E+04
6	20594	Q0GM57	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	58263	57.81	5	9.74E+04
3	21031	Q9M5D3	Lipoxygenase OS=Arachis hypogae	n/a	97616	170.26	8	6.68E+04
3	21032	Q4JME6	Lipoxygenase OS=Arachis hypogae	n/a	97476	170.26	8	6.68E+04
3	21033	Q4JME7	Lipoxygenase OS=Arachis hypogae	n/a	97596	170.26	8	6.68E+04
1	20853	N1NG13	Seed storage protein Ara h1 OS=A	Ara h 1	71345	172.12	16	5.11E+04
1	20854	P43238	Allergen Ara h 1 clone P41B OS=A	Ara h 1	71345	172.12	16	5.11E+04
5	20574	A1DZF0	Arachin 6 OS=Arachis hypogaea O	Ara h 3	60375	126.79	8	4.28E+03
5	20578	B5TYU1	Arachin Arah3 isnaorm OS=Arachi	Ara h 3	60624	126.79	8	4.28E+03
5	20580	Q647H4	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	61506	126.79	8	4.28E+03
5	20591	Q6T2T4	Storage protein OS=Arachis hypog	Ara h 3	61499	126.79	8	4.28E+03
4	20579	Q5I6T2	Arachin Ahy-4 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	60736	139.76	8	7.99E+02
4	20576	Q9FZ11	Gly1 OS=Arachis hypogaea OX=38	Ara h 3	60449	139.76	8	7.99E+02
4	20581	Q647H3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypoga	Ara h 3	61532	139.76	8	7.99E+02
							total	9.08E+05
							Ara h 1	3.96E+05
							Ara h 3	3.12E+05
							Lipoxygen	2.00E+05

Traka C 67-80 kDa na SDSPAGE razdvojenoj gastričnoj DIGESTIJI 120' upareno sa Traka #15 u kontroli								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
9	22753	A0A126DIH0	DnaJ OS=Arachis hypogaea OX=38	n/a	39071	23.66	2	1.33E+04
3	20853	N1NG13	Seed storage protein Ara h1 OS=A	Ara h 1	71345	59.25	2	3.97E+03
3	20854	P43238	Allergen Ara h 1 clone P41B OS=A	Ara h 1	71345	59.25	2	3.97E+03
3	20850	P43237	Allergen Ara h 1 clone P17 OS=A	Ara h 1	70283	59.25	2	3.97E+03
3	20851	B3IXL2	Main allergen Ara h1 OS=Arachis	Ara h 1	70283	59.25	2	3.97E+03
3	20849	Q6PSU3	Conarachin (Fragment) OS=Arach	Ara h 1	66575	59.25	2	3.97E+03
3	22400	Q6PSU4	Conarachin (Fragment) OS=Arach	Ara h 1	48095	59.25	3	3.97E+03
7	20593	Q6IWG5	Glycinin (Fragment) OS=Arachis h	Ara h 3	58061	21.90	5	3.91E+03
7	20595	E5G077	Ara h 3 allergen OS=Arachis hypo	Ara h 3	58305	21.90	5	3.91E+03
7	20594	Q0GM57	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea C	Ara h 3	58263	21.90	5	3.91E+03
5	21031	Q9M5D3	Lipoxygenase OS=Arachis hypoga	n/a	97616	66.63	2	1.35E+03
5	21032	Q4JME6	Lipoxygenase OS=Arachis hypoga	n/a	97476	66.63	2	1.35E+03
5	21033	Q4JME7	Lipoxygenase OS=Arachis hypoga	n/a	97596	66.63	2	1.35E+03
							total	5.29E+04
							Ara h 1	2.38E+04
							Ara h 3	1.17E+04
							Lipoxygen	4.05E+03

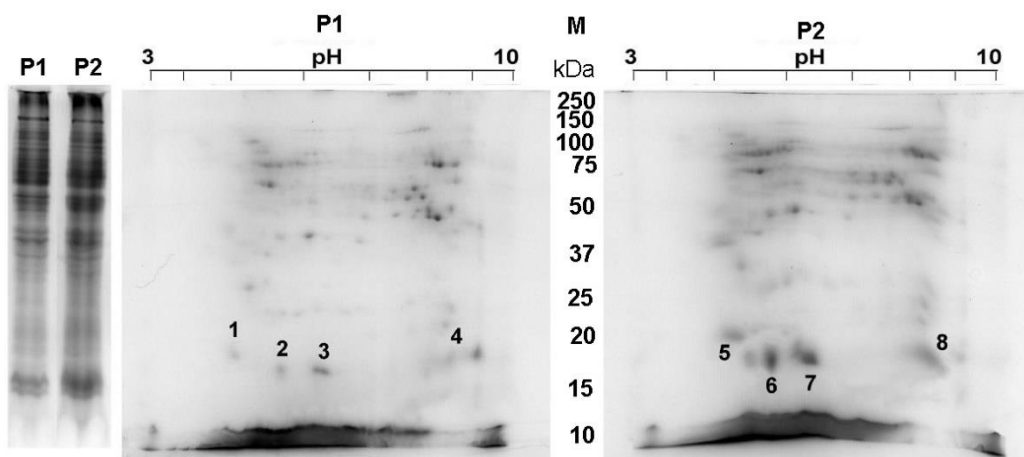
Traka #15 80-150 kDa na SDSPAGE razdvojenoj gastričnoj DIGESTIJI 120' upareno sa Traka #15 u kontroli								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
1	20853	N1NG13	Seed storage protein Ara h1 OS=A	Ara h 1	71345	51.75	10	3.80E+04
1	20854	P43238	Allergen Ara h 1 clone P41B OS=A	Ara h 1	71345	51.75	10	3.80E+04
1	20849	Q6PSU3	Conarachin (Fragment) OS=Arach	Ara h 1	66575	51.75	11	3.80E+04
1	20850	P43237	Allergen Ara h 1 clone P17 OS=A	Ara h 1	70283	51.75	10	3.80E+04
1	20851	B3IXL2	Main allergen Ara h1 OS=Arachis	Ara h 1	70283	51.75	10	3.80E+04
1	22400	Q6PSU4	Conarachin (Fragment) OS=Arach	Ara h 1	48095	51.75	14	3.80E+04
							Ara h 1	2.28E+05

Traka D 150-250 kDa na SDSPAGE razdvojenoj gastričnoj DIGESTIJI 120' upareno sa Traka #15 u kontroli								
Proteinska grupa	Proteinski IB	ID broj proteina	Opis	Alergom	Prosečna masa	-10lgP	Pokrivenost (%)	Površina
4	24521	A0A191UJCO	NAD(P)H-quinone oxidoreductase	n/a	145505	26.72	3	1.64E+04

5.9 Optimizacija izoelektričnog fokusiranja za uspješno fokusiranje proteina iz ekstrakata bogatih mastima i polisaharidima na modelu neodmašćenog polena mačijeg repka

Za dobijanje detaljne slike o digestibilnosti kikirikija, neophodan je proteomički pristup, koji uključuje razdvajanje proteina digesta na 2D SDS PAGE. Izoelektrofokusiranje visoke rezolucije je samim tim preduslov za dobijanje jasne proteomske slike. Kako je rastvorna faza digesta zrna kikirikija veoma bogata lipidima, bilo je neophodno optimizovati uslove za korak izoelektričnog fokusiranja ovakvog materijala. Za optimizaciju izoelektričnog fokusiranja proteina iz biološkog materijala bogatog lipidima i polisaharidima kao model sistem je korišćen ekstrakt neodmašćenog polena trave *Phleum pratense*. Kako čestice polena trava imaju preko 70% lipida u polenskom omotaču [148] i mnoštvo polisaharida u telu polenskih čestica polena [149], prisustvo ovih jedinjenja onemogućava izoelektrofokusiranje (IEF) sa postojećim protokolima, slično kao i u slučaju neodmašćenih uzoraka digestovanog kikirikija.

Obzirom da se kao što je već opisano, prilikom odmašćivanja gube značajne količine, odnosno udeli proteoma, to se pristupilo optimizaciji uslova IEF. Postojeći protokoli su modifikovani, sa naročitim fokusom na aktivnoj rehidraciji tokom 12 h, i dodavanju novih inicijalnih koraka niskih i srednjih vrednosti napona do 500 V (detalji opisani u Odeljku 4.10.2). Primer optimizovanog uspješno izvedenog izoelektričnog fokusiranja neodmašćenog ekstrakta polena mačijeg repka sakupljenog sa dva različita lokaliteta (ruralnog i industrijskog), pokazan je na Slici 17.

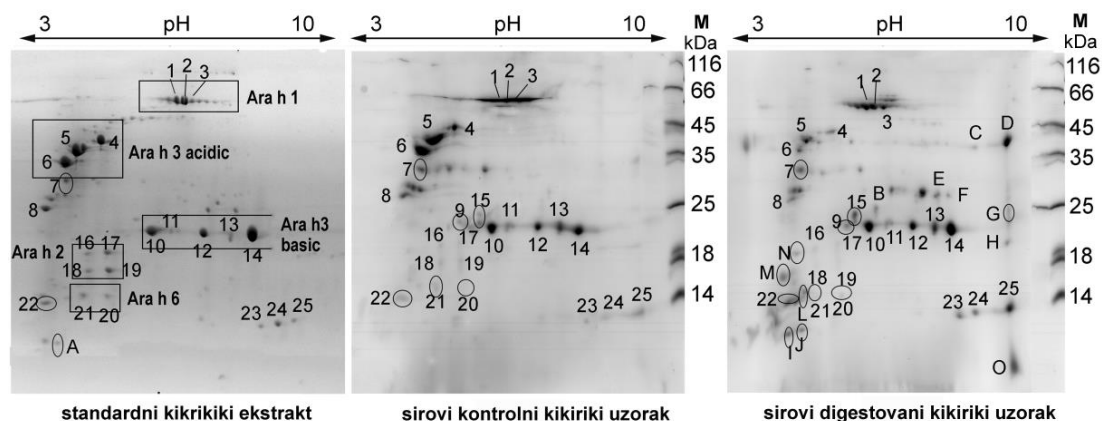


Slika 17 1D/2DSDS-PAGE profili polena trave *Phleum pratense*, sakupljenog sa ruralnog (P1) i industrijskog lokaliteta (P2), dobijeni od neodmašćenih ekstrakata polena. SDS PAGE je izvođen u redukujućim uslovima na 12% gelu. M - molekularni markeri. Preuzeto i modifikovano od Smiljanić i saradnika [138].

5.10. Ispitivanje digestibilnosti proteina kikirikija u simuliranim *in vitro* uslovima oralno-gastroične digestije na osnovu proteoma digestovanog sirovog zrna kikirikija

Sa ciljem dobijanja detaljnije slike o digestibilnosti proteina kikirikija i obrazce po kojima se proteoliza odvija, izdvojena rastvorna faza, dobijena nakon oralno-gastroične digestije sirovog kikirikija, je odmašćena precipitacijom proteina pomoću TCA/acetona i razdvojena na 2D PAGE. Proteinske tačke su analizirane i identifikovane sa visoko rezolutivnom tandemskom masenom spektrometrijom. Proteom digestovanog kikirikija je upoređen sa kontrolnim uzorcima (inkubiranim bez pepsina), kao i odmašćenim ekstraktom sirovog kikirikija, dobijenim primenom najčešće korišćenog protokola za izolovanje proteina kikirikija [63].

Identifikovani proteini dobijeni iz isečenih tačaka su dati u prilogu (Prilog Tabela 8.2), i odgovaraju oznakama na mapama koje su prikazane na Slici 18. Elektroforetski profil kontrolnog kikiriki uzorka (Slika 18, u sredini) je sličan onom koji je dobijen iz standardnog kikiriki ekstrakta (Slika 18, levo). Glavna razlika između kontrolnog i digestovanog kikiriki uzorka je u količini kisele subjedinice Ara h 3, obzirom da je kiselna subjedinica Ara h 3 znatno manje zastupljena u digestovanom uzorku (tačke 4 - 6 Slika 18). Razlog je najverovatnije proteolitičko delovanje pepsina. Takođe, uočeno je i nakupljanje fragmenata proteina u kiselom regionu, manjim od 14 kDa (tačke 22, i J i neoznačena tačka). Tačke u baznom regionu na gelu D, G, H i O, predstavljaju proteolitičke fragmente koji su isključivo prisutni samo u digestovanom kikiriki uzorku (Slika 18).

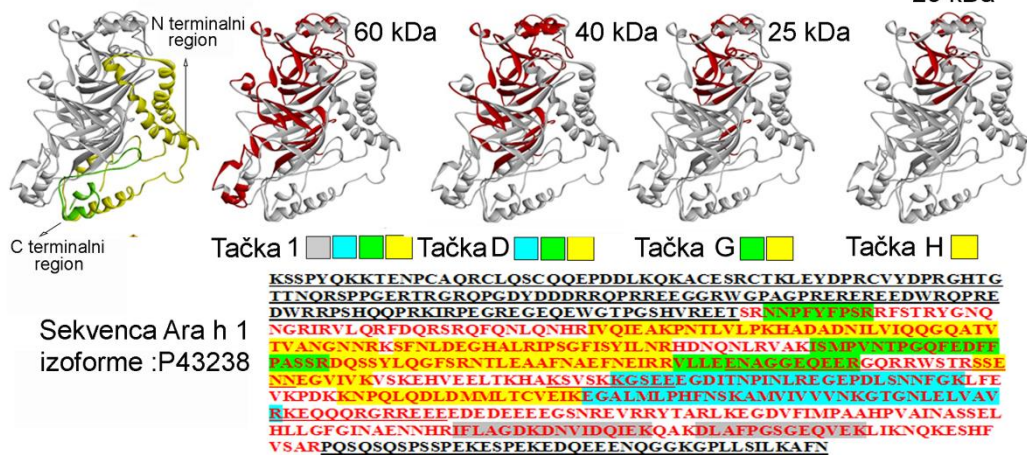


Slika 18 2D SDS-PAGE proteinski profili standardnog kikiriki ekstrakta, kontrolnog kikiriki uzorka i digestovanog kikiriki uzorka u redukujućim uslovima. Proteinske tačke obeležene brojevima su međusobno uparene, dok su neuparene obeležene velikim slovima; sve proteinske tačke su digestovane tripsinom pre MS/MS identifikacije; M - Molekularni markeri. Preuzeto i modifikovano od Prodić i saradnici [145].

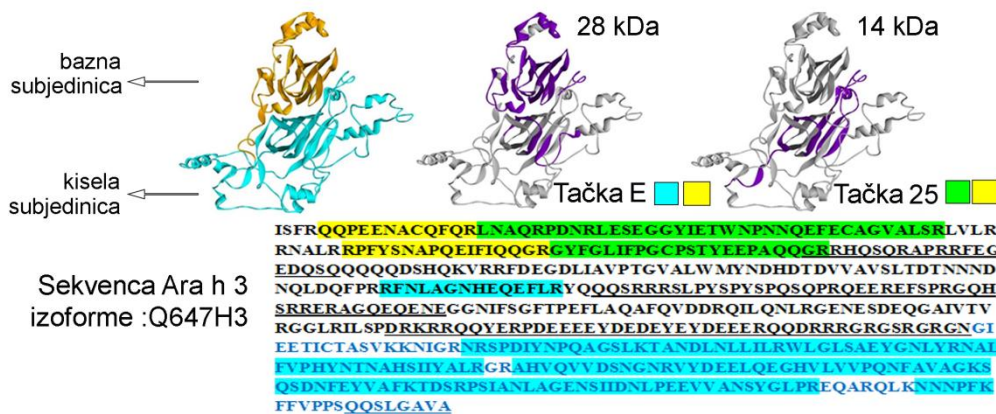
5.10.1 Kaskadni obrazac pepsinske proteolize alergena Ara h 1 i Ara h 3

Ustanovljen je i proteolitički obrazac digestovanja pepsinom za Ara h 1 i Ara h 3, zahvaljujući visokom sadržaju ovih proteina u kikiriki proteomu, na osnovu pokrivenosti peptidne sekvence za svaku izoformu u datoj tački (Prilog Tabela 8.2, Slika 19A i 19B).

A Ara h 1 **peptidna pokrivenost** sa 2D gela iz digestovanog uzorka 20 kDa



B Ara h 3 **peptidna pokrivenost** sa 2D gela iz digestovanog uzorka



Slika 19 Glavni fragmenti otporni na proteolizu proteina Ara h 1 i Ara h 3. A - 3D struktura Ara h 1; N-terminalni region je prikazan žutom bojom, C terminalni region je prikazan zelenom bojom, a deo koji se odnosi na jezgro proteina je prikazano sivom bojom. Glavni peptidi otporni na proteolizu Ara h 1 proteina nađeni u određenim 2D tačkama: tačka 1 (oko 60 kDa), tačka D (oko 40 kDa), tačka G (oko 25 kDa) i tačka H (oko 20 kDa). Peptidi su prikazani crvenom bojom. B - 3D struktura Ara h 3; bazna subjedinica je prikazana narandžastom, a kisela subjedinica plavom bojom. Glavni proteolitički otporni peptidi Ara h 3 proteina nađeni u određenim 2 D tačkama: tačka E (oko 30 kDa) i tačka 25 (oko 14 kDa). Peptidi su prikazani ljubičastom bojom. Kristalna struktura glavnih alergena kikirikija dobijena je iz proteinske banke podataka za Ara h 1 (PDB entry 3SMH) i Ara h 3 (PDB entry 3C3V). Preuzeto i modifikovano od Prodić i saradnici [145].

Sadržaj intaktnih proteina Ara h 1 i Ara h 3 na 65 kDa je sličan u sva tri preparata. Međutim u digestovanom kikiriki uzorku, izoforme Ara h 1 i Ara h 3 su pozicionirane na nižim molekulskim masama, otprilike oko 60 kDa (tačke 1-3, Slika 18), što ukazuje da su van-jezgarni pokretljivi N-terminalni i C-terminalni regioni Ara h 1 visoko podložni pepsinskoj proteolizi (Slika 19A). Ovaj fragment od 60 kDa (koji je zapravo gotovo intaktan Ara h 1) je dalje podložan pepsinskom skraćivanju sa C-terminalnog kraja, dovodeći do stvaranja intenzivne tačke D i blede tačke C, koje se nalaze na 40 kDa u digestovanom kikiriki uzorku (Slika 18 i 19A). Dalje digestija pepsinom sa C-terminalnog kraja u sredini prve petlje je dovela do stvaranja novih fragmenata (Slika 19A), koje su uočene u tački G (Slika 18). Pored toga, dodatno cepanje sa N-terminalnog i C-terminalnog kraja dovelo je do stvaranja fragmenta nađenog u tački H (Slika 19A). Tačke M i L u digestovanom kikiriki uzorku (Slika 18) sadrže peptide dobijene pepsinskom proteolizom sa C-terminalnog kraja Ara h 1 proteina. Intaktna kiselina Ara h 3 subjedinica je identifikovana u tački 5 (Slika 18) digestovanog kikiriki uzorka, i u poređenju sa kontrolnim kikiriki uzorkom, pokazala je znatno slabiji intenzitet, ukazujući na intenzivnu proteolizu pepsinom. Tačke E i F se pojavljuju samo u digestovanom kikiriki uzorku, i sadrže peptide iz kiselih i baznih subjedinica Ara h 3 (Slika 18 i 19B). U tačkama od 9 - 15 pronađene su različite intaktne izoforme ili samo malo skraćene bazne subjedinice Ara h 3, sa intenzitetima koji su vrlo slični intenzitetima pronađenim u kontrolnom uzorku. Ovi rezultati upućuju na zaključak da je bazna subjedinica znatno otpornija na pepsinsku proteolizu, u odnosu na kiselinu subjedinicu Ara h 3 proteina. U tačkama N i M (pronađene isključivo u digestovanom kikiriki uzorku; Slika 18), detektovani su peptidi koji potiču od od bazne subjedinice Ara h 3, a koji su kiselog karaktera zbog N-terminalne i C-terminalne proteolize fragmenata bogatih baznim reziduama. Nasuprot tome, tačke u baznom regionu (23 - 25; Slika 18), koje su najintenzivnije u digestovanom kikiriki uzorku, sadrže bazne peptide iz kisele subjedinice Ara h 3, zbog nedostatka kiselih ostataka na C-terminusu (Slika 19B). Pored najzastupljenijih alergena, u kontrolnom kikiriki uzorku je detektovan i Ara h 8 u tački 20, i Ara h 10 u tački 18 (Slika 18, Prilog Tabela 8.2), dok su ovi proteini u digestovanom kikiriki uzorku bili odsutni.

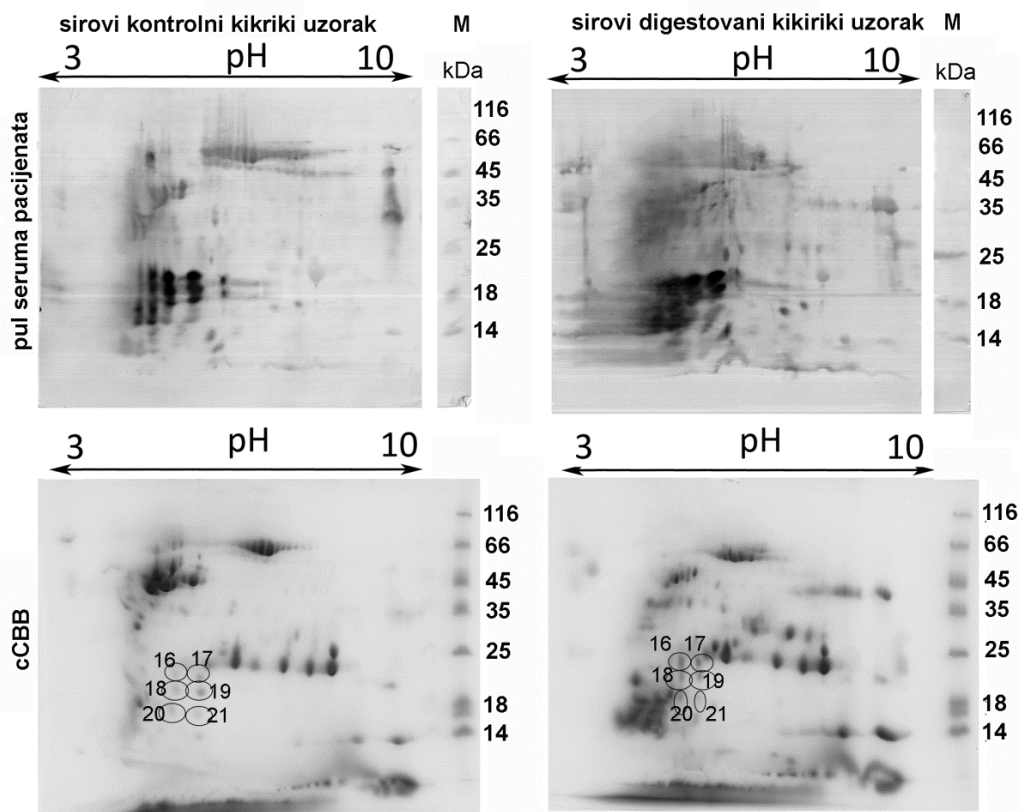
5.10.2 Ara h 2 i Ara h 6 ostaju skoro intaktni u toku pepsinske digestije

Intaktni Ara h 2 i Ara h 6 su identifikovani u sva tri uzorka, kako u standardnom kikiriki ekstraktu tako i u kontrolnom i digestovanom kikiriki uzorku (Slike 18 i 19, Prilog Tabela 8.2). Ara h 2 i Ara h 6 su isečeni sa gela kontrolnog i digestovanog kikiriki uzorka (Slika 20), i identifikovani masenom spektrometrijom. Tačke koje odgovaraju Ara h 2 i Ara h 6 dobijene sa gela kontrolnog i digestovanog uzorka, su znatno slabijeg intenziteta u poređenju sa standardnim kikiriki ekstraktom (Slika 18), najverovatnije usled nepovoljnijih uslova ekstrakcije za 2S albumine, obzirom da se ekstrakcija i digestija odigravaju na pH 3 [150].

5.11 IgE vezujuće sposobnosti digestovanog uzorka kikirikija

5.11.1 2D imunoblot kontrolnog i digestovanog kikiriki uzorka sa mešavina seruma pacijenata senzitivizovani na kikiriki

2D imunoblot razvijen sa serumima pacijenata alergičnih na kikiriki pokazao je za vezivanje IgE antitela za kontrolni i digestovani kikiriki uzorak. Imunoblot je prikazan na Slici 20, i međusobno upoređen. IgE-reaktivni obrazac seruma dobijen na elektroforetski razdvojene proteine kontrolnog i digestovanog kikiriki uzorka je prilično sličan. Uočena je dominantna reaktivnost Ara h 2 i Ara h 6, u oba uzorka. Dobijeni rezultat ukazuje da intaktni Ara h 2 i Ara h 6 najviše doprinose IgE reaktivnosti u frakciji u kojoj se nalaze veliki fragmenti otporni na proteolizu, nastali tokom gastričnog varenja kikirikija. Ovi rezultati potvrđuju da su Ara 2 i Ara h 6 glavni alergeni kikirikija [151].

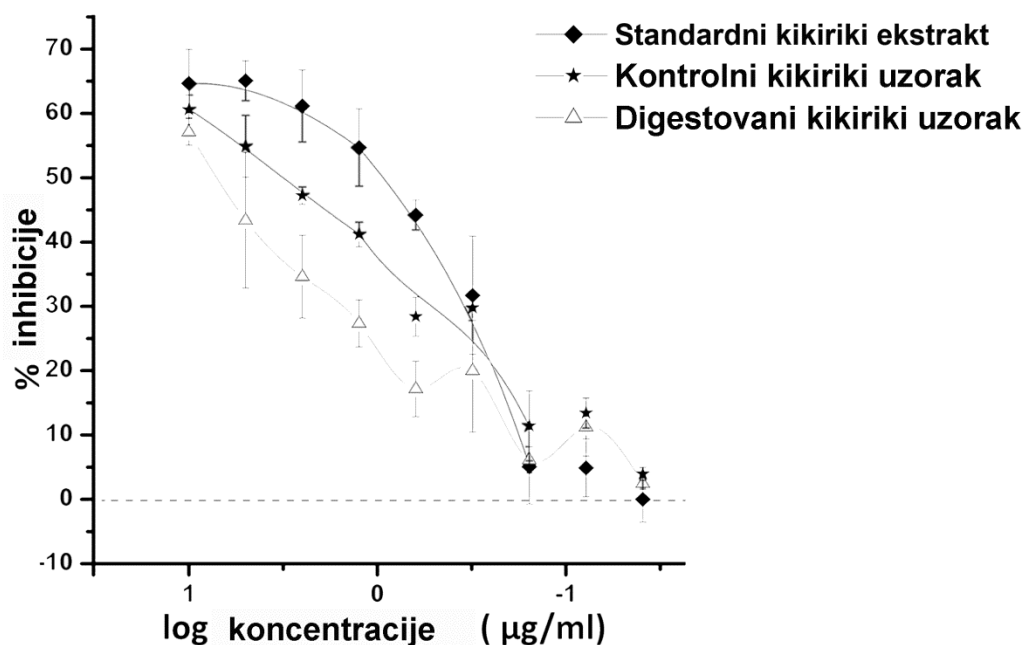


Slika 20 2D imunoblotovi kontrolnog i digestovanog kikiriki uzorka razvijeni sa mešavinom seruma pacijenata. M – molekularni markeri; 2D SDS-PAGE proteinski profil kontrolnog kikiriki uzorka i digestovanog kikiriki uzorka u redukujućim uslovima. cCBB – koloidna Coomassie Brilliant Blue boja. Sa gelova kontrolnog i digestovanog kikiriki uzorka, su isečene tačke 16 - 19 (uočene izoforme Ara h 2), i zajedno sa tačkama 20 - 21 (uočene izoforme Ara h 6), pripremljene za tandem masenu spektrometriju (“bottom up proteomics” pristup). Preuzeto i modifikovano od Prodić i saradnici [145].

5.11.2 Inhibitorni potencijal peptida otpornih na proteolizu

Inhibitornim ELISA testom se uporedio IgE vezujući potencijal proteina dobijenih iz kontrolnog i digestovanog sirovog kikiriki uzorka (Slika 21). Inhibitorna ELISA je rađena sa mešavinom seruma 10 pacijenata (Tabela 3). Kao referentni materijal, korišćen je standardni kikiriki ekstrakt. IC₅₀ vrednost za standardni kikiriki ekstrakt iznosio je 1.68 µg/mL, za kontrolni kikiriki uzorak 3.29 µg/mL, i za digestovani kikiriki uzorak 9.61 µg/mL. Uzak opseg za IC₅₀ vrednosti (samo 3 puta manja razlika) između

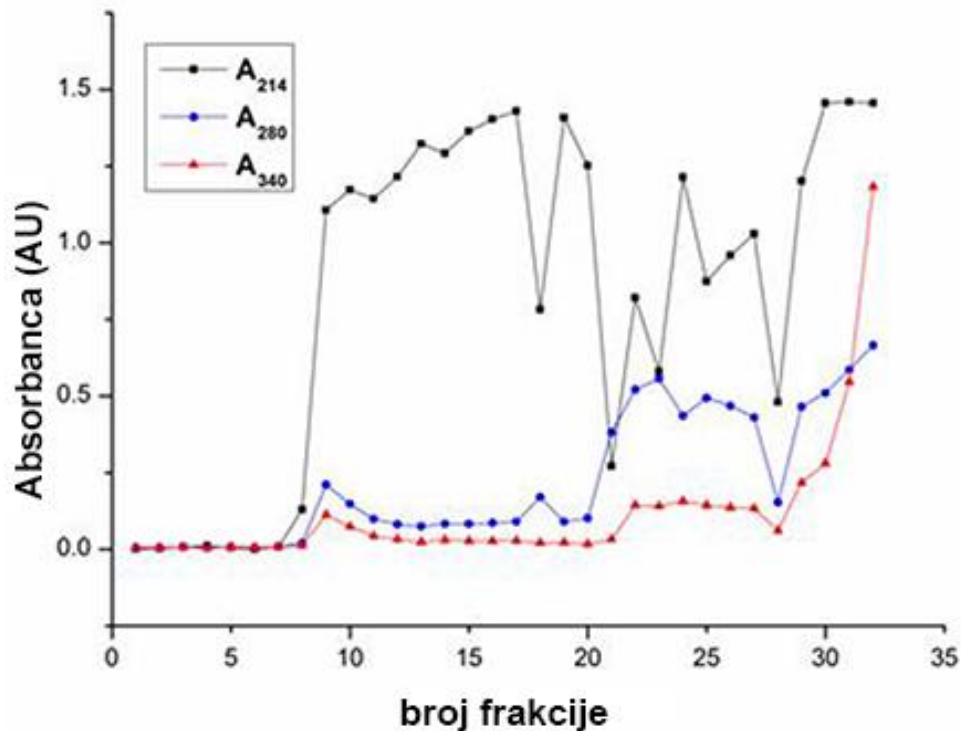
kontrolnog i digestovanog kikiriki uzorka, ukazuje na visoku sličnost u IgE veziujućem potencijalu ovih uzoraka.



Slika 21 ELISA inhibicija: IgE vezivanje iz mešavine seruma pacijenata osetljivih na standardni kikiriki ekstrakt. Standardni kikiriki ekstrakt je povezan za pločicu. Inhibitori: standardni kikiriki ekstrakt, kontrolni i digestovani uzorak sirovog kikirikija. Preuzeto i modifikovano od Prodić i saradnici [145].

5.11.3 Mali peptidi otporni na proteolizu (MPOP) dobijeni *in vitro* oralno-gastrointestinalnom digestijom kikirikija doprinose IgE reaktivnosti

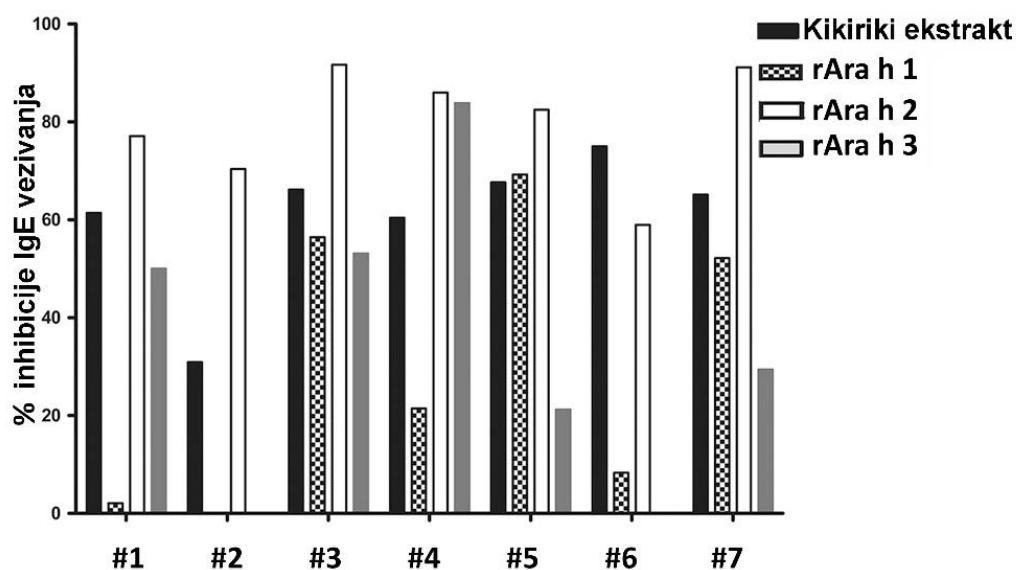
Da bi se dobile dodatne informacije o prisustvu MPOP (<10 kDa) i njihovoj IgE reaktivnosti, intaktni proteini i veliki proteolitički fragmenti su uklonjeni etanolnim taloženjem. MPOP su ostali u supernatantu su koncentrovani, a nakon toga prečišćeni gel filtracijom (Slika 22). Frakcije sa najvišim vrednostima absorbance na 214 nm i najmanjim vrednostima absorbance na 280 nm su skupljene i spojene (frakcije od 8 - 20; Slika 22), i za taj skup frakcija je smatran najbogatijim sa MPOP.



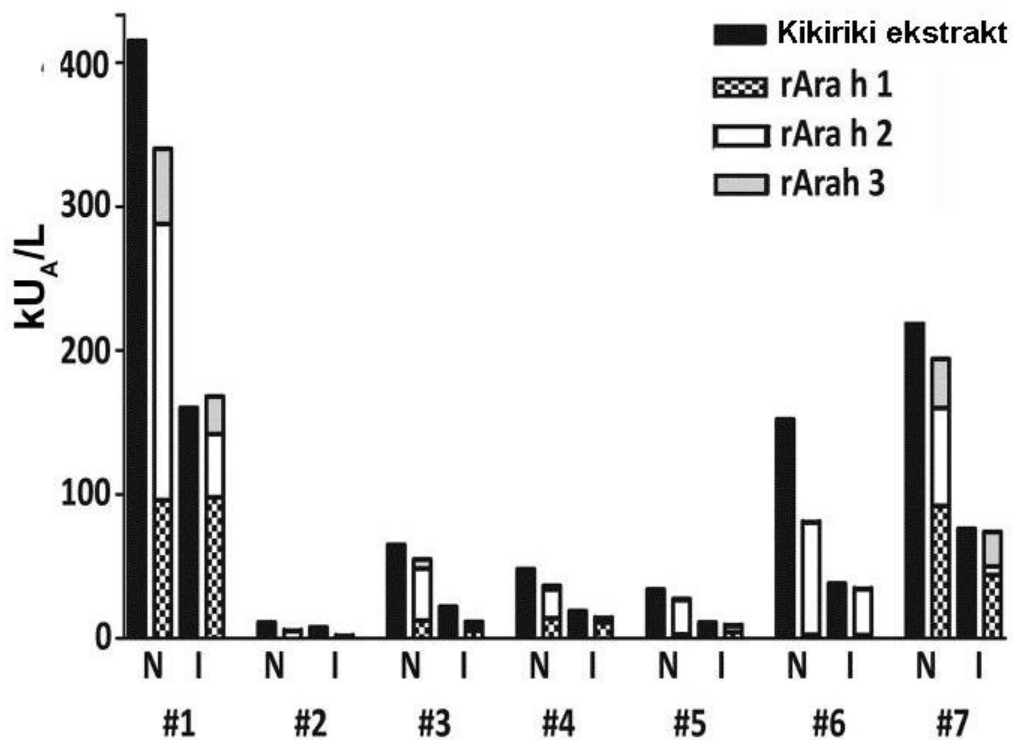
Slika 22 MPOP dobijeni gel filtracijom nakon *in vitro* oralno-gastroične faze digestije celog zrna sirovog kikirikija. Nakon digestije, tečna faza je pricipitirana sa etanolom, a potom dobijeni supernatant je nanešen na Sephadex G-25 kolonu (20 ml matriksa; veličina kolone 0.8x40cm). Frakcije su skupljane redom, a potom na osnovu hromatograma frakcije od 8-20 spojene. Preuzeto i modifikovano od Prodić i saradnici [145].

Sposobnost malih proteolitički otpornih peptida dobijenih iz digestovanog uzorka sirovog kikirikija da blokiraju IgE vezivanje je određena na ImmunoCAP® sistemu. Serum pacijenta alergičnih na kikiriki (200 µL, pacijenti #1-7 u Tabeli 4) su pre-inkubirani sa istom zapreminom MPOP (200 µL) pre merenja nivoa specifičnog IgE na totalne protein kikirikija (f13), Ara h 1 (f422), Ara h 2 (f423) and Ara h 3 (f424). Šest od sedam pacijenata je reagovalo na Ara h 1 (Slika 21). MPOP inhibiraju vezivanje IgE za Ara h 1 u tri seruma od svih sedam testiranih pacijenata (sa više od 10% IgE inhibicije). Kod svih pacijenata čiji su serumi reagovali na Ara h 3, inhibicija IgE vezivanja za Ara h 3 je postignuta sa MPOP iz digestovanog uzorka kikirikija do nivoa od 20 - 85%. Međutim, najveći procenat inhibicije je ostvario Ara h 2, gde se procenat inhibicije kretao između 64% do 90% (Slike 23 i 24), ukazujući na prisustvo izuzetno

potentnih funkcionalnih Ara h 2 epitopa u frakciji gde su bili prisutni MPOP. Peptidi su identifikovani masenom spektrometrijom (Prilog Tabela 8.3 i 8.4).

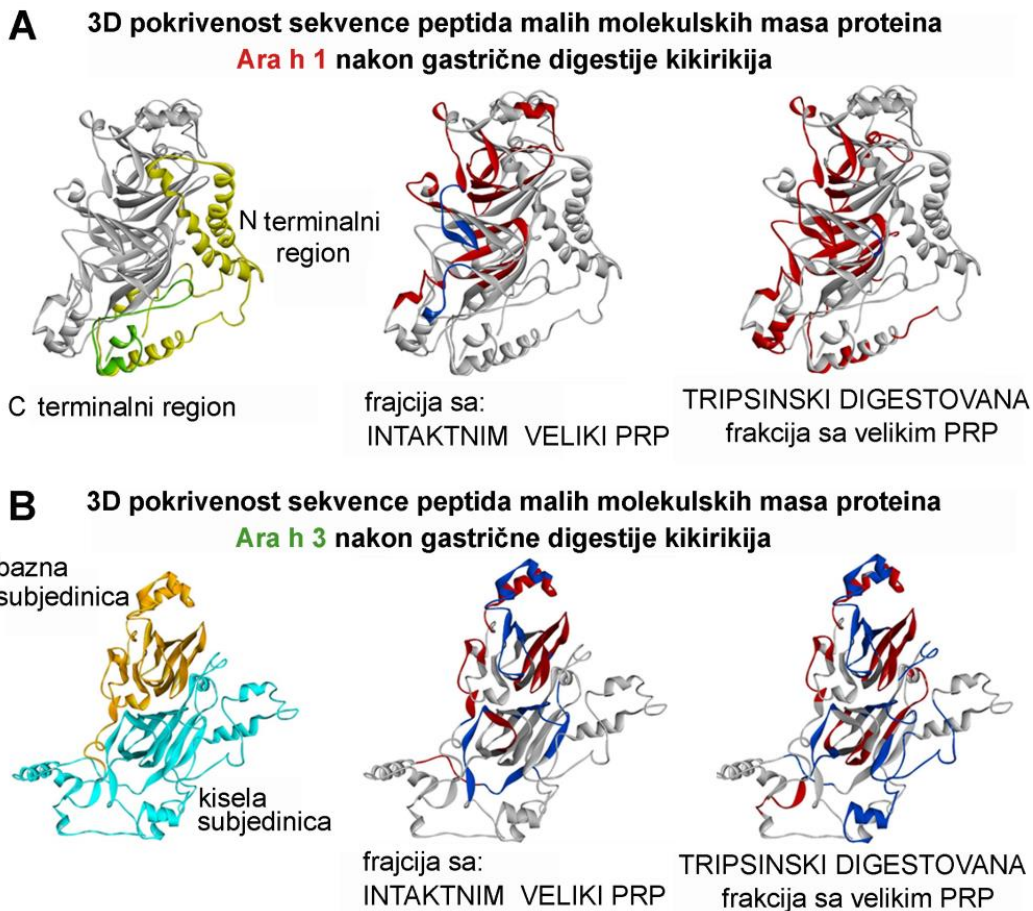


Slika 23 ImmunoCAP inhibicija na čvrstoj podlozi na kojoj su povezani MPOP dobijenih nakon digestije celog zrna sirovog kikirikija. Na x-osi broj pacijenta, čiji su podaci prikazani u Tabeli 3. Preuzeto i modifikovano od Prodić i saradnici [145].



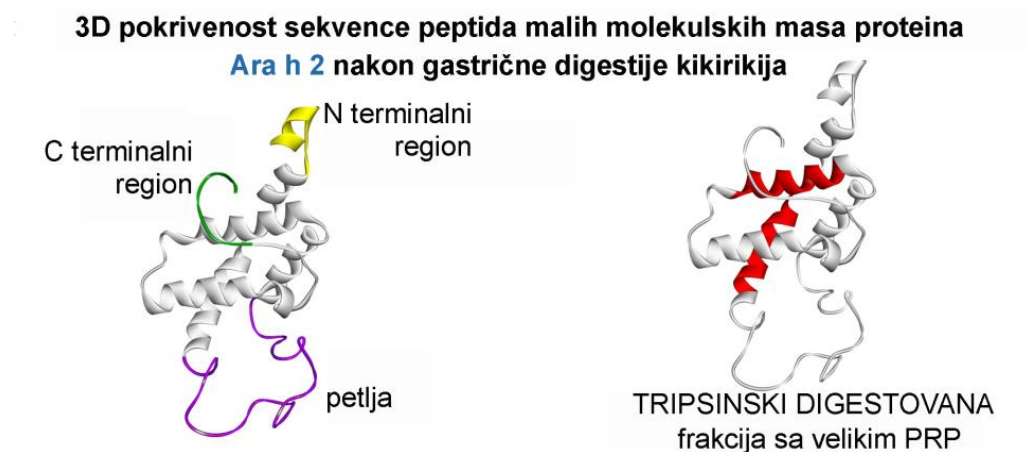
Slika 24 Apsolutne vrednosti ImmunoCAP metode za IgE vezivanje celog zrna kikirikija, rAra h 1, rAra h 2 i rAra h 3. Inhibitor: mali peptidi otporni na proteolizu (MPOP) dobijeni nakon digestije celog zrna sirovog kikirikija. Preuzeto i modifikovano od Prodić i saradnici [145].

Takođe, pretražena je IEDB baza podataka za linearne epitope prepoznate za *Homo sapiens* kao domaćina, sa ciljem da se upare dobijeni mali peptidi otporni na proteolizu dobijeni nakon oralno-gastroične digestije kikirikija (Prilog Tabela 8.3 i 8.4). Masenom spektrometrijom pretraživani intaktni pepsinski peptidi, identifikovano je 27 peptida za Ara h 1 i 18 peptida za Ara h 3, koji predstavljaju deo linearne sekvence epitopa (Slika 25A i 25B, Prilog Tabela 8.2).



Slika 25. Regioni sa identifikovanim peptidima Ara h 1 i Ara h 3 dobijenih iz MPOP frakcije nakon digestije celog zrna kikirikija. A - 3D struktura Ara h 1; B - 3D struktura Ara h 3. Preuzeto i modifikovano od Prodić i saradnici [145].

Takođe, detektovana su 2 peptida koja ne predstavljaju epitope, a pripadaju Ara h 8 (Prilog Tabela 8.3). Kada su MPOP analizirani nakon ekstenzivne redukcije, alkilacije i tripsinske digestije, pronađena su 2 peptida koja pripadaju Ara h 2, a oba su delovi linearnih epitopa (Slika 26, Prilog Tabela 8.3), uključujući dodatne peptide koji potiču od Ara h 1 i Ara h 3 (Slika 25, Prilog Tabela 8.3).



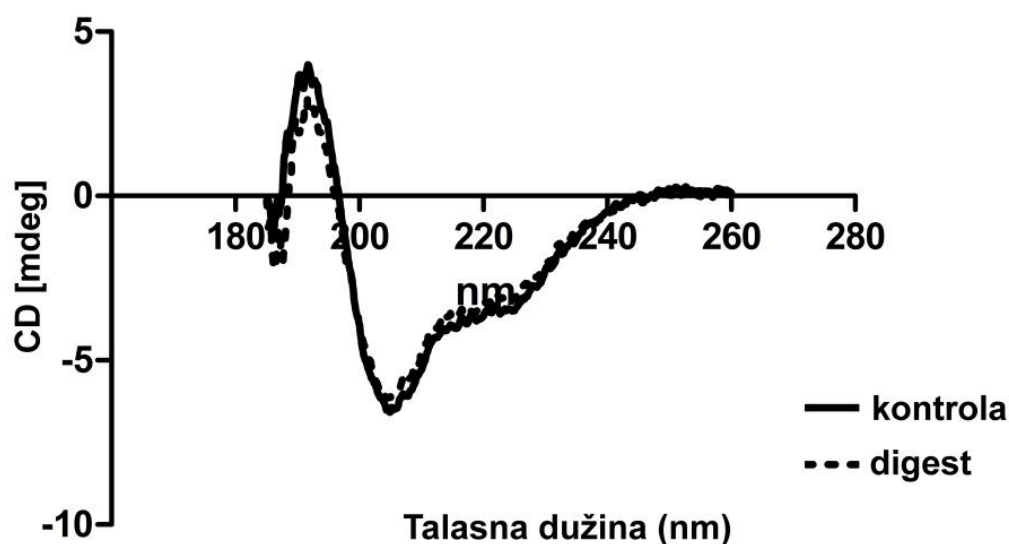
Slika 24. 3D struktura Ara h 2; Regioni sa identifikovanim peptidima Ara h 2 proteina dobijenih iz MPOP frakcije nakon digestije celog zrna kikirikija. Preuzeto i modifikovano od Prodić i saradnici [145].

Finalno, digest je obuhvatio 67 peptida koji pripadaju Ara h 3 (30 peptida su deo linearne sekvence epitopa) i 31 peptid iz Ara h 1 alergena (28 su deo linearne sekvence epitopa). Detektovani su i peptidi iz Ara h 9, Ara h 11 i Ara h 13, koji potiču od dela sekvence koja ne nosi epitope. Svi ovi MPOP su identifikovani u frakciji kikiriki digesta solubilnoj u etanolu. Obzirom da su ovi peptidi manji od 10 kDa, uglavnom nisu bili identifikovani nisko rezolutivnim analitičkim metodama. Mada u literaturi nema puno podataka koji omogućavaju tačnu identifikaciju konformacionih epitopa za alergene kikirikija, identifikovani MPOP sadrže mnogo amino kiselinskih ostataka koji čine konformacione epitope Ara h 1 alergena [152], kao i aminokiselinske ostatke koji su deo konsenzus amino kiselinskog obrasca konformacionih epitopa alergena Ara h 2 i Ara h 6 [153] (Slika 26).

5.12 CD spektrometrija proteina kikirikija digestovanih u simuliranim *in vitro* uslovima oralno-gastrične digestije

Obzirom da je IgE vezujući potencijal digestovanog kikiriki uzorka uglavnom sačuvan, spektri daleke ultra-ljubičaste oblasti za kontrolni i digestovani kikiriki uzorak su snimljeni sa ciljem da se uporede elementi sekundarne strukture (Slika 27). CD spektar kontrolnog kikiriki uzorka je pokazao pravilno uvijenu formu proteina, pri čemu CD signal najverovatnije potiče od dominantnih proteina Ara h 1 i Ara h 3. U

kvantitativnom smislu, proteini Ara h 1 i Ara h 3 iz digestovanog sirovog kikiriki uzorka su uglavnom proteolizovani do fragmenata rezistentnih na digestiju velikih molekulskih masa (Slika 15), gde je proteinsko jezgro sačuvano. CD spektar digestovanog kikiriki uzorka je pokazao preklapanje sa spektrom kontrolnog kikiriki uzorka, ukazujući na očuvanost uvijene proteinske strukture. Prisustvo enzima u toku digestije je prouzrokovalo zanemarljive promene u sekundarnim strukturama proteina kikirikija, ukazujući na nizak stepen proteolize, kao i na zadržavanje ispravno uvijene proteinske strukture.



Slika 27 CD spektri kontrolnog i digestovanog sirovog kikiriki uzorka. Preuzeto i modificovano od Prodić i saradnici [145].

6. Diskusija

U većini studija osnovni testovi digestibilnosti proteina i alergena hrane su izvođeni na prečišćenim alergenima, ne uzimajući u obzir ni efekat matriksa, što dodatno dovodi u zabludu istraživača šta se zapravo desilo sa nativnim proteinom [118]. Faktori kao što su vreme digestije, odnos između enzima i alergena, da li je alergen procesovan, kao i prisustvo matriksa hrane, mogu da imaju ogroman uticaj na ishod testa digestibilnosti [154].

Smanjenje rastvorljivosti i ekstrakcije proteina kod kivanog i pečenog kikirikija nakon dvočasovne simulirane gastrične inkubacije (kontrolni uzorci, Slika 7A), mogu se objasniti strukturnim promenama koje izaziva kuvanje i pečenje, poput agregacije, polimerizacije, oksidativnih i drugih modifikacija, fragmentacije, narušavanja tercijarne i sekundarne strukture proteina kikirikija, kao i dodatno smanjenje količine proteina usled oticanja proteina tokom kuvanja, koje je zavisno od dužine termičke obrade [111]. Trend da se proteini termički obrađenog kikirikija ekstrahuju sa zaostatkom u poređenju sa proteinima sirovog kikirikija, koji je ovde uočen, je takođe u saglasnosti sa publikacijom koju je objavio Schmitt sa saradnicima 2010. godine [4].

Rao sa saradnicima [17] je istraživao efekat kuvanja i pečenja na celo zrno kikirikija, u pogledu njegove ekstraktabilnosti, digestibilnosti i IgE vezujućih sposobnosti, i ukazao na probleme u ekstraktabilnosti koje potiču od agregacije kod termički tretiranog kikirikija. Generalno posmatrano, u pomenutoj studiji kuvani kikiriki je bio podložniji digestiji nego sirovi i pečeni, a i pokazao je manji imuni odgovor. Ara h 1 i kisela subjedinica Ara h 3 sirovog, kivanog i pečenog kikirikija su se vrlo brzo digestovali do manjih formi (55 kDa i 23 kDa), a masenom spektrometrijom u sirovom kikirikiju se detektovao stabilni fragment od 23 kDa koji pripada baznoj subjedinici Ara h 3 [17]. Ara h 2/6, kako u sirovom, tako i u termički tretiranom kikirikiju, su se pokazali slabo podložni pepsinskoj proteolizi, dok su mali peptidi (manji od 10 kDa) bili rezistentni na pepsinsku digestiju. U sirovom kikirikiju, fragmenti Ara h 1 i Ara h 2 su pokazivali IgE vezujuće sposobnosti, dok Ara h 3 ne.

Poput Rao i saradnika [17], i ova teza otkriva slojevitosti različitih fenomena koji se odvijaju prilikom termičke obrade praćene enzimskom proteolizom na fiziološkim

uslovima uz uticaj matriksa iz kikirikija. Smanjena proteinska koncentracija u kuvanom kikirikiju se može bar malim delom objasniti izlaskom proteina iz zrna u vodu tokom kuvanja [28, 32, 111]. Slični rezultati su dobijeni i u eksperimentima prikazanim u ovoj tezi, gde je 5 mg proteina iscurelo u 50 mL vode za vreme kuvanja (20 minuta) (Slika 13). Ovo predstavlja oko 2.6% maksimalne količine proteina koji se pri datim uslovima eksperimenta (inkubiranje smrvljenog kontrolnog uzorka gastrične faze) mogu ekstrahovati, a sve polazeći u računu od ukupnog mogućeg procentualnog udela proteina u zrnju kikirikija. Različiti uslovi ekstrakcije (neutralna pH, različiti puferi, produženo vreme kuvanja) u drugim studijama [28, 111], mogu objasniti povećani izlazak proteina iz zrna kikirikija od 4% [111] i 5.2% [28] tokom kuvanja, takođe sračunatih na osnovu maksimalne količine proteina koja se mogla ekstrahovati iz kuvanog kikirikija u datim eksperimentalnim uslovima pomenutih studija. S toga, efekti poput smanjenja koncentracije, kao i neki drugi koji će kasnije biti pomenuti, a u vezi uticaja kuvanja na ekstrakciju i digestiju proteina kikirikija, ne mogu biti objašnjeni samo na osnovu curenja proteina u vodu u kojoj se kuvao kikiriki, kao što je to pripisano u nekoliko studija [28, 29, 155], jer smo mi za sada jedini našli za shodno da ujednačimo kvantifikaciju ovog efekta po raznim studijama. Ovo uporište, da efekti poput smanjenog sadržaja nekih alergena ili pak smanjenja IgE reaktivnosti, ne mogu biti objašnjeni samo gubitkom proteina curenjem u vodu pri kuvanju, podržava i studija Tao i saradnika iz 2016. godine [111].

Smanjenje u proteinskoj koncentraciji u slučaju gastrično digestovanog pečenog kikiriki uzorka, je najverovatnije rezultat slabe rastvorljivosti zbog moguće agregacije proteina nastale pod uticajem Majarove reakcije u toku pečenja [30, 32].

Šta više, u ovoj tezi se promovise ideja da blago alkalni uslovi (koji oponašaju intestinalnu fazu) olakšavaju ekstrakciju proteina kikirikija, u poređenju sa kiselim uslovima koji se sreću u gastričnoj fazi. Ovaj fenomen može biti značajan u boljem razumevanju senzitivizujućeg potencijala prilikom objašnjavanja same alergnosti kikirikija. Na osnovu ispitivanja sprovedenih na životinjskim modelima, ograničena proteoliza proteina je presudna za alergnost [156]. Ovde smo primetili da termička obrada kikirikija povećava rastvorljivost/ekstrakciju velikih fragmenata i peptida otpornih na proteolizu u intestinalnoj fazi, gde se senzitivizacija odigrava uz pomoć

interakcija velikih proteinskih entiteta sa imunološkim sistemom. Generalno, trend proteinske ekstrakcije u kontrolnim uzorcima u svim termičkim preparatima se ponavlja i u digestovanim uzorcima svih tretmana (Slika 7). Sveobuhvatna efikasnost oralno-gastroične digestije, procenjena BCA testom i denzitometrijom (Slika 7A, Prilog Tabela 8.1) se kreće između 30-55% za sirovi i kuvani kikiriki, a za pečeni između 40-50%, u zavisnosti od pristupa prilikom procene koncentracije. Efikasnost oralno-gastroične digestije sirovog, kuvanog i pečenog kikirikija nije statistički značajna obzirom da su koncentracije značajno i manje-više podjednako umanjene (Slika 7A).

Međutim nakon završetka intestinalne faze digestije, značajne promene u efikasnosti same digestije su uočene; efikasnost digestije intestinalnim proteazama je značajnija u slučaju sirovog kikirikija, ako se poredi sa termički tretiranim kikirikijem. Takođe, ne treba izgubiti iz vida da je ekstrakcija proteina u termički tretiranim preparatima bila znatno veća nego u slučaju sirovog kikirikija, što je verovatno posledica prelaska u blago bazne uslove, gde nastupa zakasnela povećana ekstrakcija. Doduše, kao što je napomenuto, ekstrakcija je bila povišena u termičkim tretmanima, a posebno kod pečenog kikirikija, što opet može biti posledica prisustva većeg broja glikacijskih adukata Majarove reakcije, koja povećava rastvorljivost proteinskih proizvoda. Konačno, efekat koji je uočen prilikom razlike u oralno-gastrointestinalnoj efikasnosti je značajan i govori u prilog otežane intestinalne digestije pri termičkoj obradi kikirikija, a posebno pečenog. U prilog ovome su i rezultati smanjenja procentualnih vrednosti razlike koncentracija među kontrolnim i intestinalno digestovanim uzorcima, od 49%, 18% i 16%, za sirovi, kuvani i pečeni kikiriki, tim redom, kao i apsolutne vrednosti njihove koncentracione razlike određene denzitometrijom: 8.5 mg/mL, 3.5 mg/mL i 3.7 mg/mL, za sirovi, kuvani i pečeni kikiriki, tim redom.

U neodmašćenim kontrolnim uzorcima oralno-gastroične digestije pečenog kikirikija, na SDS- PAG elektroforezi su uočeni oligomeri čija je molekulska masa veća od 100 kDa. Oligomeri su izraženi više u neredukujućim uslovima nego u redukujućim uslovima (Slika 8). Prema rezultatima, prisutnost ovih oligomera se smanjivala nakon uklanjanja lipida (Slike 9 i 10). Prisustvo oligomera nakon pečenja, sa odgovarajućom molekulsom masom je već uočeno i objašnjeno u radu koji je publikovala Maleki sa kolegama (2000) [30]. Obzirom da su oligomerne strukture uočene i u redukujućim i u

neredukujućim uslovima, pretpostavljamo da oligomeri koji su prisutni u kontrolnim uzorcima pečenog kikirikija potiču od kovalentnih modifikacija (kovalentno umrežavanje). Ovi oligomeri su podložni hidrolizi pepsinom, obzirom da gore pomenute trake nestaju iz digestovanih uzoraka u svim preparatima, načinima odmaščivanja i elektroforetskim uslovima (Slike 8-10).

Proteinska traka oko 65 kDa, koja odgovara Ara h 1, je vidljiva u kontrolnim uzorcima oralno-gastroične digestije sirovog, kuvanog i pečenog kikirikija, kako u redukujućim tako i u neredukujućim uslovima (Slika 10). Kao i drugi proteini kupinske familije, Ara h 1 je termostabilan i podleže ireverzibilnoj denaturaciji i ekstenzivnoj agregaciji nakon prolaska kroz endotermalnu tranziciju na temperaturi iznad 80 °C [73]. Za eksperimente prikazane u ovoj tezi kikiriki je pečen 20 minuta na 170 °C, što zapravo predstavlja produžen termički tretman. SDS PAGE analiza ukazuje da je Ara h 1 protein koji je najviše pogođen tretmanom pečenja (Slike 8-10). Sasvim je očekivano da termička obrada pečenja, ne samo da dovodi do agregacije Ara h 1, već postoji mogućnost da pojača IgE vezujuće sposobnosti ovog proteina, obzirom da kritična temperatura koja utiče na IgE vezujući kapacitet iznosi 140 °C, što je publikovano u radu Mondulet i saradnika [28].

Bazna subjedinica Ara h 3 (25 kDa) [11], je vidljiva u svim kontrolnim uzorcima sirovog, kuvanog i pečenog kikirikija. Međutim, pepsin je vrlo lako hidrolizuje obzirom da proteinske trake nedostaju u digestovanom uzorku (Slika 10). Vrlo lako se identifikuje kisela subjedinica Ara h 3 u kontrolnim uzorcima svih preparata kikirikija, obzirom da su predstavljeni kao brojne trake u regionu između 25-45 kDa (Slika 8- 10 i 15) [157]. U uzorcima dobijenim nakon oralno-gastroične/oralno-gastrointestinalne digestije, samo se jedna traka u tom region izdvaja (Slika 8-10 i 15). Sasvim je očigledno da termičko procesovanje utiče na pepsinsku rezistenciju kisele subjedinice Ara h 3, obzirom da je traka od 35 kDa vidljiva u digestu sirovog kikirikija, ali ne i u digestu kuvanog (Slika 10). Pečenje utiče na Ara h 3, po sličnom obrascu kao i na Ara h 1; agregati se formiraju i dolazi do povećane sposobnosti vezivanja IgE antitela [158].

Ara h 2 se primećuje na SDS-PAGE gelu kao dublet od 17-19 kDa [84], a na gelovima prikazanim u ovoj tezi se može uočiti u kontrolnim uzorcima oralno-gastroične/oralno-gastrointestinalne digestije kikirikija, bez obzira na prisustvo termičkih tretmana i

elektroforetskih uslova (redukujućih/neredukujućih) (Slika 10). Otuda, naša istraživanja podržavaju prethodno publikovanu činjenicu da su ovi proteini izuzetno termički stabilni. Međutim, smanjena prisutnost Ara h 2 je primećena u kuvanom kikiriki preparatu, što se može objasniti njegovim izlaskom iz matriksa u toku kuvanja [32]. Ovi rezultati su kompletno u skladu sa široko rasprostranjenim saznanjima o Ara h 6, kao ekstremno stabilnom i proteolitički rezistentnom proteinu, obzirom da je ovaj protein detektovan u svim kontrolnim i gastrično digestovanim uzorcima sirovog, kuvanog i pečenog kikirikija.

Konglutini kikirikija (Ara h 2 i Ara h 6) su rezistentni na proteolizu pepsina, ne samo zbog njihove globularne konzervirane strukture i velikog broja isprepletanih disulfidnih mostova, već i zbog zaštitnih sposobnosti matriksa kikirikija, koji je bogat mastima. Specifičnost njegovog matriksa dovodi do zakasnele ekstrakcije proteina, i omogućava konglutinima da se „sakriju“ od pepsina tokom gastrične digestije. Nasuprot gastričnoj, intestinalna digestija Ara h 2 i Ara h 6 pod uticajem pankreatina dovodi do degradacije ova dva proteina.

Takođe, upotreba gastrične lipaze u postavci novog *in vitro* INFOGEST 2.0 protokola, je preporučljiva kada se radi sa matriksima bogatim mastima [14]. Šta više, upotreba lipaze verovatno bi olakšala manipulaciju sa digestovanim uzorcima, obzirom da bi se koraci odmašćivanja možda mogli i izbeći.

Kada se hrana digestuje u simuliranim oralno-gastričnim i oralno-gastrointestinalnim uslovima, a zatim se digesti temeljno odmaste pre aplikacije na SDS-PAGE analizu, mora se imati u vidu da će se određeni broj intaktnih proteina, kao i velikih i malih peptida izgubiti prilikom rada. Postoji i mogućnost da različite metode odmašćivanja digesta uzrokuju neželjeni diverzitet rezultata među istraživačkim grupama koje se bave digestijom kikirikija na osnovu INFOGEST protokola [16, 17, 145]. Ova teza pokazuje da su se reproduktivniji rezultati dobijali sa TCA/acetom metodom, u odnosu na odmašćivanje n-heksanom, ali dalja optimizacija analitičkih metoda poput IEF na lešniku (a i preko pozitivne kontrole, neodmašćenog polena) je dovela da se metoda prilagodi uzorku. Mi ovde predlažemo, na osnovu naših rezultata optimizacije „downstream“ tehnika analize, da se uzorak uopšte ne odmašćuje, osim u slučaju kada je količina lipida toliko velika, da je nemoguće primeniti IEF metodu. Stoga, preporuka

je da se za optimizovane elektroforetske protokole primenjuje neodmašćen uzorak, naročito ukoliko se za cilj ima istraživanje i malih i velikih peptidnih fragmenata.

U ovoj studiji, identifikovane su strukturne karakteristike i procenjena je IgE reaktivnost pepsinski rezistentnih alergena celog zrna kikirikija. Nakon *in vitro* pepsinske digestije celog zrna kikirikija, dobijeni su veliki i mali peptidi otporni na proteolizu, na osnovu statičkog protokola za digestiju, koji oponaša fiziološki relevantne uslove [15]. Pokazano je prisustvo intaktnih Ara h 2 i Ara h 6, uključujući i malu količinu prisutnih intaktnih Ara h 1 i Ara h 3 u gastričnom digestu. U gastričnom digestu pokazani su veliki peptidi otporni na proteolizu, Ara h 1 i Ara h 3 (Slika 19), kao i smeša MPOP, uglavnom poreklom od Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 (Slika 25 i 26), a u manjoj meri od Ara h 8, Ara h 9, Ara h 11 i Ara h 13. Dodatno je pokazano, da nakon pepsinske digestije, IgE reaktivnost 2S albumina biva kompletno očuvana, zbog prisustva intaktnih proteina (2S albumina) i zbog očuvanja IgE epitopa u MPOP.

Identifikacija peptida rezistentnih na *in vitro* digestiju je važan faktor u proceni alergnosti proteina hrane. Kao imunološki aktivni, peptidi otporni na proteolizu u intestinalnom lumenu mogu da izazovu imuni odgovor osetljivih pojedinaca. U ranijim studijama, alergeni kikirikija su detektovani u humanom mleku, ukazujući da proteolitički otporni, imunoreaktivni fragmenti alergena kikirikija mogu da dospeju u krvotok [159]. Skorašnje studije su pokazale prisustvo IgE reaktivnih peptida nakon oralno-gastrične/oralno-gastrointestinalne digestije, kao i nakon digestije proteazama trepljastog epitela tankog creva, celog zrna kikirikija [16].

In vitro testovi digestibilnosti, rađeni sa prečišćenim proteinima kikirikija, pokazuju znatno veću digestibilnost proteina, nego kad se rade u tipično fiziološkim uslovima sa kompletnim matriksom hrane. Dodatno, dobro je poznato da čisti proteini u rastvoru mogu da se različito ponašaju u toku proteolize, u poređenju sa proteinima koji su absorbovani na međusloju ulje-voda, usled promene u proteinskoj strukturi [159, 160]. Stoga, proteini koji su označeni kao visoko digestibilni na osnovu *in vitro* simulirane digestije u prečišćenoj formi mogu da budu znatno otporniji na proteolizu unutar kompleksnog matriksa u kome se nalaze. Ara h 1 i kisela subjedinica Ara h 3 su se pokazali kao najpodložniji pepsinskoj proteolizi, što je u saglasnosti sa Vieths i saradnicima [12]. 2D Tandemska masena spektrometrija visoke rezolucije nadovezana

na SDS PAGE je pokazala pepsinski rezistentnu Ara h 1 formu u tačkama D, G, H i M (Slika 18), koje odgovaraju formama nastalim od prečišćenog Ara h 1 nakon 0.25 minuta pepsinske proteolize, nađenim u studije koju je objavio Koppelman i saradnici [11]. Slično tome, uočeno je i da pepsinski otporna Ara h 3 forma, detektovana u tačkama 9-15, 23-25, N, M i O (Slika 18), odgovara formama prečišćenog proteina Ara h 3 iz iste studije. Stoga, u prisustvu matriksa hrane, za slične proteolitički rezistentne forme Ara h 1 i Ara h 3 je pokazano da su stabilne celih 120 minuta u uslovima gastrične digestije, omogućavajući grubu procenu da su Ara 1 i Ara h 3 oko 500 puta manje podložni pepsinskoj digestiji iz celog zrna kikirikija nego u prečišćenoj formi[145].

DiStasio i saradnici [16] su pokazali da je nakon oralno-gastrointestinalne digestije Ara h 1 kompletno digestovan, ali u ovom slučaju nisu detektovani peptidi veći od 6 kDa. Veći deo proteina Ara h 1 je proteolizovan do velikog proteolitički rezistentnog fragmenta od 60 kDa. Jedna polovina ovog fragmenta je ostala takva, dok se na drugoj polovini fragmenata od 60 kDa dalje nastavila digestija, dajući kaskadni obrazac po kome se Ara h 1 pepsinski digestuje (Slika 19A). Stoga, oko polovina inicijalne količine digestiono-rezistentnog jezgra Ara h 1 veličine od 60 kDa, pre proteolize u intestinalnoj fazi, može da prođe intestinalnu mukozu, gde konzervirani epitopi izazovu imunoreakciju. Nasuprot kiseloj subjedinici, bazna subjedinica Ara h 3 je znatno otpornija na pepsinsku digestiju. Kisela subjedinica potiče sa N-terminalnog domena proteina, dok je bazna subjedinica nastala od N-terminalnog domena. N-terminalni domen sadrži tri duga regiona neuređenih struktura (G119-Q138 i Q212-G259, i D311-N345, Slika 19B), koji čine ukupno jednu trećinu N-terminalnog domena, dok C-terminalni domen sadrži samo jedan kratak neuređeni region na kraju sekvence (S522-A530, Slika 19B), zauzimajući manje od 2% C-terminalnog domena [89]. To objašnjava zašto je kisela subjedinica znatno podložnija pepsinskoj proteolizi nego kompaktnija bazna subjedinica. Takođe to može da bude i objašnjenje zašto je Ara h 3 prirodno procesovan i rezultira većom raznolikošću u masama izoformi koje potiču od kisele subjedinice (13-45 kDa), u poređenju sa baznom subjedinicom (koja je oko 23 kDa).

CD spektrometrija pokazuje skoro kompletno očuvano strukturno jezgro ova dva alergena, i ovo objašnjava sličnost u sekundarnim strukturama digestovanog i nedigestovanog uzorka.

U testovima IgE ELISA inhibicije, dobijene IC_{50} vrednosti koje su istog reda veličine za kontrolni i digestovani kikiriki uzorak, ukazuju da parcijalno digestovani alergeni kikirikija uglavnom zadržavaju svoj alergeni potencijal. Pepsinska proteoliza samo minimalno utiče na redukciju IgE vezujućeg potencijala proteina kikirikija koji su ekstrahovani u toku digestije. Ovi rezultati se slažu sa rezultatima prikazanim na 2D imunoblotovima. Slične rezultate za inhibiciju IgE vezivanja sirovog kikirikija je dobio i Rao sa saradnicima, ali je dodatno poredio inhibiciju IgE vezivanja i kuvanog i pečenog kikirikija, i ustanovio da je procenat inhibicije niži kod kuvanog [17]. Takođe su ispitane IgE reaktivne sposobnosti MPOP (<10 kDa) dobijenih iz oralno-gastrointestinalne faze digestije. Inhibicija alergena kikirikija na ImmunoCAP sistemu je pokazala da su MPOP 2S albumini znatno potentniji nego MPOP koji potiču od Ara h 1 i Ara h 3. Ove peptidne frakcije mogu da budu rezultat ekstenzivne proteolize alergena kikirikija, predstavljajući proteolitički rezistentne peptide najmanjih molekularnih masa, ili mogu biti fragmenti otkinuti sa većih peptida otpornih na proteolizu.

Ara h 1 i Ara h 3 su najzastupljeniji skladišni proteini kikirikija; međutim, pacijenti koji su alergični na kikiriki, najčešće i sa najvećim intenzitetom prepoznaju Ara h 2 i Ara h 6 [151] mada to varira globalno. Tako npr., na osnovu jedne studije [161] pojedinci osetljivi na kikiriki poreklom iz SAD imaju najveću učestalost senzitivizacije na rAra h 1, rAra h 2, i rAra h 3, kao i najveću količinu imunoglobulina E za rAra h 1 i rAra h 2. Razlika između pacijenata u SAD i Švedskoj u količini IgE u odnosu na rAra h 1, rAra h 2, rAra h 3 nije statistički značajna. Međutim, značajna razlika postoji između pacijenata iz Španije i pacijenata iz SAD i Švedske. Španski pacijenti su znatno ređe senzitivizovani na rAra h 1, rAra h 2, i rAra h 3, a nivoi IgE su znatno niži kod Španskih pacijenata nego kod Švedskih. IgE vezujuće sposobnosti Ara h 2 i Ara h 6 dominantno zavise od konformacionih epitopa [162, 163]. Najverovatnije je da CMCEALQQIMENQ, peptid koji je identifikovan u MPOP frakciji, pored toga što je deo linearnog epitopa Ara h 2 i Ara h 6, može da bude i deo potentnog konformacionog epitopa zahvaljujući disulfidnom umrežavanju. Schocker i saradnici [163] su istraživali

prisustvo Ara h 2 u humanom mleku, i pronašli 5 triptičnih fragmenata koji potiču od Ara h 2. Dva takva fragmenta (ANLRPCEQHLMQK i CMCEALQQIMENQSDR) su identična peptidima koji su identifikovani u MPOP frakciji oralno-gastrocnog uzorka ove studije. Ovi peptidi mogu da budu deo istog konformacionog epitopa u okviru kog se drže zajedno sa nekoliko disulfidnih mostova.

Rezultati ove studije ukazuju da, nakon oralno-gastrocne digestije celog zrna kikirikija, preživljavaju fragmenti velikih molekulskih masa rezistentnih na proteolizu, sa pripadaju proteinima Ara h 1, 2, 3 i 6, i imaju uglavnom zadržano strukturno jezgro. Takođe, mora se imati na umu i da se konformacioni epitopi alergena kikirikija (Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 i Ara h 6) zadržavaju. Sa druge strane, velika količina nastalih MPOP predstavljaju delove linearnih epitopa, sa zadržanim visokim alergenim potencijalom. Stoga, može se očekivati da *in vivo* uslovima ove reaktivne vrste postanu izložene intestinalnom imunom sistemu, i da bivaju transportovane kroz cirkulaciju. Povećana intestinalna permeabilnost (nastala pod uticajem različitih fizioloških i patoloških faktora), ili poremećaj uskih veza, može da omogući transport fragmenata proteina kikirikija preko intestinalnog epitela. Stoga, kod pojedinaca alergičnih na kikiriki, ovi fragmenti, i u intestinumu i u cirkulaciji, mogu da izazovu alergijsku reakciju. U intestinumu, ovi fragmenti mogu da dovedu do intestinalne anafilaksije preko ćelija zavisnih od mastocita IgE-FcεRI-IL-13 [164], kao i preko histamin zavisnih mezenteričnih limfnih čvorova i akumulacije dendritičnih ćelija u *lamina propria* [165].

7. Zaključci

U skladu sa postavljenim ciljevima i studijskim zadacima, formirani su sledeći zaključci:

1. Kada se uporedi *in vitro* digestibilnost glavnih alergena kikirikija u studijama koje su rađene na prečišćenim proteinima, sa rezultatima *in vitro* digestije pod istim uslovima sa realnim matriksom hrane, kao u ovoj tezi, zaključeno je da pepsinoliza proteina kikirikija iz celog zrna znatno umanjena (glavni alergeni Ara h 1 i 3 su zaštićeni i do 500 puta),
2. Odmašćivanje, kao korak za olakšavanje analiza nakon digestije kikirikija, rezultuje u velikom gubitku proteina iz ekstraktoma i digestoma, u ponekim slučajevima čak preko 70% od ukupne početne količine. Uspeli smo da optimizacijom analitičkih tehnika, poput izoelektričnog fokusiranja, izbegnemo odmašćivanje, čime smo bili u stanju da okarakterišemo relevantiji proteom na primeru polena i relevantiji ekstraktom i digestom na primeru lešnika.
3. Taloženje proteina sa TCA/acetonom, kao metoda odmašćivanja, se pokazalo kao bolje za proteine kikirikija, u poređenju sa odmašćivanjem n-heksanom, u smislu reproduktivnosti onog profila koji je dobijen sa neodmašćenim uzorcima, kao i zbog većeg prinosa, tj manjim gubicima u odnosu na n-heksan metodu (što ne znači da se bez provere ovo primenjuje za ostale tipove hrane).
4. Termički tretmani su smanjili oslobađanje proteina u kiseloj sredini kakva se nalazi u simuliranoj oralno-gastroičnoj tečnosti. Proteini kikirikija su formirali agregate nakon termičkih tretmana, stoga je njihovo oslobađanje dodatno bilo oslabljeno tokom gastrične faze.
5. Oslobađanje proteina kikirikija u oralno-gastrointestinalnoj fazi je imalo suprotan trend: generalno su se proteini kikirikija više oslobađali, ali i više digestovali. Najviše se se oslobodili proteini pečenog, potom kuvanog, a najmanje proteini sirovog kikirikija.

6. Digestija termički obrađenih kikiriki uzoraka u oralno-gastroičnoj fazi, u odnosu na sirovi kikiriki, je bila smanjena značajno, i to do istog nivoa kod kuvanog i pečenog kikirikija.
7. Najpotentniji alergeni kikirikija, Ara h 2 i Ara h 6, velikim delom ostaju netaknuti tokom oralno-gastroične faze.
8. Peptidi malih masa otpornih na proteolizu koji potiču od Ara h 2 su najpotentniji u IgE vezivanju, ukazujući da mali peptidi Ara h 2 alergena otporni na proteolizu sadrže potentan epitop koji je od velikog kliničkog značaja.
9. N- i C- terminalni delovi Ara h 1, kao i kisela sujednica Ara h 3, su najpodložniji pepsinskoj hidrolizi.
10. Ara h 1 protein se kaskadno digestuje do velikih peptida otpornih na proteolizu sa sačuvanim alergenim kapacitetom.

Sveukupno, glavni alergeni kikirikija i njihovi peptidi malih masa otpornih na proteolizu, igraju ključnu ulogu u alergijskim reakcijama na kikiriki. U poređenju sa studijama koje se bave *in vitro* digestijama prečišćenih proteina pod sličnim uslovima, uticaj matriksa na digestibilnost se pokazao kao izuzetno značajna stavka u otpornosti alergena ka oralno-gastroičnoj i oralno-gastrointestinalnoj digestiji.

8. Prilozi

Tabela 8.1 Uticaj odmašćivanja TCA/acetonom i n-heksanom na koncentraciju proteina u tečnoj fazi nakon oralno-gastroične i oralno-gastrointestinalne digestije (sa odgovarajućim kontrolama) celog zrna sirovog i termički procesovanog kikirikija. Određivanje je rađeno BCA metodom i denzitometrijski Image Quant 1D TL 8.1 softverom.

NON defatted PEANUT GASTRIC PHASE protein concentration by ImageQuant TL minimum profile													
name of GEL sample	Gastric (mg/ml)						Intestinal (mg/ml)						
	RAW		BOILED		ROASTED		RAW		BOILED		ROASTED		
	Ct	Dg	Ct	Dg	Ct	Dg	Ct	Dg	Ct	Dg	Ct	Dg	
FULL 1	11,4	5,1	6,8	3,2	12,8	7,6	N.D.						
FULL 2	11,1	4,9	7	3,5	13	7,8							
FULL 3	10	4,7	6,7	3,6	11,7	6,8							
FULL 4	9,2	4,6	6,6	2,2	9,8	6,6							
AVERAGE	10,4	4,8	6,8	3,1	11,8	7,2	% of digestion						
SD	1,0	0,2	0,2	0,6	1,5	0,6							
%	46	54	46	54	61	39							

NON defatted PEANUT GASTRIC PHASE protein concentration by BCA					
RAW		BOILED		ROASTED	
ct	dg	ct	dg	ct	dg
16,34	9,97	12,94	9,12	13,3	7,24
16,3	9,76	12,72	8,95	12,78	7,06
27,8	22,38			11	4,23
25,2	21			14,96	6,92
21,4	15,8	12,8	9,0	13,0	6,4
74	26	70	30	49	51

TCA/ACETONE defattening GASTRIC&INTESTINAL PEANUT EXTRACT protein concentration by ImageQuant TL minimum profile													
name of GEL sample	Gastric (mg/ml)						Intestinal (mg/ml)						
	RAW		BOILED		ROASTED		RAW		BOILED		ROASTED		
	Ct	Dg	Ct	Dg	Ct	Dg	Ct	Dg	Ct	Dg	Ct	Dg	
TCA1	2,46	1,48	0,58	0,8	1,09	0,87	0,73	1,11	0,36	0,57	0,88	1,06	
TCA2	1,99	1,46	0,79	1,01	1,47	1,18	0,45	0,48	0,26	0,41	0,36	0,55	
TCA3	2,72	1,6	2	1,08	2,28	2,07	N.D.						
TCA4	2,23	1,63	2,11	1,3	2,14	1,35							
AVERAGE	2,35	1,54	1,63	1,05	1,75	1,37	0,59	0,80	0,31	0,49	0,62	0,80	
SD	0,31	0,09	0,73	0,21	0,56	0,51	0,20	0,45	0,07	0,11	0,37	0,36	
%	66	34	64	36	78	22							

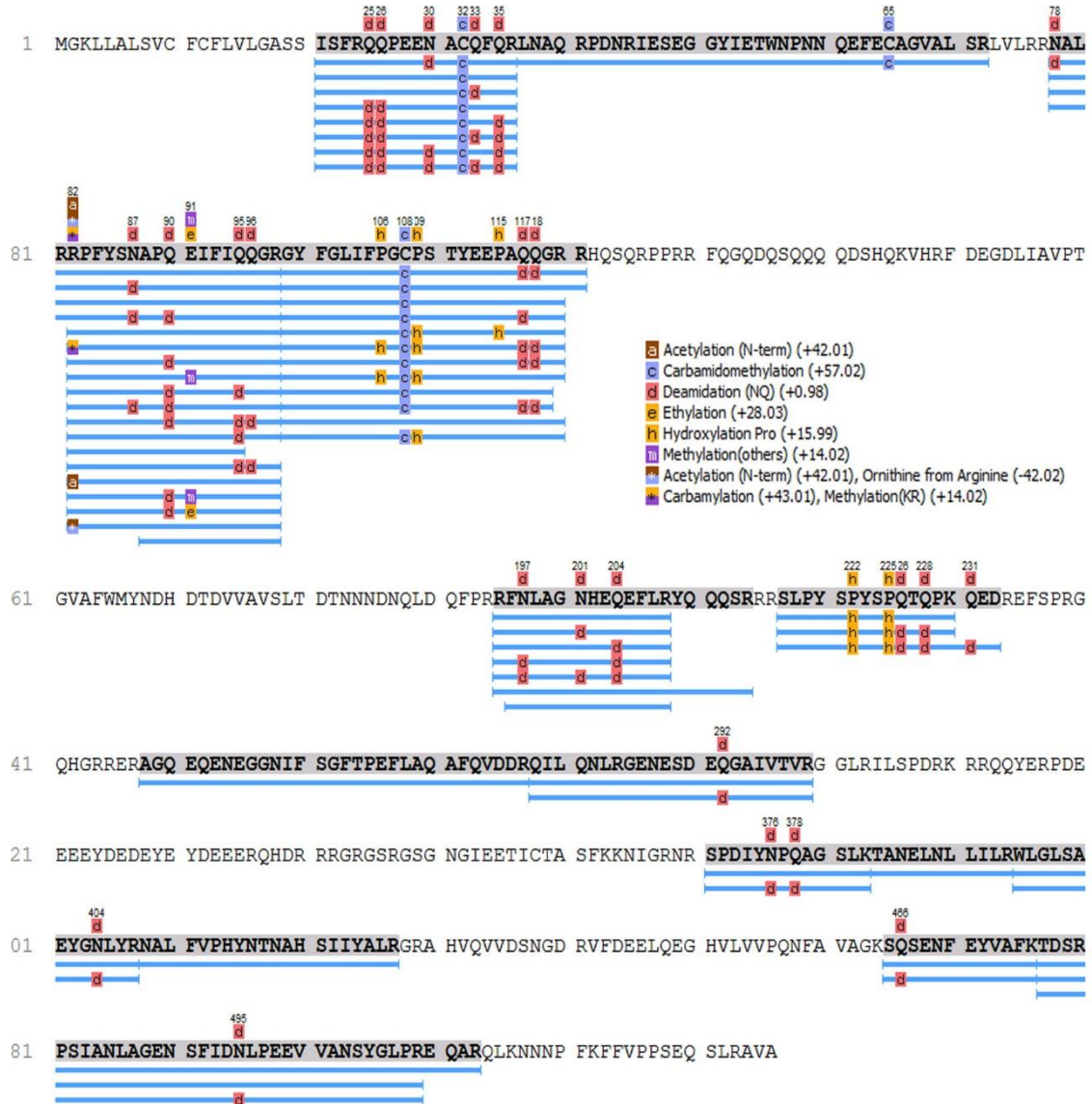
NON defatted PEANUT Gastrointestinal phase protein concn by BCA					
RAW		BOILED		ROASTED	
Control	Digest	Control	Digest	Control	Digest
17,34	8,08	18,56	15,1	22,92	19,48
17,3	9,5	19,9	16,32	24,74	20,74
17,3	8,8	19,2	15,7	23,8	20,1
51	49	82	18	84	16

TCA GASTROINTESTINAL PHASE (mg/ml) BCA					
	Control			Digest	
	RAW	BOIL	ROAST	5	5,2
RAW	4,56	9,06		5	5,2
BOIL	4,46	4,2		5,3	7,46
ROAST	6,3	6,1		6,96	7,12

n-HEXANE defattening protein concentration by ImageQuant TL minimum profile													
name of GEL sample	Gastric (mg/ml)						Intestinal (mg/ml)						
	RAW		BOILED		ROASTED		RAW		BOILED		ROASTED		
	Ct	Dg	Ct	Dg	Ct	Dg	Ct	Dg	Ct	Dg	Ct	Dg	
n-HEXANE 1	1,62	1,66	0,80	1,38	1,19	1,39	0,38	0,48	0,41	0,42	0,35	0,47	
n-HEXANE 2	1,29	1,50	0,83	0,78	1,03	1,16	0,39	0,40	0,40	0,33	0,43	0,35	
n-HEXANE 3	1,89	2,65	1,56	2,06	1,22	2,27	0,55	0,5	0,78	0,79	0,66	0,73	
n-HEXANE 4	1,85	2,7	1,45	1,98	1,16	2,28	0,51	0,5	0,78	0,76	0,62	0,7	
AVERAGE	1,66	2,13	1,16	1,55	1,15	1,78	0,46	0,47	0,59	0,66	0,52	0,56	
SD	0,28	0,64	0,40	0,60	0,08	0,58	0,09	0,05	0,22	0,21	0,15	0,18	

Slika 8.1 Reprezentativni primer kvalitativnog poređenja sadržaja post-translacionih modifikacija između kontrolnog i digestovanog uzorka sirovog kikirikija na primeru fragmenta Ara h 3 alergena iz trake 11 na Slici 16.

Q647H3_ARAHY fragment Ara h 3 alergena iz kontrolnog uzorka kikirikija



Q647H3_ARAHY fragment Ara h 3 alergena iz digestovanog uzorka sirovog kikirikija

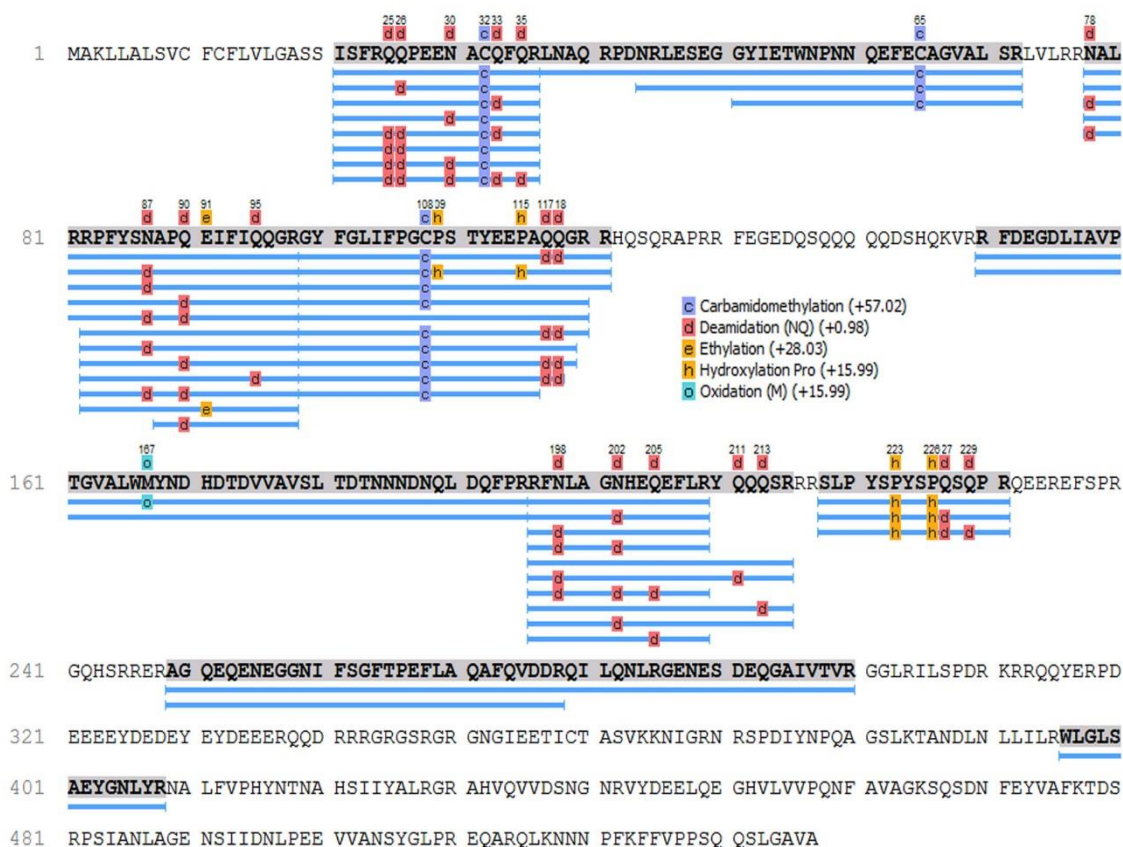


Tabela 8.2 Identifikacija proteina i njihovih fragmenata iz tačaka sa 2D SDS-PAGE standardnog ekstrakta kikirikija, kontrolnog i digestovanog sirovog kikirikija (tačke su obeležene na Slikama 18 i 20) pristupom tandem “bottom up” proteomike na Orbitrap LTQ hibridu, uz primenu PEAKS Suite 8.5 softvera

STANDARDNI EKSTRAKT SIROVOG KIKIRIKIJA– IDENTITET PROTEINA IZ TAČAKA OBELEŽENIH NA SLICI 18

# SPOT	Protein Group	Protein ID	Accession	Allergome	Description	Score (%)	Score (-10lgP)	Coverage (%)	Area under XIC	# Peptides	# Unique	# PSM	Avg. Mass (Da)
1	1	34	Q6PSU3 Q6PS	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS	99	169.82	14	7.72E+05	6	6	10	66575
	1	30	sp P43237 AL	Ara h 1	Allergen Ara h 1 clone P17	99	169.82	13	7.72E+05	6	6	10	70283
	1	31	B3IXL2 B3IXL	Ara h 1	Main allergen Ara h1 OS=A	99	169.82	13	7.72E+05	6	6	10	70283
2	1	31	B3IXL2 B3IXL	Ara h 1	Main allergen Ara h1 OS=A	99.1	171.66	14	8.16E+04	6	6	11	70283
	1	34	Q6PSU3 Q6PS	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS	99.1	171.66	15	8.16E+04	6	6	11	66575
	1	30	sp P43237 AL	Ara h 1	Allergen Ara h 1 clone P17	99.1	171.66	14	8.16E+04	6	6	11	70283
3	1	29	sp P43238 AL	Ara h 1	Allergen Ara h 1 clone P41	99.1	183.28	14	4.86E+05	7	7	14	71345
4	1	5	Q647H4 Q647	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis	99.1	177.17	20	3.98E+05	6	2	17	61506
	1	9	Q8LKN1 Q8LK	Ara h 3	Allergen Arah3/Arah4 OS=	99.1	177.17	20	3.98E+05	6	2	17	61738
	2	13	Q9FZ11 Q9FZ	Ara h 3	Gly1 OS=Arachis hypogaea	99	157.43	17	8.59E+05	5	1	14	60449
	2	7	B5TYU1 B5TY	Ara h 3	Arachin Arah3 isoform OS=	99	157.43	17	8.59E+05	5	1	14	60624
5	1	13	Q9FZ11 Q9FZ	Ara h 3	Gly1 OS=Arachis hypogaea	99.2	207.35	31	7.04E+06	12	4	83	60449
	2	3	Q647H3 Q647	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis	99.1	187.49	27	8.79E+05	10	2	74	61532
	4	1	A1DZF0 A1DZ	Ara h 3	Arachin 6 OS=Arachis hypc	99.1	185.76	24	1.52E+05	8	1	66	60375
	3	15	Q5I6T2 Q5I6T	Ara h 3	Arachin Ahy-4 OS=Arachis	99.1	182.47	27	4.73E+04	9	1	67	60736
6	1	24	Q6IWG5 Q6IW	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Ar	98.5	112.5	15	2.44E+06	4	3	10	58061
	1	26	Q0GM57 Q0GM	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hyp	98.5	112.5	15	2.44E+06	4	3	10	58263
	1	27	E5G077 E5G0	Ara h 3	Ara h 3 allergen OS=Arachi	98.5	112.5	15	2.44E+06	4	3	10	58305
7	spot not processed												
8	spot not processed												
9	spot not present/identified on the gel												
10	1	24	Q6IWG5 Q6IW	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Ar	99.2	232.01	31	3.96E+06	12	3	60	58061
	1	26	Q0GM57 Q0GM	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hyp	99.2	232.01	31	3.96E+06	12	3	60	58263
	2	27	E5G077 E5G0	Ara h 3	Ara h 3 allergen OS=Arachi	99.2	202.54	31	1.87E+05	9	1	39	58305
	4	1	A1DZF0 A1DZ	Ara h 3	Arachin 6 OS=Arachis hypc	98.8	148	9	2.44E+05	3	2	4	60375
	3	3	Q647H3 Q647	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis	98.7	113.06	9	6.89E+05	4	2	5	61532
11	spot not processed												
12	1	5	Q647H4 Q647	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis	99.2	259.77	30	2.72E+06	12	5	133	61506
	1	11	Q6T2T4 Q6T2	Ara h 3	Storage protein OS=Arachi	99.2	259.77	30	2.72E+06	12	5	133	61499
	3	3	Q647H3 Q647	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis	99.1	201.43	24	0.00E+00	7	1	58	61532
13	spot not processed												
14	1	15	Q647H3 Q647	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis	99.2	330.17	32	71800000	44	5	899	61532
	6	7	Q647H4 Q647	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis	99.2	316.97	30	8200000	40	5	755	61506
	6	12	Q6T2T4 Q6T2	Ara h 3	Storage protein OS=Arachi	99.2	316.97	30	8200000	40	5	755	61499
15	spot not present/identified on the gel												
16	8	17551	sp Q6PSU2 C	Ara h 2	Conglutin-7 OS=Arachis hy	92.6	100.56	23	2.10E+06	3	2	3	20114
	3	315	A0A0A6ZDT3	n/a	Serine hydroxymethyltrans	34.4	22.48	1	4.31E+05	1	1	1	51979
	3	323	A0A0A6ZDR9	n/a	Serine hydroxymethyltrans	34.4	22.48	1	4.31E+05	1	1	1	52010
17	8	17550	sp Q6PSU2-3	Ara h 2	Isoform 3 of Conglutin-7 C	92.6	140.56	23	4.10E+06	3	3	4	19795
	8	17551	sp Q6PSU2 C	Ara h 2	Conglutin-7 OS=Arachis hy	92.6	140.56	23	4.10E+06	3	3	4	20114
	20	9619	A0A0A1EUV7	n/a	Actin (Fragment) OS=Arach	69.8	53.04	6	1.56E+06	1	1	1	35884
	8	17548	sp Q6PSU2-4	Ara h 2	Isoform 4 of Conglutin-7 C	86	81.31	21	8.36E+05	2	2	4	18380
18	8	17549	sp Q6PSU2-2	Ara h 2	Isoform 2 of Conglutin-7 C	86	81.31	21	8.36E+05	2	2	4	18700
	8	17550	sp Q6PSU2-3	Ara h 2	Isoform 3 of Conglutin-7 C	85.7	81.31	19	8.36E+05	2	2	4	19795
	8	17551	sp Q6PSU2 C	Ara h 2	Conglutin-7 OS=Arachis hy	85.7	81.31	19	8.36E+05	2	2	4	20114
	15	1975	A0A0A6ZDP1	n/a	Glyceraldehyde-3-phosph	55.3	33.8	8	3.59E+02	1	1	2	20101
	15	1267	A0A0A6ZDT0	n/a	Glyceraldehyde-3-phosph	55.3	33.8	8	3.59E+02	1	1	2	20099
	8	17548	sp Q6PSU2-4	Ara h 2	Isoform 4 of Conglutin-7 C	86	81.31	21	8.36E+05	2	2	4	18380
	8	17549	sp Q6PSU2-2	Ara h 2	Isoform 2 of Conglutin-7 C	86	81.31	21	8.36E+05	2	2	4	18700
	19	6	269	E6Y6S5 E6Y6S	n/a	Acetyl-CoA carboxylase 4	86.7	34.93	0	2.70E+06	1	1	1
6	276	E6Y6S3 E6Y6S	n/a	Acetyl-CoA carboxylase 2	85.1	34.93	0	2.70E+06	1	1	1	251791	
6	143	E6Y6S2 E6Y6S	n/a	Acetyl-CoA carboxylase 1	70.6	34.93	0	2.70E+06	1	1	1	252204	
20	6	3728	A521R0 A521I	Ara h 6	Ara h 6 OS=Arachis hypoga	98.4	133.08	27	1.00E+07	3	3	24	16920
	6	3727	sp Q647G9 C	Ara h 6	Conglutin OS=Arachis hypc	98.4	133.08	27	1.00E+07	3	3	24	16920
	11	1	A1DZF0 A1DZ	Ara h 3	Arachin 6 OS=Arachis hypc	84.3	81.48	5	3.09E+04	2	2	2	60375
	11	17	Q9SQH7 Q9SQ	Ara h 3	Glycinin OS=Arachis hypog	84.3	81.48	5	3.09E+04	2	2	2	61011
	11	5	Q647H4 Q647	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis	84.3	81.48	5	3.09E+04	2	2	2	61506
	11	11	Q6T2T4 Q6T2	Ara h 3	Storage protein OS=Arachi	84.3	81.48	5	3.09E+04	2	2	2	61499
	11	9	Q8LKN1 Q8LK	Ara h 3	Allergen Arah3/Arah4 OS=	84.3	81.48	5	3.09E+04	2	2	2	61738

# SPOT	Protein Group	Protein ID	Accession	Allergome	Description	Score (%)	Score (-10lgP)	Coverage (%)	Area under XIC	# Peptides	# Unique	# PSM	Avg. Mass (Da)
21	1	3728	A5Z1R0 A5Z1	Ara h 6	Ara h 6 OS=Arachis hypoga	96.4	123.08	26	1.00E+07	3	3	23	16920
	1	3727	sp Q647G9 C	Ara h 6	Conglutin OS=Arachis hypoc	96.4	123.08	26	1.00E+07	3	3	23	16920
	6	99	E6Y6R4 E6Y6	n/a	Biotin carboxylase 1 OS=A	88.6	49.41	1	1.89E+06	1	1	4	58975
	6	101	E6Y6R6 E6Y6	n/a	Biotin carboxylase 3 OS=A	88.6	49.41	1	1.89E+06	1	1	4	58933
	6	191	E6Y6R7 E6Y6	n/a	Biotin carboxylase 4 OS=A	81.7	49.41	1	1.89E+06	1	1	4	58984
22	6	15	Q647H3 Q647	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis	99.1	132.13	17	8.07E+03	5	1	11	61532
	7	2	A1DZF0 A1DZ	Ara h 3	Arachin 6 OS=Arachis hypoc	99.1	127.52	18	1.83E+03	5	1	10	60375
23	spot not processed												
24	spot not processed												
25	spot not processed												
A	8	3728	R0 A5Z1R0_A	Ara h 6	Ara h 6 OS=Arachis hypoga	63.5	65.55	8	2.39E+06	1	1	10	16920
	8	3727	47G9 CONG_A	Ara h 6	Conglutin OS=Arachis hypoc	63.5	65.55	8	2.39E+06	1	1	10	16920
	10	1975	P1 A0A0A6ZD	n/a	Glyceraldehyde-3-phosphat	82.2	57.47	12	1.21E+05	2	2	2	20101
	10	1267	T0 A0A0A6ZD	n/a	Glyceraldehyde-3-phosphat	82.2	57.47	12	1.21E+05	2	2	2	20099
	11	2989	T2B9M0 T2B9	n/a	Fructose-bisphosphate ald	61.3	44.07	4	9.23E+03	1	1	1	38383
	21	2163	Q5UIP7 Q5UI	n/a	Alcohol dehydrogenase (Fi	59.2	35.49	5	1.18E+04	1	1	1	19734

KONTROLNI UZORAK SIROVOG KIKIRIKIJA - IDENTITET PROTEINA IZ TAČAKA OBELEŽENIH NA SLICI 20

# SPOT	Protein Group	Protein ID	Accession	Allergome	Description	Score (%)	Score (-10lgP)	Coverage (%)	Area under XIC	# Peptides	# Unique	# PSM	Avg. Mass (Da)
1 to 7	Spots not processed												
8	1	2	A1DZF0 A1DZ	Ara h 3	Arachin 6 OS=Arachis hypogaea PE=2	99.1	231.37	29	3.84E+06	13	7	104	60375
	5	13	Q9FZ11 Q9F	Ara h 3	Gly1 OS=Arachis hypogaea GN=Gly1 P	98.8	139.6	8	3.95E+04	5	1	35	60449
	10	41	Q6IWG5 Q6I	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arachis hypog	84.2	54.9	3	1.74E+05	1	1	5	58061
	10	42	Q0GM57 Q0G	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea PE=2	84.2	54.9	3	1.74E+05	1	1	5	58263
	10	45	E5G077 E5G	Ara h 3	Ara h 3 allergen OS=Arachis hypogaea	84.2	54.9	3	1.74E+05	1	1	5	58305
9	Spot is not present/identified in the gel												
10	1	2	A1DZF0 A1DZ	Ara h 3	Arachin 6 OS=Arachis hypogaea PE=2	99.1	231.37	29	3.84E+06	13	7	104	60375
	5	13	Q9FZ11 Q9F	Ara h 3	Gly1 OS=Arachis hypogaea GN=Gly1 P	98.8	139.6	8	3.95E+04	5	1	35	60449
	10	41	Q6IWG5 Q6I	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arachis hypog	84.2	54.9	3	1.74E+05	1	1	5	58061
	10	42	Q0GM57 Q0G	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea PE=2	84.2	54.9	3	1.74E+05	1	1	5	58263
	10	45	E5G077 E5G	Ara h 3	Ara h 3 allergen OS=Arachis hypogaea	84.2	54.9	3	1.74E+05	1	1	5	58305
11	Spot is not processed												
12	1	13	Q9FZ11 Q9F	Ara h 3	Gly1 OS=Arachis hypogaea GN=Gly1 P	99.2	216.57	36	4.26E+04	16	1	132	60449
	1	5	Q5I6T2 Q5I	Ara h 3	Arachin Ahy-4 OS=Arachis hypogaea P	99.2	216.57	35	4.26E+04	16	1	132	60736
	1	15	Q647H3 Q64	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypogaea P	99.2	216.57	35	4.26E+04	16	1	132	61532
	3	7	Q647H4 Q64	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hypogaea P	99.2	215.35	46	3.91E+04	17	3	124	61506
	9	41	Q6IWG5 Q6I	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arachis hypog	79.4	52.07	5	3.03E+04	1	1	1	58061
	9	42	Q0GM57 Q0G	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea PE=2	79.4	52.07	5	3.03E+04	1	1	1	58263
	9	45	E5G077 E5G	Ara h 3	Ara h 3 allergen OS=Arachis hypogaea	79.4	52.07	5	3.03E+04	1	1	1	58305
13	Spot is not processed												
14	1	41	Q6IWG5 Q6I	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arachis hypog	99.2	297.31	34	3.77E+07	43	5	859	58061
	1	42	Q0GM57 Q0G	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea PE=2	99.2	297.31	34	3.77E+07	43	5	859	58263
	2	45	E5G077 E5G	Ara h 3	Ara h 3 allergen OS=Arachis hypogaea	99.2	276.42	34	7.85E+05	33	1	659	58305
	3	7	Q647H4 Q64	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hypogaea P	99.2	232.93	35	5.03E+05	22	5	120	61506
	3	12	Q672T4 Q67	Ara h 3	Storage protein OS=Arachis hypogaea	99.2	232.93	35	5.03E+05	22	5	120	61499
	4	2	A1DZF0 A1DZ	Ara h 3	Arachin 6 OS=Arachis hypogaea PE=2	99.2	229.37	36	8.75E+04	21	3	116	60375
5	15	Q647H3 Q64	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypogaea P	99.1	215.69	23	1.51E+06	19	1	112	61532	
6	13	Q9FZ11 Q9F	Ara h 3	Gly1 OS=Arachis hypogaea GN=Gly1 P	99.1	194.28	22	4.33E+04	13	1	86	60449	

15	Spot is not processed												
16	4	216	Q61WGS Q6	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arachis hypogaea PE=2	99.1	170.72	42	4.81E+06	17	17	75	58061
	4	217	Q0GM57 Q1	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea PE=2	99.1	170.72	42	4.81E+06	17	17	75	58263
	6	215	sp Q6PSU2	Ara h 2	Conglutin-7 OS=Arachis hypogaea PE=	99.1	137.02	69	1.23E+06	11	11	54	20114
	7	89	Q647H3 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypogaea PE=	99.1	167.25	44	1.77E+05	16	1	27	61532
	8	87	Q647H4 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hypogaea PE=	99.1	164.27	40	6.65E+03	15	1	24	61506
	8	88	Q6T2T4 Q6	Ara h 3	Storage protein OS=Arachis hypogaea PE=	99.1	164.27	40	6.65E+03	15	1	24	61499
	11	85	B5TYU1 B5	Ara h 3	Arachin Arah3 isoform OS=Arachis hypogaea PE=	99.1	154.03	32	3.50E+04	13	1	20	60624
	12	219	sp Q647H2	Ara h 3	Arachin Ahy-3 OS=Arachis hypogaea PE=	99.1	137.07	24	7.36E+05	7	7	20	54569
17	1	216	Q61WGS Q6	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arachis hypogaea PE=	99.2	248.23	37	8.32E+06	26	21	153	58061
	1	217	Q0GM57 Q1	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea PE=2	99.2	248.23	37	8.32E+06	26	21	153	58263
	2	215	sp Q6PSU2	Ara h 2	Conglutin-7 OS=Arachis hypogaea PE=	99.1	185.99	73	1.58E+06	15	15	59	20114
	4	89	Q647H3 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypogaea PE=	99.1	212.25	34	1.75E+05	19	4	31	61532
	5	84	A1DZF0 A1	Ara h 3	Arachin 6 OS=Arachis hypogaea PE=2	99.1	204.86	36	8.57E+04	15	1	30	60375
	6	85	B5TYU1 B5	Ara h 3	Arachin Arah3 isoform OS=Arachis hypogaea PE=	99.1	194.34	35	1.42E+04	15	1	26	60624
	10	219	sp Q647H2	Ara h 3	Arachin Ahy-3 OS=Arachis hypogaea PE=	99.1	154.19	18	8.67E+04	6	4	11	54569
18	4	216	Q61WGS Q6	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arachis hypogaea PE=	99.1	207.01	33	1.42E+06	14	13	57	58061
	4	217	Q0GM57 Q1	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea PE=2	99.1	207.01	33	1.42E+06	14	13	57	58263
	5	215	sp Q6PSU2	Ara h 2	Conglutin-7 OS=Arachis hypogaea PE=	99	145.32	41	1.17E+06	6	6	51	20114
	7	87	Q647H4 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hypogaea PE=	99.1	153.45	29	0.00E+00	9	1	20	61506
	7	88	Q6T2T4 Q6	Ara h 3	Storage protein OS=Arachis hypogaea PE=	99.1	153.45	29	0.00E+00	9	1	20	61499
	9	89	Q647H3 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypogaea PE=	99.1	160.75	27	1.26E+04	9	1	17	61532
	13	1745	E9LFE8 E9L	n/a	11S arachin (Fragment) OS=Arachis hypogaea PE=	89.4	43.54	11	4.33E+03	2	2	2	28290
	14	1679	Q38711 Q3	n/a	Galactose-binding lectin (Fragment) OS=Arachis hypogaea PE=	83.5	54.26	17	2.84E+04	2	2	2	29134
	14	1680	sp P02872	n/a	Galactose-binding lectin OS=Arachis hypogaea PE=	83.5	54.26	16	2.84E+04	2	2	2	29325
	14	1681	A0A0892XL7	n/a	Peanut agglutinin variant OS=Arachis hypogaea PE=	83.5	54.26	16	2.84E+04	2	2	2	29407
	19	518	A1DZE9 A1	Ara h 6	Conglutin 8 OS=Arachis hypogaea PE=2	61.7	72.02	10	9.54E+03	1	1	1	16833
	19	516	A521R0 A52	Ara h 6	Ara h 6 OS=Arachis hypogaea GN=Ara	61.4	72.02	10	9.54E+03	1	1	1	16920
	19	517	sp Q647G9	Ara h 6.01	Conglutin OS=Arachis hypogaea PE=1	61.4	72.02	10	9.54E+03	1	1	1	16920
21	2784	Q647G4 Q6	Ara h 10.0	Oleosin 2 (Fragment) OS=Arachis hypogaea PE=	61.2	39.36	7	1.99E+03	1	1	1	15527	
21	2785	Q647G5 Q6	Ara h 10.0	Oleosin 1 OS=Arachis hypogaea PE=2	61.2	39.36	7	1.99E+03	1	1	1	17753	
19	2	216	Q61WGS Q6	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arachis hypogaea PE=	99.1	241.19	28	5.39E+06	18	16	127	58061
	2	217	Q0GM57 Q1	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea PE=2	99.1	241.19	28	5.39E+06	18	16	127	58263
	4	215	sp Q6PSU2	Ara h 2	Conglutin-7 OS=Arachis hypogaea PE=	99	164.72	41	3.49E+06	9	9	76	20114
	7	87	Q647H4 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hypogaea PE=	99.1	161.05	21	3.80E+03	6	1	19	61506
	7	88	Q6T2T4 Q6	Ara h 3	Storage protein OS=Arachis hypogaea PE=	99.1	161.05	21	3.80E+03	6	1	19	61499
	8	89	Q647H3 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypogaea PE=	99	160.46	19	1.80E+05	8	2	20	61532
	16	516	A521R0 A52	Ara h 6	Ara h 6 OS=Arachis hypogaea GN=Ara	58.6	27.33	7	3.24E+03	1	1	1	16920
	16	517	sp Q647G9	Ara h 6.01	Conglutin OS=Arachis hypogaea PE=1	58.6	27.33	7	3.24E+03	1	1	1	16920

# SPOT	Protein Group	Protein ID	Accession	Allergome	Description	Score (%)	Score (-10lgP)	Coverage (%)	Area under XIC	# Peptides	# Unique	# PSM	Avg. Mass (Da)
--------	---------------	------------	-----------	-----------	-------------	-----------	----------------	--------------	----------------	------------	----------	-------	----------------

20	4	517	sp Q647G9	Ara h 6.01	Conglutin OS=Arachis hypogaea PE=1	99.1	180.32	57	6.48E+05	8	8	55	16920
	4	516	A521R0 A52	Ara h 6	Ara h 6 OS=Arachis hypogaea GN=Ara	99.1	180.32	57	6.48E+05	8	8	55	16920
	6	429	Q5XXQ4 Q5	Ara h 8	PR10 protein OS=Arachis hypogaea GN=	98.1	67.76	43	5.74E+04	3	3	8	16218
	6	430	B0YIU5 B0Y	Ara h 8	Ara h 8 allergen isoform OS=Arachis hypogaea PE=	98.1	67.76	42	5.74E+04	3	3	8	16413
	8	216	Q61WGS Q6	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arachis hypogaea PE=	84.2	70.73	8	3.37E+04	2	2	6	58061
	8	217	Q0GM57 Q1	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea PE=2	84.2	70.73	8	3.37E+04	2	2	6	58263
	8	218	E5G077 E5	Ara h 3	Ara h 3 allergen OS=Arachis hypogaea PE=	84.2	70.73	8	3.37E+04	2	2	6	58305
	9	87	Q647H4 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hypogaea PE=	79.3	41.36	2	1.04E+03	1	1	1	61506
	9	88	Q6T2T4 Q6	Ara h 3	Storage protein OS=Arachis hypogaea PE=	79.3	41.36	2	1.04E+03	1	1	1	61499
	9	89	Q647H3 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypogaea PE=	79.3	41.36	2	1.04E+03	1	1	1	61532
	9	90	Q8LKN1 Q8	Ara h 3	Allergen Arah3/Arah4 OS=Arachis hypogaea PE=	79.3	41.36	2	1.04E+03	1	1	1	61738
	10	2788	Q2PXN9 Q2	n/a	Dessication protectant protein LEA 14	61.3	40.7	12	2.27E+03	1	1	2	16112
	10	3802	E5FHZ5 E5F	n/a	Late embryogenesis abundant protein	61.3	40.7	11	2.27E+03	1	1	2	17041
	16	204	E9LFE7 E9L	Ara h 1	7S conarachin (Fragment) OS=Arachis hypogaea PE=	58.5	28.38	5	1.36E+03	1	1	1	33604
	16	205	Q6PSU5 Q6	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=Arachis hypogaea PE=	58.5	28.38	5	1.36E+03	1	1	1	34133
	16	206	Q6PSU6 Q6	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=Arachis hypogaea PE=	58.5	28.38	5	1.36E+03	1	1	1	34133
16	3470	Q6PSU4 Q6	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=Arachis hypogaea PE=	58.5	28.38	4	1.36E+03	1	1	1	48095	
21	4	516	A521R0 A52	Ara h 6	Ara h 6 OS=Arachis hypogaea GN=Ara	98.8	152.88	39	2.24E+05	8	8	36	16920
	4	517	sp Q647G9	Ara h 6.01	Conglutin OS=Arachis hypogaea PE=1	98.8	152.88	39	2.24E+05	8	8	36	16920
	7	216	Q61WGS Q6	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arachis hypogaea PE=	86.9	84.99	7	2.74E+04	3	3	6	58061
	7	218	E5G077 E5	Ara h 3	Ara h 3 allergen OS=Arachis hypogaea PE=	86.9	84.99	7	2.74E+04	3	3	6	58305
	7	217	Q0GM57 Q1	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea PE=2	86.9	84.99	7	2.74E+04	3	3	6	58263

22 to 24	Spots not processed												
25	1	15	Q647H3 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hypogaea PE=	99.1	326.12	32	8.10E+07	41	5	840	61532
	4	3	B5TYU1 B5	Ara h 3	Arachin Arah3 isoform OS=Arachis hypogaea PE=	99.1	322.8	32	8.50E+07	34	2	679	60624
	6	7	Q647H4 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hypogaea PE=	99.1	317.45	32	5.49E+06	38	6	673	61506
	6	12	Q6T2T4 Q6	Ara h 3	Storage protein OS=Arachis hypogaea PE=	99.1	317.45	32	5.49E+06	38	6	673	61499
	5	13	Q9FZ11 Q9F	Ara h 3	Gly1 OS=Arachis hypogaea GN=Gly1	99.1	308.92	32	5.86E+06	32	3	714	60449
	9	41	Q61WGS Q6	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arachis hypogaea PE=	99.1	188.56	18	2.57E+05	13	1	31	58061
	9	42	Q0GM57 Q1	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypogaea PE=2	99.1	188.56	18	2.57E+05	13	1	31	58263

DIGESTOVANI UZORAK SIROVOG KIKIRIKIJA- IDENTITET PROTEINA IZ TAČAKA OBELEŽENIH NA SLICI 20

# SPOT	Protein Group	Protein ID	Accession	Allergome	Description	Score (%)	Score (-10lgP)	Coverage (%)	Area under XIC	# Peptides	# Unique	# PSM	Avg. Mass (Da)
1	2	15	Q647H3 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hy	99.1	205.33	28	5.40E+04	10	2	84	61532
	3	3	B5TYU1 B5	Ara h 3	Arachin Arah3 isoform OS=A	99.1	204.18	28	6.14E+03	10	1	78	60624
	4	7	Q647H4 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hy	99.1	191.6	28	1.64E+04	10	3	74	61506
	4	12	Q6T2T4 Q6	Ara h 3	Storage protein OS=Arachis h	99.1	191.6	28	1.64E+04	10	3	74	61499
	6	18	N1NG13 N	Ara h 1	Seed storage protein Ara h1	99.1	128.17	14	9.75E+04	5	5	27	71345
	6	20	sp P43238	Ara h 1	Allergen Ara h 1 clone P41B	99.1	128.17	14	9.75E+04	5	5	27	71345
	6	27	Q6PSU4 Q6	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=A	99.1	128.17	21	9.75E+04	5	5	27	48095
	7	41	Q6IWG5 Q	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arac	98.7	100.37	17	5.36E+04	4	3	11	58061
7	42	Q0GM57 C	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypog	98.7	100.37	17	5.36E+04	4	3	11	58263	
2	Spot was not processed												
3	1	18	N1NG13 N	Ara h 1	Seed storage protein Ara h1	99.2	286.27	44	1.88E+06	30	6	282	71345
	1	20	sp P43238	Ara h 1	Allergen Ara h 1 clone P41B	99.2	286.27	44	1.88E+06	30	6	282	71345
	2	26	Q6PSU3 Q6	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=A	99.2	280.01	44	1.15E+05	28	4	248	66575
	2	21	sp P43237	Ara h 1	Allergen Ara h 1 clone P17 O	99.2	280.01	42	1.15E+05	28	4	248	70283
	2	23	B3IXL2 B3I	Ara h 1	Main allergen Ara h1 OS=Ara	99.2	280.01	42	1.15E+05	28	4	248	70283
	3	15	Q647H3 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hy	99.1	204.93	28	4.07E+05	12	2	101	61532
	5	3	B5TYU1 B5	Ara h 3	Arachin Arah3 isoform OS=A	99.1	202.39	28	1.16E+05	12	1	86	60624
	6	7	Q647H4 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hy	99.1	185.1	22	9.42E+03	9	1	80	61506
	6	12	Q6T2T4 Q6	Ara h 3	Storage protein OS=Arachis h	99.1	185.1	22	9.42E+03	9	1	80	61499
	14	41	Q6IWG5 Q	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arac	83.6	61.56	7	1.77E+05	2	1	2	58061
	14	42	Q0GM57 C	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypog	83.6	61.56	7	1.77E+05	2	1	2	58263
14	45	E5G077 E5	Ara h 3	Ara h 3 allergen OS=Arachis h	83.6	61.56	7	1.77E+05	2	1	2	58305	
4	Spot was not processed												
5	1	13	Q9FZ11 Q9	Ara h 3	Gly1 OS=Arachis hypogaea G	99.2	229.99	41	1.18E+05	16	1	187	60449
	8	41	Q6IWG5 Q	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arac	83.8	56.1	7	4.93E+04	2	1	3	58061
	8	42	Q0GM57 C	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypog	83.8	56.1	7	4.93E+04	2	1	3	58263
	8	45	E5G077 E5	Ara h 3	Ara h 3 allergen OS=Arachis h	83.8	56.1	7	4.93E+04	2	1	3	58305
# SPOT	Protein Group	Protein ID	Accession	Allergome	Description	Score (%)	Score (-10lgP)	Coverage (%)	Area under XIC	# Peptides	# Unique	# PSM	Avg. Mass (Da)
6	Spot was not processed												
7	1	69	Q6PSU5 Q6	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=A	99.1	263.37	45	1.12E+06	20	7	217	33604
	1	18	N1NG13 N	Ara h 1	Seed storage protein Ara h1	99.1	263.37	21	1.12E+06	20	7	217	71345
	1	20	sp P43238	Ara h 1	Allergen Ara h 1 clone P41B	99.1	263.37	21	1.12E+06	20	7	217	71345
	2	26	Q6PSU3 Q6	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=A	99.1	230.39	17	1.30E+03	14	1	174	66575
	2	23	B3IXL2 B3I	Ara h 1	Main allergen Ara h1 OS=Ara	99.1	230.39	16	1.30E+03	14	1	174	70283
	2	21	sp P43237	Ara h 1	Allergen Ara h 1 clone P17 O	99.1	230.39	16	1.30E+03	14	1	174	70283
	2	57	Q6PSU6 Q6	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=A	99.1	230.39	33	1.30E+03	14	1	174	34133
	3	13	Q9FZ11 Q9	Ara h 3	Gly1 OS=Arachis hypogaea G	99.1	160.62	36	6.10E+04	13	2	56	60449
	7	2	A1DZFO A1	Ara h 3	Arachin 6 OS=Arachis hypog	99.1	147.7	37	3.91E+03	12	1	48	60375
	5	15	Q647H3 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hy	99.1	146.57	37	6.76E+03	12	1	50	61532
	12	41	Q6IWG5 Q	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arac	97.9	55.98	12	6.44E+04	3	2	7	58061
	12	42	Q0GM57 C	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypog	97.9	55.98	12	6.44E+04	3	2	7	58263
8	Spot was not processed												
9	1	41	Q6IWG5 Q	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arac	99.1	253.41	31	14300000	23	4	184	58061
	1	42	Q0GM57 C	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypog	99.1	253.41	31	14300000	23	4	184	58263
	4	15	Q647H3 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hy	99.1	192.61	26	577000	13	2	48	61532
	6	7	Q647H4 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hy	99.2	188.29	31	63300	12	3	41	61506
	6	12	Q6T2T4 Q6	Ara h 3	Storage protein OS=Arachis h	99.2	188.29	31	63300	12	3	41	61499
	13	59	Q647H1 Q647H1_ARAHY	Ara h 3	Conarachin OS=Arachis hypo	99.1	139.13	14	241000	6	6	15	75933
	12	27	Q6PSU4 Q6	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=A	98.2	95.52	12	90800	3	3	12	48095
	12	18	N1NG13 N	Ara h 1	Seed storage protein Ara h1	98.2	95.52	8	90800	3	3	12	71345
	12	20	sp P43238	Ara h 1	Allergen Ara h 1 clone P41B	98.2	95.52	8	90800	3	3	12	71345
16	92	sp Q647H2	Ara h 3	Arachin Ahy-3 OS=Arachis hy	88.2	72.23	5	54500	2	2	3	54569	
10	5	272	D8KXX2 D8	n/a	AO2 OS=Arachis hypogaea PI	37.3	30.55	1	3.44E+03	1	1	1	148235
11	1	7	Q647H4 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hy	99.1	235.54	28	6350000	20	4	300	61506
	1	12	Q6T2T4 Q6	Ara h 3	Storage protein OS=Arachis h	99.1	235.54	28	6350000	20	4	300	61499
	5	13	Q9FZ11 Q9	Ara h 3	Gly1 OS=Arachis hypogaea G	99.1	193.59	22	564000	13	1	119	60449
	7	41	Q6IWG5 Q	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arac	99.1	179.89	29	708000	14	2	98	58061
	7	42	Q0GM57 C	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypog	99.1	179.89	29	708000	14	2	98	58263
	8	45	E5G077 E5	Ara h 3	Ara h 3 allergen OS=Arachis h	99.1	164.64	29	0	11	1	74	58305

# SPOT	Protein Group	Protein ID	Accession	Allergome	Description	Score (%)	Score (-10lgP)	Coverage (%)	Area under XIC	# Peptides	# Unique	# PSM	Avg. Mass (Da)
12	1	7	Q647H4 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hy	99.1	162.19	25	85400	8	1	38	61506
	1	12	Q6T2T4 Q6	Ara h 3	Storage protein OS=Arachis f	99.1	162.19	25	85400	8	1	38	61499
	6	41	Q6IWG5 Q	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arac	82.8	54.94	10	16700	2	2	3	58061
	6	42	Q0GM57 C	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypog	82.8	54.94	10	16700	2	2	3	58263
13	1	15	Q647H3 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hy	99.1	304.12	26	15800000	24	1	506	61532
	3	3	B5TYU1 B5	Ara h 3	Arachin Arah3 isoform OS=A	99.1	303.67	28	6880000	23	2	499	60624
	5	13	Q9F211 Q9	Ara h 3	Gly1 OS=Arachis hypogaea G	99.1	287.35	22	4320000	20	2	478	60449
	6	7	Q647H4 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hy	99.1	286.03	28	1970000	22	4	418	61506
	6	12	Q6T2T4 Q6	Ara h 3	Storage protein OS=Arachis f	99.1	286.03	28	1970000	22	4	418	61499
	9	41	Q6IWG5 Q	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arac	99.1	198.84	18	3130000	11	5	35	58061
	9	42	Q0GM57 C	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypog	99.1	198.84	18	3130000	11	5	35	58263
	9	42	Q0GM57 C	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypog	99.1	198.84	16	1980000	14	2	80	58263
14	3	3	B5TYU1 B5	Ara h 3	Arachin Arah3 isoform OS=A	99.2	339.69	33	42100000	42	2	832	60624
	1	15	Q647H3 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hy	99.2	338.17	32	78800000	44	5	899	61532
	6	7	Q647H4 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hy	99.2	326.97	30	8200000	40	6	755	61506
	6	12	Q6T2T4 Q6	Ara h 3	Storage protein OS=Arachis f	99.2	326.97	30	8200000	40	6	755	61499
	5	13	Q9F211 Q9	Ara h 3	Gly1 OS=Arachis hypogaea G	99.2	324.5	33	6980000	35	3	788	60449
	9	41	Q6IWG5 Q	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arac	99.1	194.92	16	1980000	14	2	80	58061
15	1	41	Q6IWG5 Q	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arac	98.9	116.4	10	17300	4	3	10	58061
	1	45	E5G077 E5	Ara h 3	Ara h 3 allergen OS=Arachis f	98.9	116.4	10	17300	4	3	10	58305
	1	42	Q0GM57 C	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypog	98.9	116.4	10	17300	4	3	10	58263
	2	13	Q9F211 Q9	Ara h 3	Gly1 OS=Arachis hypogaea G	98.8	106.02	12	1480	5	1	6	60449
	2	5	Q5I6T2 Q5	Ara h 3	Arachin Ahy-4 OS=Arachis hy	98.8	106.02	11	1480	5	1	6	60736
	2	15	Q647H3 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hy	98.8	106.02	11	1480	5	1	6	61532
	2	15	Q647H3 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hy	98.8	106.02	11	1480	5	1	6	61532
16	1	216	Q6IWG5 Q	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arac	99.1	279.74	44	1.10E+07	24	19	176	58061
	1	217	Q0GM57 C	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypog	99.1	279.74	44	1.10E+07	24	19	176	58263
	2	215	sp Q6PSU2	Ara h 2	Conglutin-7 OS=Arachis hypoc	99.1	216.68	70	3.87E+06	16	16	82	20114
	3	219	sp Q647H2	Ara h 3	Arachin Ahy-3 OS=Arachis hy	99.1	239.93	35	2.26E+06	13	11	45	54569
	6	89	Q647H3 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hy	99.1	219.97	40	1.83E+05	16	2	23	61532
	9	85	B5TYU1 B5	Ara h 3	Arachin Arah3 isoform OS=A	99.1	199.25	34	1.42E+04	12	1	17	60624
	15	1679	Q38711 Q3	n/a	Galactose-binding lectin (Fra	83	43.8	17	1.19E+04	2	2	2	29134
	15	1680	sp P02872	n/a	Galactose-binding lectin OS=	83	43.8	16	1.19E+04	2	2	2	29325
	15	1681	A0A089ZXL	n/a	Peanut agglutinin variant OS=	83	43.8	16	1.19E+04	2	2	2	29407

# SPOT	Protein Group	Protein ID	Accession	Allergome	Description	Score (%)	Score (-10lgP)	Coverage (%)	Area under XIC	# Peptides	# Unique	# PSM	Avg. Mass (Da)
17	1	216	Q6IWG5 Q	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arac	99.1	250	27	1.76E+06	19	19	100	58061
	1	217	Q0GM57 C	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypog	99.1	250	27	1.76E+06	19	19	100	58263
	2	215	sp Q6PSU2	Ara h 2	Conglutin-7 OS=Arachis hypoc	99.1	193.67	50	3.02E+05	9	9	34	20114
	5	84	A1DZF0 A1	Ara h 3	Arachin 6 OS=Arachis hypog	98.9	83.58	20	1.75E+04	5	3	8	60375
	5	87	Q647H4 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hy	98.9	83.58	20	1.75E+04	5	3	8	61506
	6	219	sp Q647H2	Ara h 3	Arachin Ahy-3 OS=Arachis hy	98.5	127.14	10	1.74E+04	3	3	7	54569
	8	89	Q647H3 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hy	97.6	79.08	12	5.83E+03	3	1	4	61532
	8	83	Q9F211 Q9	Ara h 3	Gly1 OS=Arachis hypogaea G	97.2	79.08	12	5.83E+03	3	1	4	60449
	8	86	Q5I6T2 Q5	Ara h 3	Arachin Ahy-4 OS=Arachis hy	97.2	79.08	12	5.83E+03	3	1	4	60736
	8	86	Q5I6T2 Q5	Ara h 3	Arachin Ahy-4 OS=Arachis hy	97.2	79.08	12	5.83E+03	3	1	4	60736
18	5	216	Q6IWG5 Q	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arac	99.1	168.44	23	1.55E+06	12	11	57	58061
	5	217	Q0GM57 C	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypog	99.1	168.44	23	1.55E+06	12	11	57	58263
	6	215	sp Q6PSU2	Ara h 2	Conglutin-7 OS=Arachis hypoc	99	118.27	38	4.95E+05	5	5	27	20114
	8	88	Q6T2T4 Q6	Ara h 3	Storage protein OS=Arachis f	99.1	137.79	20	3.81E+04	7	2	11	61499
	8	87	Q647H4 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hy	99.1	137.79	20	3.81E+04	7	2	11	61506
	14	204	E9LFE7 E9L	Ara h 1	7S conarachin (Fragment) OS	80.6	38.61	21	1.74E+04	2	2	2	15873
	14	205	Q6PSU5 Q6	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=A	80.6	38.61	10	1.74E+04	2	2	2	33604
	14	206	Q6PSU6 Q6	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=A	80.6	38.61	10	1.74E+04	2	2	2	34133
	14	3470	Q6PSU4 Q6	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=A	80.6	38.61	7	1.74E+04	2	2	2	48095
	14	207	Q6PSU3 Q6	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=A	80.6	38.61	5	1.74E+04	2	2	2	66575
	14	208	B3IXL2 B3I	Ara h 1	Main allergen Ara h1 OS=Ara	80.6	38.61	5	1.74E+04	2	2	2	70283
	14	209	sp P43237	Ara h 1	Allergen Ara h 1 clone P17 O	80.6	38.61	5	1.74E+04	2	2	2	70283
	14	274	N1NG13 N	Ara h 1	Seed storage protein Ara h1	80.6	38.61	5	1.74E+04	2	2	2	71345
	14	275	sp P43238	Ara h 1	Allergen Ara h 1 clone P41B	80.6	38.61	5	1.74E+04	2	2	2	71345
19	1	216	Q6IWG5 Q	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arac	99.1	244.88	30	4.48E+06	28	23	147	58061
	1	217	Q0GM57 C	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypog	99.1	244.88	30	4.48E+06	28	23	147	58263
	4	215	sp Q6PSU2	Ara h 2	Conglutin-7 OS=Arachis hypoc	99	154.39	41	9.36E+05	6	6	53	20114
	7	84	A1DZF0 A1	Ara h 3	Arachin 6 OS=Arachis hypog	99.1	157.89	22	1.04E+05	8	3	16	60375
20	3	89	Q647H3 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hy	99	135.1	17	4.30E+04	7	3	15	61532
	5	516	A5Z1R0 A5	Ara h 6	Ara h 6 OS=Arachis hypogae	84	112.57	20	4.59E+04	3	3	12	16920
	5	517	sp Q647G9	Ara h 6.0101	Conglutin OS=Arachis hypog	84	112.57	20	4.59E+04	3	3	12	16920
	8	84	A1DZF0 A1	Ara h 3	Arachin 6 OS=Arachis hypog	98.3	91.67	11	0.00E+00	4	1	7	60375
	10	216	Q6IWG5 Q	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arac	61.4	56.21	5	1.83E+04	1	1	4	58061
	10	218	E5G077 E5	Ara h 3	Ara h 3 allergen OS=Arachis f	61.4	56.21	5	1.83E+04	1	1	4	58305
10	217	Q0GM57 C	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypog	61.4	56.21	5	1.83E+04	1	1	4	58263	

# SPOT	Protein Group	Protein ID	Accession	Allergome	Description	Score (%)	Score (-10lgP)	Coverage (%)	Area under XIC	# Peptides	# Unique	# PSM	Avg. Mass (Da)
21	1	516	A5Z1R0 A5	Ara h 6	Ara h 6 OS=Arachis hypogae	84.2	130.16	20	8.56E+04	4	4	16	16920
	1	517	sp Q647G9	Ara h 6.0101	Conglutin OS=Arachis hypogae	84.2	130.16	20	8.56E+04	4	4	16	16920
	8	216	Q6IWG5 Q	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arac	61.2	64.77	5	3.59E+04	1	1	5	58061
	8	218	E5G077 E5	Ara h 3	Ara h 3 allergen OS=Arachis h	61.2	64.77	5	3.59E+04	1	1	5	58305
	8	217	Q0GM57 Q	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypog	61.2	64.77	5	3.59E+04	1	1	5	58263
22	1	15	Q647H3 Q	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hy	98.9	127.76	15	21100	4	2	13	61532
	2	2	A1DZF0 A1	Ara h 3	Arachin 6 OS=Arachis hypogae	98.6	103.49	15	10600	4	2	9	60375
23	1	15	Q647H3 Q	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hy	99.1	181.68	24	830	10	1	170	61532
	1	5	Q5I6T2 Q5	Ara h 3	Arachin Ahy-4 OS=Arachis hy	99.1	181.68	24	830	10	1	170	60736
	1	13	Q9FZ11 Q9	Ara h 3	Gly1 OS=Arachis hypogaea G	99.1	181.68	24	830	10	1	170	60449
	2	7	Q647H4 Q	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hy	99.1	178.08	22	1930	9	1	168	61506
	2	10	Q8LKN1 Q	Ara h 3	Allergen Arah3/Arah4 OS=Ar	99.1	178.08	22	1930	9	1	168	61738
	6	41	Q6IWG5 Q	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arac	84.1	64.34	7	18300	2	1	7	58061
	6	42	Q0GM57 Q	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypog	84.1	64.34	7	18300	2	1	7	58263
	6	45	E5G077 E5	Ara h 3	Ara h 3 allergen OS=Arachis h	84.1	64.34	7	18300	2	1	7	58305
	19	122	E9LFE7 E9	Ara h 1	7S conarachin (Fragment) OS	61	35.48	9	6930	1	1	1	15873
	19	69	Q6PSU5 Q	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=A	61	35.48	4	6930	1	1	1	33604
	19	57	Q6PSU6 Q	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=A	61	35.48	4	6930	1	1	1	34133
	19	27	Q6PSU4 Q	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=A	61	35.48	3	6930	1	1	1	48095
	19	26	Q6PSU3 Q	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=A	61	35.48	2	6930	1	1	1	66575
	19	21	sp P43237	Ara h 1	Allergen Ara h 1 clone P17 O	61	35.48	2	6930	1	1	1	70283
	19	23	B3IXL2 B3	Ara h 1	Main allergen Ara h1 OS=Ara	61	35.48	2	6930	1	1	1	70283
	19	55	E5G076 E5	Ara h 1	Ara h 1 allergen OS=Arachis h	61	35.48	2	6930	1	1	1	70788
	19	18	N1NG13 N	Ara h 1	Seed storage protein Ara h1	61	35.48	2	6930	1	1	1	71345
19	20	sp P43238	Ara h 1	Allergen Ara h 1 clone P41B	61	35.48	2	6930	1	1	1	71345	
24	1	13	Q9FZ11 Q9	Ara h 3	Gly1 OS=Arachis hypogaea G	91	70.3	6	6910	2	2	3	60449
	1	5	Q5I6T2 Q5	Ara h 3	Arachin Ahy-4 OS=Arachis hy	91	70.3	6	6910	2	2	3	60736
	1	15	Q647H3 Q	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hy	91	70.3	6	6910	2	2	3	61532

25	1	2	A1DZF0 A1	Ara h 3	Arachin 6 OS=Arachis hypogae	99	165.65	17	1500000	9	4	235	60375
	1	3	B5TYU1 B5	Ara h 3	Arachin Arah3 isoform OS=A	99	165.65	17	1500000	9	4	235	60624
	1	7	Q647H4 Q	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hy	99	165.65	17	1500000	9	4	235	61506
	1	13	Q9FZ11 Q9	Ara h 3	Gly1 OS=Arachis hypogaea G	99	165.65	17	1500000	9	4	235	60449
	1	29	Q9SQH7 Q	Ara h 3.0201	Glycinin OS=Arachis hypogae	99	165.65	17	1500000	9	4	235	61011
	1	5	Q5I6T2 Q5	Ara h 3	Arachin Ahy-4 OS=Arachis hy	99	165.65	17	1500000	9	4	235	60736
	1	15	Q647H3 Q	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hy	99	165.65	17	1500000	9	4	235	61532
	1	10	Q8LKN1 Q	Ara h 3	Allergen Arah3/Arah4 OS=Ar	99	165.65	17	1500000	9	4	235	61738
	1	83	Q8LL03 Q	Ara h 3	Trypsin inhibitor (Fragment) (99	165.65	42	1500000	9	4	235	25499
	2	34	O82580 O	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arac	99	142.03	17	3.17	6	1	159	58350
	4	41	Q6IWG5 Q	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arac	98.8	94.98	17	3350000	5	4	79	58061
	4	45	E5G077 E5	Ara h 3	Ara h 3 allergen OS=Arachis h	98.8	94.98	17	3350000	5	4	79	58305
	4	42	Q0GM57 Q	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypog	98.8	94.98	17	3350000	5	4	79	58263
B	1	41	Q6IWG5 Q	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arac	49.4	30.83	6	11200	1	1	1	58061
	1	42	Q0GM57 Q	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypog	49.4	30.83	6	11200	1	1	1	58263
C	1	13	Q9FZ11 Q9	Ara h 3	Gly1 OS=Arachis hypogaea G	99.1	124.75	17	3050	6	1	24	60449
	1	5	Q5I6T2 Q5	Ara h 3	Arachin Ahy-4 OS=Arachis hy	99.1	124.75	17	3050	6	1	24	60736
	1	15	Q647H3 Q	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hy	99.1	124.75	17	3050	6	1	24	61532
	5	69	Q6PSU5 Q	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=A	66.8	34.65	4	2480	1	1	1	33604
	5	57	Q6PSU6 Q	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=A	66.8	34.65	4	2480	1	1	1	34133
	5	27	Q6PSU4 Q	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=A	66.8	34.65	3	2480	1	1	1	48095
	5	26	Q6PSU3 Q	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=A	66.8	34.65	2	2480	1	1	1	66575
	5	21	sp P43237	Ara h 1	Allergen Ara h 1 clone P17 O	66.8	34.65	2	2480	1	1	1	70283
	5	23	B3IXL2 B3	Ara h 1	Main allergen Ara h1 OS=Ara	66.8	34.65	2	2480	1	1	1	70283
D	5	18	N1NG13 N	Ara h 1	Seed storage protein Ara h1	66.8	34.65	2	2480	1	1	1	71345
	5	20	sp P43238	Ara h 1	Allergen Ara h 1 clone P41B	66.8	34.65	2	2480	1	1	1	71345
	1	26	Q6PSU3 Q	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=A	99.2	315.98	41	819000	25	7	183	66575
	1	21	sp P43237	Ara h 1	Allergen Ara h 1 clone P17 O	99.2	315.98	39	819000	25	7	183	70283
	1	23	B3IXL2 B3	Ara h 1	Main allergen Ara h1 OS=Ara	99.2	315.98	39	819000	25	7	183	70283
	2	18	N1NG13 N	Ara h 1	Seed storage protein Ara h1	99.2	298.73	31	2930	19	1	139	71345
	2	20	sp P43238	Ara h 1	Allergen Ara h 1 clone P41B	99.2	298.73	31	2930	19	1	139	71345
	4	7	Q647H4 Q	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hy	97.7	75.57	5	2730	2	2	2	61506
	4	12	Q6T2T4 Q	Ara h 3	Storage protein OS=Arachis h	97.7	75.57	5	2730	2	2	2	61499
E	4	10	Q8LKN1 Q	Ara h 3	Allergen Arah3/Arah4 OS=Ar	97.7	75.57	5	2730	2	2	2	61738
	4	2	A1DZF0 A1	Ara h 3	Arachin 6 OS=Arachis hypogae	97.7	75.57	5	2730	2	2	2	60375
	1	13	Q9FZ11 Q9	Ara h 3	Gly1 OS=Arachis hypogaea G	99.2	216.57	36	42600	16	1	132	60449
	1	5	Q5I6T2 Q5	Ara h 3	Arachin Ahy-4 OS=Arachis hy	99.2	216.57	35	42600	16	1	132	60736
	1	15	Q647H3 Q	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hy	99.2	216.57	35	42600	16	1	132	61532
	3	7	Q647H4 Q	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hy	99.2	215.35	46	39100	17	3	124	61506
	9	41	Q6IWG5 Q	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arac	79.4	52.07	5	30300	1	1	1	58061
	9	42	Q0GM57 Q	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypog	79.4	52.07	5	30300	1	1	1	58263
	9	45	E5G077 E5	Ara h 3	Ara h 3 allergen OS=Arachis h	79.4	52.07	5	30300	1	1	1	58305

# SPOT	Protein Group	Protein ID	Accession	Allergome	Description	Score (%)	Score (-10lgP)	Coverage (%)	Area under XIC	# Peptides	# Unique	# PSM	Avg. Mass (Da)
--------	---------------	------------	-----------	-----------	-------------	-----------	----------------	--------------	----------------	------------	----------	-------	----------------

F	1	15	Q647H3 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hy	99.2	334.82	45	54900000	57	4	627	61532
	3	3	B5TYU1 B5	Ara h 3	Arachin Arah3 isoform OS=A	99.2	333.82	45	28300000	57	2	567	60624
	5	13	Q9FZ11 Q9	Ara h 3	Gly1 OS=Arachis hypogaea G	99.2	319.71	45	23100000	48	3	538	60449
	6	7	Q647H4 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hy	99.2	316.31	40	20300000	47	4	491	61506
	6	12	Q6T2T4 Q6	Ara h 3	Storage protein OS=Arachis f	99.2	316.31	40	20300000	47	4	491	61499
	9	41	Q6IWG5 Q6	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arac	99.1	212.57	21	8450000	19	3	82	58061
9	42	Q0GM57 Q	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypog	99.1	212.57	21	8450000	19	3	82	58263	
G	3	18	N1NG13 N	Ara h 1	Seed storage protein Ara h1	99.2	218.27	23	29900000	13	1	129	71345
	3	20	sp P43238	Ara h 1	Allergen Ara h 1 clone P41B	99.2	218.27	23	29900000	13	1	129	71345
	20	15	Q647H3 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hy	99.1	121.78	19	677000	5	2	9	61532
	21	2	A1DZF0 A1	Ara h 3	Arachin 6 OS=Arachis hypogae	99	114.8	17	832000	4	1	9	60375
H	1	59	Q647H1 Q6	n/a	Conarachin OS=Arachis hypo	99.1	277.04	18	42800000	16	7	161	75933
	3	18	N1NG13 N	Ara h 1	Seed storage protein Ara h1	99.1	215.02	16	4340000	10	1	42	71345
	3	20	sp P43238	Ara h 1	Allergen Ara h 1 clone P41B	99.1	215.02	16	4340000	10	1	42	71345
	4	26	Q6PSU3 Q6	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=A	99.1	214.23	17	1960000	10	1	38	66575
	4	23	B3IXL2 B3I	Ara h 1	Main allergen Ara h1 OS=Ara	99.1	214.23	16	1960000	10	1	38	70283
	4	21	sp P43237	Ara h 1	Allergen Ara h 1 clone P17 O	99.1	214.23	16	1960000	10	1	38	70283
	2	87	E9LFF0 E9L	n/a	11S arachin (Fragment) OS=A	99.1	204.15	43	1880000	10	1	65	19081
	7	15	Q647H3 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hy	99.1	139.35	21	5230000	6	3	25	61532
9	3	B5TYU1 B5	Ara h 3	Arachin Arah3 isoform OS=A	99	132.27	19	1630000	5	1	20	60624	
8	2	A1DZF0 A1	Ara h 3	Arachin 6 OS=Arachis hypogae	99	129.77	19	2950000	5	1	22	60375	
I	1	15	Q647H3 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hy	99.1	129.86	17	446000	6	1	10	61532
J	23	59	Q647H1 Q6	n/a	Conarachin OS=Arachis hypo	70.9	41.92	1	4360000	1	1	1	75933
	11	34	O82580 O8	Ara h 3.0101	Glycinin (Fragment) OS=Arac	62.8	39.85	3	2480000	1	1	1	58350
	11	13	Q9FZ11 Q9	Ara h 3	Gly1 OS=Arachis hypogaea G	62.8	39.85	2	2480000	1	1	1	60449
	11	2	A1DZF0 A1	Ara h 3	Arachin 6 OS=Arachis hypogae	62.8	39.85	2	2480000	1	1	1	60375
	11	3	B5TYU1 B5	Ara h 3	Arachin Arah3 isoform OS=A	62.8	39.85	2	2480000	1	1	1	60624
	11	5	Q5I6T2 Q5	Ara h 3	Arachin Ahy-4 OS=Arachis hy	62.8	39.85	2	2480000	1	1	1	60736
	11	7	Q647H4 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hy	62.8	39.85	2	2480000	1	1	1	61506
	11	12	Q6T2T4 Q6	Ara h 3	Storage protein OS=Arachis f	62.8	39.85	2	2480000	1	1	1	61499
	11	15	Q647H3 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hy	62.8	39.85	2	2480000	1	1	1	61532
	11	10	Q8LKN1 Q8	Ara h 3	Allergen Arah3/Arah4 OS=Ari	62.8	39.85	2	2480000	1	1	1	61738

# SPOT	Protein Group	Protein ID	Accession	Allergome	Description	Score (%)	Score (-10lgP)	Coverage (%)	Area under XIC	# Peptides	# Unique	# PSM	Avg. Mass (Da)
L	2	2	A1DZF0 A1	Ara h 3	Arachis hypogaea PE=2 SV=1	99.1	122.66	17	276000	7	3	16	60375
M	6	15	Q647H3 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hy	99.1	132.13	17	8070000	5	1	11	61532
	7	2	A1DZF0 A1	Ara h 3	Arachin 6 OS=Arachis hypogae	99.1	127.52	18	1830000	5	1	10	60375
	5	122	E9LFE7 E9L	Ara h 1	7S conarachin (Fragment) OS	84.1	89.31	21	5750000	2	2	39	15873
	5	69	Q6PSU5 Q6	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=A	84.1	89.31	10	5750000	2	2	39	33604
	5	57	Q6PSU6 Q6	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=A	84.1	89.31	10	5750000	2	2	39	34133
	5	27	Q6PSU4 Q6	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=A	84.1	89.31	7	5750000	2	2	39	48095
	5	26	Q6PSU3 Q6	Ara h 1	Conarachin (Fragment) OS=A	84.1	89.31	5	5750000	2	2	39	66575
	5	23	B3IXL2 B3I	Ara h 1	Main allergen Ara h1 OS=Ara	84.1	89.31	5	5750000	2	2	39	70283
	5	21	sp P43237	Ara h 1	Allergen Ara h 1 clone P17 O	84.1	89.31	5	5750000	2	2	39	70283
	5	18	N1NG13 N	Ara h 1	Seed storage protein Ara h1	84.1	89.31	5	5750000	2	2	39	71345
5	20	sp P43238	Ara h 1	Allergen Ara h 1 clone P41B	84.1	89.31	5	5750000	2	2	39	71345	
N	5	3	B5TYU1 B5	Ara h 3	Arachin Arah3 isoform OS=A	99.1	230.11	32	16300000	18	1	195	60624
	1	2	A1DZF0 A1	Ara h 3	Arachin 6 OS=Arachis hypogae	99.1	228.54	32	13000000	18	1	228	60375
	2	15	Q647H3 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hy	99.1	227.16	29	18000000	17	1	212	61532
	3	13	Q9FZ11 Q9	Ara h 3	Gly1 OS=Arachis hypogaea G	99.1	226.44	26	10000000	17	2	203	60449
	6	7	Q647H4 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hy	99.1	217.96	29	84900000	17	4	173	61506
	6	12	Q6T2T4 Q6	Ara h 3	Storage protein OS=Arachis f	99.1	217.96	29	84900000	17	4	173	61499
	11	41	Q6IWG5 Q6	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arac	98.7	93.26	12	30900000	5	1	10	58061
	11	42	Q0GM57 Q	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypog	98.7	93.26	12	30900000	5	1	10	58263
	10	59	Q647H1 Q6	n/a	Conarachin OS=Arachis hypo	98.5	62.78	7	70900000	4	4	10	75933
	O	6	83	Q8LLO3 Q8	Ara h 3	Trypsin inhibitor (Fragment) (62.3	44.29	20	11400000	2	2	2
6		34	O82580 O8	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arac	62.3	44.29	9	11400000	2	2	2	58350
6		13	Q9FZ11 Q9	Ara h 3	Gly1 OS=Arachis hypogaea G	62.3	44.29	8	11400000	2	2	2	60449
6		2	A1DZF0 A1	Ara h 3	Arachin 6 OS=Arachis hypogae	62.3	44.29	8	11400000	2	2	2	60375
6		3	B5TYU1 B5	Ara h 3	Arachin Arah3 isoform OS=A	62.3	44.29	8	11400000	2	2	2	60624
6		29	Q9SQH7 Q9	Ara h 3	Glycinin OS=Arachis hypogae	62.3	44.29	8	11400000	2	2	2	61011
6		5	Q5I6T2 Q5	Ara h 3	Arachin Ahy-4 OS=Arachis hy	62.3	44.29	8	11400000	2	2	2	60736
6		7	Q647H4 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-1 OS=Arachis hy	62.3	44.29	8	11400000	2	2	2	61506
6		12	Q6T2T4 Q6	Ara h 3	Storage protein OS=Arachis f	62.3	44.29	8	11400000	2	2	2	61499
6		15	Q647H3 Q6	Ara h 3	Arachin Ahy-2 OS=Arachis hy	62.3	44.29	8	11400000	2	2	2	61532
6		10	Q8LKN1 Q8	Ara h 3	Allergen Arah3/Arah4 OS=Ari	62.3	44.29	8	11400000	2	2	2	61738
6		116	A1DZF1 A1	Ara h 3	Arachin 7 (Fragment) OS=Ara	61	44.29	8	97500000	1	1	1	23857
7		92	sp Q647H2	Ara h 3	Arachin Ahy-3 OS=Arachis hy	60.1	33.58	6	68400000	1	1	1	54569
7		41	Q6IWG5 Q6	Ara h 3	Glycinin (Fragment) OS=Arac	60.1	33.58	5	68400000	1	1	1	58061
7	45	E5G077 E5	Ara h 3	Ara h 3 allergen OS=Arachis f	60.1	33.58	5	68400000	1	1	1	58305	
7	42	Q0GM57 Q	Ara h 3	Iso-Ara h3 OS=Arachis hypog	60.1	33.58	5	68400000	1	1	1	58263	

Tabela 8.3 Sekvence intaktnih MPOP iz Ara h 3 (18) i Ara h 1 (27), pronađenim nakon *in vitro* oralno-gastroične digestije celog zrna sirovog kikirikija, uparenih sa Ara h 3 i Ara h 1 epitopima dobijenim iz IEDB baze podataka. Frakcija u kojoj su se nalazili MPOP je analizirana pristupom tandem masenom spektrometrijom intaktnih peptida (bez digestije tripsinom ili nekom drugom proteazom). Pronađeni epitopi u identifikovanim peptidima su boldirani i predstavljeni sa svojim identifikacionim brojem (ID IEDB).

Broj Pept .	Peptidna sekvenca	Alergen akcesioni broj	ID Epitop IEDB	Sekvenca IEDB Epitopa	Reference
1	LKNNNPFKF	Ara h 3 (A1DZF0 , Q6IWG5, Q0GM57)	106026	QARQLKNNNPFKFFV	[166]
1	LKNNNPFKF	Ara h 3 (A1DZF0 , Q6IWG5, Q0GM57)	106042	QLKNNNPFKFFVPPS	[167]
2	RQLKNNNPFKF	Ara h 3 (A1DZF0 , Q6IWG5, Q0GM57)	106026	QARQLKNNNPFKFFV	[167]
3	SYGLPRE	Ara h 3 (A1DZF0)	105678	ANSYGLPREQARQLK	[167]
4	IAVPTGVAF	Ara h 3 (A1DZF0 , Q6IWG5, Q0GM57)	99266	GDLIAVPTGVAFWLY	[166]
4	IAVPTGVAF	Ara h 3 (A1DZF0 , Q6IWG5, Q0GM57)	99325	IAVPTGVAFWLYNDH	[166]
5	IAVPTGVA	Ara h 3 (A1DZF0 , Q6IWG5, Q0GM57)	53687	RFDEGDLIAVPTGVA	[141]
5	IAVPTGVA	Ara h 3 (A1DZF0 , Q6IWG5, Q0GM57)	99266	GDLIAVPTGVAFWLY	[166]
5	IAVPTGVA	Ara h 3 (A1DZF0 , Q6IWG5, Q0GM57)	99325	IAVPTGVAFWLYNDH	[166]
6	RILSPDRK	Ara h 3 (A1DZF0)	71559	VTVRGGLRILSPDRK	[168]; [141]
6	RILSPDRK	Ara h 3 (A1DZF0)	99738	TVRGGLRILSPDRKR	[167]; [166]
6	RILSPDRK	Ara h 3 (A1DZF0)	70725	VRGGLRILSPDRKRR	[141]
6	RILSPDRK	Ara h 3 (A1DZF0)	99277	GGLRILSPDRKRRAD	[166]
6	RILSPDRK	Ara h 3 (A1DZF0)	105826	GGLRILSPDRKRRQQ	[167]

6	RILSPDRK		106076	RILSPDRKRRQQYER	[167]
7	KKNIGRNRSPDIYNPQAGSL		31642	KKNIGRNRSPDIYNP	[167]; [166]; [141]
7	KKNIGRNRSPDIYNPQAGSL	Ara h 3 (A1DZF0)	99331	IGRNRSPDIYNPQAG	[167]; [166]; [141]
8	RSPDIYNPQAGSL	Ara h 3 (A1DZF0)	99513	NRSPDIYNPQAGSLK	[167]; [166]
9	SPDIYNPQAGSL	Ara h 3 (A1DZF0)	99513	NRSPDIYNPQAGSLK	[167]; [166]
10	LRGRAHVQVVD	Ara h 3 (A1DZF0)	99363	IYRLRGRAHVQVVD	[166]
10	LRGRAHVQVVD		99447	LRGRAHVQVVD	[166]
11	LRGRAHVQVVD	Ara h 3 (A1DZF0)	99447	LRGRAHVQVVD	[166]
12	ARQLKNNNPFKF	Ara h 3 (Q6IWG5)	106026	QARQLKNNNPFKFFV	[167]
13	NGRAHVQVVD	Ara h 3 (Q6IWG5)	99597	RAHVQVVD	[166]
14	NGRAHVQVVD	Ara h 3 (Q6IWG5)	99597	RAHVQVVD	[166]
15	RAHVQVVD	Ara h 3 (A1DZF0)	99597	RAHVQVVD	[166]
15	RAHVQVVD	Ara h 3 (A1DZF0)	99447	LRGRAHVQVVD	[166]
16	LQEGHVL	Ara h 3 (A1DZF0)	99141	DEELQEGHVL	[166]

16	LQEGHVL	Q6IWG5, Q0GM57)	99440	LQEGHVLVVVPQNF AV	[166]
17	GHVLVVPQNF	Ara h 3 (A1DZF0 ,	99280	GHVLVVPQNF AVAGK	[166]
17	GHVLVVPQNF	Q6IWG5, Q0GM57)	99440	LQEGHVLVVVPQNF AV	[166]
18	HVLVVPQNF	Ara h 3 (A1DZF0 ,	99280	GHVLVVPQNF AVAGK	[166]
18	HVLVVPQNF	Q6IWG5, Q0GM57)	99440	LQEGHVLVVVPQNF AV	[166]
19	VLPKHADADN IL	Ara h 1 (P43238, N1NG13, Q6PSU3, P43237, B3IXL2)	100389	PNTLVLPKHADADN ILVIQQ	[169]
19	VLPKHADADN IL		190791	IEAKPNTLVLPKHADADN IL	[170]
20	VLPKHADADN I	Ara h 1 (P43238, N1NG13, Q6PSU3, P43237, B3IXL2)	100389	PNTLVLPKHADADN ILVIQQ	[169]
20	VLPKHADADN I		190791	IEAKPNTLVLPKHADADN IL	[170]
21	VLPKHADADN	Ara h 1 (P43238, N1NG13, Q6PSU3, P43237, B3IXL2)	99393	KPNTLVLPKHADADN	[166]
21	VLPKHADADN		100389	PNTLVLPKHADADN ILVIQQ	[169]
21	VLPKHADADN		190791	IEAKPNTLVLPKHADADN IL	[170]
22	VLPKHADAD	Ara h 1 (P43238, N1NG13, Q6PSU3, P43237, B3IXL2)	99393	KPNTLVLPKHADADN	[166]
22	VLPKHADAD		100389	PNTLVLPKHADADN ILVIQQ	[169]
22	VLPKHADAD		190791	IEAKPNTLVLPKHADADN IL	[170]
23	PKHADADN IL		100389	PNTLVLPKHADADN ILVIQQ	[169]
23	PKHADADN IL	Ara h 1 (P43238, N1NG13, Q6PSU3, P43237, B3IXL2)	190791	IEAKPNTLVLPKHADADN IL	[170]
23	PKHADADN IL		190849	LPKHADADN ILVIQQGQATV	[170]
23	PKHADADN IL		523624	PKHADADN ILVIQQGQATVTV ANG	[171]
24	PKHADADN ILVI	Ara h 1 (P43238, N1NG13, Q6PSU3,	190849	LPKHADADN ILVIQQGQATV	[170]

24	PKHADADNILVI	P43237, B3IXL2)	523624	PKHADADNILVIQQQATVTV ANG	[171]
24	PKHADADNILVI		100389	PNTLVLPKHADADNILVIQQ	[169]
25	SFNLDEGHA	Ara h 1 (P43238, N1NG13, Q6PSU3, P43237, B3IXL2)	99616	RKSFNLDEGHALRIP	[166]; [172]
25	SFNLDEGHA		190952	RKSFNLDEGHALRIPSGFIS	[170]
25	SFNLDEGHA		191006	TVTIVANGNNRKSFNLDGHA	[170]
26	LRIPSGF	Ara h 1 (P43238, N1NG13, Q6PSU3, P43237, B3IXL2)	99142	DEGHALRIPSGFISY	[166]
26	LRIPSGF		99312	HALRIPSGFISYILN	[166]
26	LRIPSGF		100063	GHALRIPSGFISYILNRHDN	[169]
26	LRIPSGF		190781	HALRIPSGFISYILNRHDNQ	[170]
26	LRIPSGF		190952	RKSFNLDEGHALRIPSGFIS	[170]
27	LRIPSGFI	Ara h 1 (P43238, N1NG13, Q6PSU3, P43237, B3IXL2)	99142	DEGHALRIPSGFISY	[166]
27	LRIPSGFI		99312	HALRIPSGFISYILN	[166]
27	LRIPSGFI		100063	GHALRIPSGFISYILNRHDN	[169]
27	LRIPSGFI		190781	HALRIPSGFISYILNRHDNQ	[170]
27	LRIPSGFI		190952	RKSFNLDEGHALRIPSGFIS	[170]
28	ILNRHDNQNQL	Ara h 1 (P43238, N1NG13, Q6PSU3, P43237, B3IXL2)	100169	ISYILNRHDNQNQLRVAKISM	[170]; [169]
28	ILNRHDNQNQL		99355	ISYILNRHDNQNQLRV	[166]; [172]

29	RVAKISM	Ara h 1 (P43238, NING13, Q6PSU3, P43237, B3IXL2)	100169	ISYILNRHDNQNLRVAKISM	[170]; [169]
29	RVAKISM		99511	NQNLRVAKISMPVN	[166]; [172]; [18]
29	RVAKISM		100433	QNLRVAKISMPVNTPGQFED	[169]
29	RVAKISM		190882	NQNLRVAKISMPVNTPGQFE	[170]
30	AKISMPVNTPGQF	Ara h 1 (P43238, NING13, Q6PSU3, P43237, B3IXL2)	100433	QNLRVAKISMPVNTPGQFED	[169]
30	AKISMPVNTPGQF		190882	NQNLRVAKISMPVNTPGQFE	[170]
30	AKISMPVNTPGQF		434773	VAKISMPVNTPGQFEDFFPASS R + MCM(K3)	[173]
30	AKISMPVNTPGQF			VAKISMPVNTPGQFEDFFPASS R	[173]
31	VVVNKG TG NLE	Ara h 1 (P43238, NING13, Q6PSU3, P43237, B3IXL2)	98841	KAMVIVVVNKG TG NLELVAV	[174]; [169]; [175]
31	VVVNKG TG NLE		148699	NSKAMVIVVVNKG TG NLELV	[176]
31	VVVNKG TG NLE		190708	AMVIVVVNKG TG NLELVAV	[170]
31	VVVNKG TG NLE		523259	NSKAMVIVVVNKG TG NLELVA VRK	[171]
32	VKVSKEHVEE	Ara h 1 (P43238, NING13)	98910	NEGVIVKVSKEHVEE	[166]; [177]; [172]
32	VKVSKEHVEE		99757	VIVKVSKEHVEELTK	[166]
32	VKVSKEHVEE		100323	NEGVIVKVSKEHVEELTKHA	[169]; [170]; [74]
32	VKVSKEHVEE		106968	VKVSKEHVEELTKHAKSVSK	[74]
33	SEEEGDITNPINL	Ara h 1 (Q6PSU3, P43237, B3IXL2)	99657	SEEEGDITNPINLRE	[166]
33	SEEEGDITNPINL		190971	SEEEGDITNPINLREGEPLD	[170]

34	LAGDKDNVIDQI	Ara h 1 (P43238, N1NG13, Q6PSU3, P43237, B3IXL2)	100137	IFLAGDKDNVIDQIEKQAKD	[170]; [169]
34	LAGDKDNVIDQI		434746	IFLAGDKDNVIDQIEK + MCM(K7)	[173]
34	LAGDKDNVIDQI		434747	IFLAGDKDNVIDQIEK	[173]
35	LAGDKDNVIDQ	Ara h 1 (P43238, N1NG13, Q6PSU3, P43237, B3IXL2)	100137	IFLAGDKDNVIDQIEKQAKD	[170]; [169]
35	LAGDKDNVIDQ		434746	IFLAGDKDNVIDQIEK + MCM(K7)	[173]
35	LAGDKDNVIDQ		434747	IFLAGDKDNVIDQIEK	[173]
36	IVVVNKG TG NLEL	Ara h 1 (P43238, N1NG1, Q6PSU, P43237, B3IXL2)	98841	KAMVIVVVNKG TG NLEL VAV	[174]; [169]; [175]
36	IVVVNKG TG NLEL		148699	NSKAMVIVVVNKG TG NLEL V	[176]
36	IVVVNKG TG NLEL		190708	AMVIVVVNKG TG NLEL VAV	[170]
36	IVVVNKG TG NLEL		523259	NSKAMVIVVVNKG TG NLEL V AVRK	[171]
37	IVVVNKG TG NL	Ara h 1 (P43238, N1NG1, Q6PSU, P43237, B3IXL2)	98841	KAMVIVVVNKG TG NLEL VAV	[174]; [169]; [175]
37	IVVVNKG TG NL		148699	NSKAMVIVVVNKG TG NLEL V	[176]
37	IVVVNKG TG NL		190708	AMVIVVVNKG TG NLEL VAV	[170]
37	IVVVNKG TG NL		523259	NSKAMVIVVVNKG TG NLEL V VRK	[171]
37	IVVVNKG TG NL		99364	KAMVIVVVNKG TG NL	[172]; [166]
38	IVKVSKE	Ara h 1 (P43238, N1NG1, Q6PSU, P43237, B3IXL2)	98910	NEGVIVKVSKEHVEE	[166]; [177] ; [172]

38	IVKVSKE		100323	NEGV IVKVSKE EHVEELTKHA	[169]; [170]; [74]
38	IVKVSKE		99757	VIVKVSKE EHVEELTK	[166]
38	IVKVSKE		190967	RWSTRSSENNEGV IVKVSKE	[170]
38	IVKVSKE		191030	WSTRSSENNEGV IVKVSKE	[170]
39	IMPAAHPVAINA	Ara h 1 (P43238, NING1, Q6PSU, P43237, B3IXL2)	148649	KEGDVF IMPAAHPVAINA SS	[170]; [176]
39	IMPAAHPVAINA		99167	DVF IMPAAHPVAINA	[166]
39	IMPAAHPVAINA		190764	GDVF IMPAAHPVAINA SS	[170]
40	IMPAAHPVAIN	Ara h 1 (P43238, NING1, Q6PSU, P43237, B3IXL2)	148649	KEGDVF IMPAAHPVAINA SS	[170]; [176]
40	IMPAAHPVAIN		99167	DVF IMPAAHPVAINA	[166]
40	IMPAAHPVAIN		190764	GDVF IMPAAHPVAINA SS	[170]
41	IMPAAHPVA	Ara h 1 (P43238, NING1, Q6PSU, P43237, B3IXL2)	148649	KEGDVF IMPAAHPVAINA SS	[170]; [176]
41	IMPAAHPVA		99167	DVF IMPAAHPVAINA	[166]
41	IMPAAHPVA		190764	GDVF IMPAAHPVAINA SS	[170]
41	IMPAAHPVA		98843	KEGDVF IMPAAHPVA	[166]; [177]
41	IMPAAHPVA		540385	EGDVF IMPAAHPVAI	[172]

42	EVKPDKKNPQL	Ara h 1 (P43238, NING1, Q6PSU, P43237, B3IXL2)	99242	FEVKPDKKNPQLQDL	[166]
42	EVKPDKKNPQL		99283	GKLFVVKPDKKNPQL	[166]
42	EVKPDKKNPQL		148695	NNFGKLFVVKPDKKNPQLQD	[176]
42	EVKPDKKNPQL		190745	EVKPDKKNPQLQ	[178]; [170]
42	EVKPDKKNPQL		190750	FEVKPDKKNPQLQDLDMMLT	[170]
42	EVKPDKKNPQL		190877	NNFGKLFVVKPDKKNPQLQ	[170]
42	EVKPDKKNPQL		523002	NNFGRLFVVKPDKKNPQLQDL DMM	[171]
42	EVKPDKKNPQL		540393	EVKPDKKNPQLQDLD	[172]
43	EVKPDKKNPQ	Ara h 1 (P43238, NING1, Q6PSU, P43237, B3IXL2)	99242	FEVKPDKKNPQLQDL	[166]
43	EVKPDKKNPQ		99283	GKLFVVKPDKKNPQL	[166]
43	EVKPDKKNPQ		148695	NNFGKLFVVKPDKKNPQLQD	[176]
43	EVKPDKKNPQ		190745	EVKPDKKNPQLQ	[178]; [170]
43	EVKPDKKNPQ		190750	FEVKPDKKNPQLQDLDMMLT	[170]
43	EVKPDKKNPQ		190877	NNFGKLFVVKPDKKNPQLQ	[170]
43	EVKPDKKNPQ		523002	NNFGRLFVVKPDKKNPQLQDL DMM	[171]
43	EVKPDKKNPQ		540393	EVKPDKKNPQLQDLD	[172]
43	EVKPDKKNPQ		190729	DLSNNFGKLFVVKPDKKNPQ	[170]

43	EVKPKDKKNPQ		190876	NNFGKLFVVKPKDKKNPQ	[170]
44	EEGDITNPINL	Ara h 1 (P43238, N1NG13)	99657	SEEEGDITNPINLRE	[166]
44	EEGDITNPINL		190971	SEEEGDITNPINLREGEPL	[170]
45	DITNPINL	Ara h 1 (P43238, N1NG1, Q6PSU, P43237, B3IXL2)	98731	DITNPINLRE	[177]
45	DITNPINL		98732	DITNPINLREGEPL	[177]
45	DITNPINL		99196	EGDITNPINLREGEPL	[166]
45	DITNPINL		99657	SEEEGDITNPINLRE	[166]
45	DITNPINL		190971	SEEEGDITNPINLREGEPL	[170]

Tabela 8.4 Sekvence MPOP iz Ara h 3 (30), Ara h 1 (28) i Ara h 2 (2), pronađenim nakon *in vitro* oralno-gastroične digestije celog zrna sirovog kikirikija, uparenih sa Ara h 3 i Ara h 1 epitopima dobijenim iz IEDB baze podataka. Frakcija u kojoj su se nalazili MPOP je analizirana masenom spektrometrijom nakon redukcije, alkilacije i tripsinske digestije. Pronađeni epitopi u identifikovanim peptidima su boldirani i predstavljeni su sa svojim identifikacionim brojem (ID).

Broj Pept.	Peptidna sekvenca	Alergen aksioni broj	ID Epitop IEDB	Sekvenca IEDB Epitopa	Reference
1	AHVQVDSNG	Ara h 3 (Q647H4, Q8LKN1, Q6T2T4, A1DZF0, Q6IWG5, Q0GM57, E5G077, Q9SQH7)	99447	LRGRAHVQVDSNGN	[166]
1	AHVQVDSNG		99597	RAHVQVDSNGNRVY	[166]
2	ALRRPFYSNAPQE	Ara h 3 (Q647H4, Q8LKN1, Q6T2T4, Q9SQH7, A1DZF0)	99484	NALRRPFYSNAPQEI	[179]; [166]

3	IETWNPNNQE	Ara h 3 (Q647H4, Q8LKN1, Q6T2T4, A1DZF0, Q6IWG5, Q0GM57, E5G077, Q9SQH7)	25997	IETWNPNNQEFECAG	[141]
4	IQQGRGYFG	Ara h 3 (Q647H4, Q8LKN1, A1DZF0, Q9SQH7)	16280	FIQQGRGYFGLIFPG	[179]; [166]; [141]
4	IQQGRGYFG		99561	QEIFIQQGRGYFGLI	[179]; [166]
5	LKNNNPFKF	Ara h 3 (Q647H4, Q8LKN1, Q6T2T4, A1DZF0, Q6IWG5, Q0GM57, E5G077, Q9SQH7)	106026	QARQLKNNNPFKFFV	[179]
5	LKNNNPFKF		106042	QLKNNNPFKFFVPPS	[179]
6	LQEGHVLVVPQN		99440	LQEGHVLVVPQNAFV	[166]
6	LQEGHVLVVPQN		99141	DEELQEGHVLVVPQN	[166]
7	LQEGHVLVVPQNF	Ara h 3 (Q647H4, Q8LKN1, Q6T2T4, A1DZF0, Q6IWG5, Q0GM57, E5G077, Q9SQH7)	99440	LQEGHVLVVPQNAFV	[166]
8	LRILSPDR	Ara h 3 (Q647H4, Q8LKN1, Q6T2T4, A1DZF0)	71559	VTVRGGLRILSPDRK	[168]; [141]
8	LRILSPDR		99738	TVRGGLRILSPDRKR	[179]; [166]
8	LRILSPDR		70725	VRGGLRILSPDRKRR	[141]

8	LRILSPDR		99277	GGLRILSPDRKRRAD	[166]
8	LRILSPDR		105826	GGLRILSPDRKRRQQ	[179]
9	NGRAHVQVVDSENGN RVYDEE		99597	RAHVQVVDSENGNRVY	[166]
10	NIGRNRSPDIYNPQAG	Ara h 3 (Q647H4, Q8LKN1, Q6T2T4, A1DZF0)	99331	IGRNRSPDIYNPQAG	[179]; [166]; [141]
11	NNNPFKF	Ara h 3 (Q647H4, Q8LKN1, Q6T2T4, A1DZF0, Q6IWG5, Q0GM57, E5G077, Q9SQH7)	105988	NNNPFKFFVPPSEQS	[179]
11	NNNPFKF		106026	QARQLKNNNPFKFFV	[179]
11	NNNPFKF		106042	QLKNNNPFKFFVPPS	[179]
12	NRSPDIYNPQAG	Ara h 3 (Q647H4, Q8LKN1, Q6T2T4, A1DZF0)	99331	IGRNRSPDIYNPQAG	[179]; [166]; [141]
12	NRSPDIYNPQAG		99513	NRSPDIYNPQAGSLK	[179]; [166]
13	NRSPDIYNPQAGS	Ara h 3 (Q647H4, Q8LKN1, Q6T2T4, A1DZF0)	99513	NRSPDIYNPQAGSLK	[179]; [166]
14	NRSPDIYNPQAGSL	Ara h 3 (Q8LKN1, Q6T2T4, A1DZF0, Q647H4)	99513	NRSPDIYNPQAGSLK	[179]; [166]

15	NSYGLPR	Ara h 3 (Q647H4, Q8LKN1, Q6T2T4, A1DZF0, Q6IWG5, Q0GM57, E5G077, Q9SQH7)	105678	ANSYGLPREQARQLK	[179]
16	PDIYNPQAGSL	Ara h 3 (Q647H4, Q8LKN1, Q6T2T4, A1DZF0, Q6IWG5, Q0GM57, E5G077)	99513	NRSPDIYNPQAGSLK	[179]; [166]
17	QEGHVLVVPQNF	Ara h 3 (Q647H4, Q8LKN1, Q6T2T4, A1DZF0, Q6IWG5, Q0GM57, E5G077, Q9SQH7)	99440	LQEGHVLVVPQNFV	[166]
18	QLKNNNPFKF	Ara h 3 (Q6IWG5, Q0GM57, E5G077, Q9SQH7, Q647H4, Q8LKN1, Q6T2T4, A1DZF0)	106026	QARQLKNNNPFKFFV	[179]
18	QLKNNNPFKF		106042	QLKNNNPFKFFVPPS	[179]
19	RAHVQVVDSNGNRVY DEE	Ara h 3 (A1DZF0, Q6IWG5, Q0GM57, E5G077, Q9SQH7)	99597	RAHVQVVDSNGNRVY	[166]
20	RPFYSNAPQE	Ara h 3 (Q647H4, Q8LKN1, Q6T2T4, A1DZF0, Q9SQH7)	99484	NALRRPFYSNAPQEI	[179]; [166]

21	RPFYSNAPQEI	Ara h 3 (Q647H4, Q8LKN1, Q6T2T4, A1DZF0, Q6IWG5, Q0GM57, E5G077, Q9SQH7)	99484	NALRRPFYSNAPQEI	[179]; [166]
22	RSPDIYNPQAGSL	Ara h 3 (Q647H4, Q8LKN1, Q6T2T4, A1DZF0)	99513	NRSPDIYNPQAGSLK	[179]; [166]
23	SLPYSPYSPQ	Ara h 3 (Q647H4, Q8LKN1, Q6T2T4)	106093	RSLPYSPYSPQTQPK	[179]
23	SLPYSPYSPQ		106122	SRRRSLPYSPYSPQT	[179]
24	SLPYSPYSPQTQPK	Ara h 3 (Q8LKN1, Q6T2T4)	106093	RSLPYSPYSPQTQPK	[179]
25	SPDIYNPQAG	Ara h 3 (Q647H4, Q8LKN1, Q6T2T4, A1DZF0)	99331	IGRNRSPDIYNPQAG	[179]; [166]; [141, 168]
25	SPDIYNPQAG		99513	NRSPDIYNPQAGSLK	[179]; [166]
26	SPDIYNPQAGSL	Ara h 3 (Q647H4, Q8LKN1)	99513	NRSPDIYNPQAGSLK	[179]; [166]
27	SYGLPR	Ara h 3 (Q647H4, Q8LKN1, Q6T2T4)	105678	ANSYGLPREQARQLK	[179]
28	YEPAQQGR	Ara h 3 (Q9SQH7, Q8LKN1, Q6T2T4, A1DZF0, Q9SQH7)	105700	CPSTYEPAQQGRRH	[179]
28	YEPAQQGR		106150	TYEPAQQGRRHQSQ	[179]

29	YEPAQQGRR	Ara h 3 (Q647H4, Q8LKN1, Q6T2T4, A1DZF0)	105700	CPSTYEPAQQGRRH	[179]
29	YEPAQQGRR		106150	TYEPAQQGRRHQSQ	[179]
30	YGLPR	Ara h 3 (Q647H4, Q8LKN1, Q6T2T4, A1DZF0, Q6IWG5, Q0GM57, E5G077, Q9SQH7)	105678	ANSYGLPREQARQLK	[179]
30	YGLPR		106196	YGLPREQARQLKNNN	[179]
31	CLQSCQEPDDLKQK	Ara h 1 (P43238, NING13, Q6PSU3, P43237,B3I XL2)	98978	RCLQSCQEPDDLKQKACES	[169]; [175]
31	CLQSCQEPDDLKQK		190885	PCAQRCLQSCQEPDDLKQK	[170]
32	VVNKGTGNLE	Ara h 1 (P43238, NING13, Q6PSU3, P43237,B3I XL2)	99053	VVNKGTGNLELVAVR	[166]; [177]
32	VVNKGTGNLE		148699	NSKAMVIVVNKGTGNLELV	[176]
32	VVNKGTGNLE		190708	AMVIVVNKGTGNLELVAV	[170]
32	VVNKGTGNLE		523259	NSKAMVIVVNKGTGNLELV AVRK	[171]
33	VVNKGTGNL	Ara h 1 (P43238, NING13, Q6PSU3, P43237,B3I XL2)	98841	KAMVIVVNKGTGNLELVA V	[174]; [169]; [175]
33	VVNKGTGNL		99364	KAMVIVVNKGTGNL	[172]; [166]

33	VVVNKGTGNL		148699	NSKAMVIVVVNKGTGNLELV	[176]
33	VVVNKGTGNL		190708	AMVIVVVNKGTGNLELVAV	[170]
33	VVVNKGTGNL		523259	NSKAMVIVVVNKGTGNLELV AVRK	[171]
34	VVNKGTGNL		98841	KAMVIVVVNKGTGNLELVAV	[174]; [169]; [175]
34	VVNKGTGNL		99364	KAMVIVVVNKGTGNL	[172]; [166]
34	VVNKGTGNL	Ara h 1 (P43238, N1NG13, Q6PSU3, P43237,B3I XL2)	99053	VVNKGTGNLELVAVR	[166]; [177]
34	VVNKGTGNL		148699	NSKAMVIVVVNKGTGNLELV	[176]
34	VVNKGTGNL		148985	VVNKGTGNLELVAVRKEQQQ	[176]
34	VVNKGTGNL		190708	AMVIVVVNKGTGNLELVAV	[174]
34	VVNKGTGNL		523259	NSKAMVIVVVNKGTGNLELV AVRK	[171]
35	SFNLDEGHA		99616	RKSFNLDEGHALRIP	[172]; [166]
35	SFNLDEGHA	Ara h 1 (P43238, N1NG13, Q6PSU3, P43237,B3I XL2)	190952	RKSFNLDEGHALRIPSGFIS	[170]
35	SFNLDEGHA		191006	TVTIVANGNNRKSFNLDGHA	[170]
36	SEEEGDITNPINL	Ara h 1 (P43238, N1NG13)	99657	SEEEGDITNPINLRE	[166]

36	SEEEGDITNPINL		190971	SEEEGDITNPINLREGEPL	[170]
37	REGEPLDLSNNGKLF	Ara h 1 (P43238, N1NG13)	98979	REGEPLDLSNNGKLF	[177]
37	REGEPLDLSNNGKLF		190893	PINLREGEPLDLSNNGKLF	[170]
38	PKHADADNIL	Ara h 1 (P43238, N1NG13, Q6PSU3, P43237,B3I XL2)	100389	PNTLVLPKHADADNILVIQQ	[169]
38	PKHADADNIL		190791	IEAKPNTLVLPKHADADNIL	[170]
38	PKHADADNIL		190849	LPKHADADNILVIQQGQATV	[170]
38	PKHADADNIL		523624	PKHADADNILVIQQGQATV VANG	[171]
39	NNPFYFPSR	Ara h 1 (P43238, N1NG13, Q6PSU3, P43237,B3I XL2)	99031	TSRNNPFYFPSRRFS	[166]; [177]
39	NNPFYFPSR		99031	TSRNNPFYFPSRRFS	[166]; [177]
39	NNPFYFPSR		99607	RETSRNNPFYFPSR	[166]
39	NNPFYFPSR		100478	RNNPFYFPSRRFSTRYGNQN	[169]
39	NNPFYFPSR		148966	TSRNNPFYFPSRRFSTRYGN	[176]
39	NNPFYFPSR		190878	NNPFYFPSRRFSTRYGNQNG	[170]
39	NNPFYFPSR		190973	SHVRETSRNNPFYFPSRRF	[170]
39	NNPFYFPSR		540582	RNNPFYFPSRRFSTR	[172]
40	LAGDKDNVIDQ	Ara h 1 (P43238, N1NG13, Q6PSU3, P43237,B3I	100137	IFLAGDKDNVIDQIEKQAKD	[170]; [169]

40	LAGDKDNVIDQ	XL2)	434746	IFLAGDKDNVIDQIEK + MCM(K7)	[173]
40	LAGDKDNVIDQ		434747	IFLAGDKDNVIDQIEK	[173]
41	LAFPGSGEQVEKL	Ara h 1 (P43238, N1NG13, Q6PSU3, P43237)	98859	LAFPGSGEQVEKLIK	[177]
41	LAFPGSGEQVEKL		98859	LAFPGSGEQVEKLIK	[177]
41	LAFPGSGEQVEKL		190804	KDLAFPGSGEQVEKLIKQK	[170]
42	KGSEEEGDITNPIN	Ara h 1 (P43238, N1NG13)	98850	KGSEEEGDITNPIN	[166]; [177]
43	IVVVNKGTGNLE	Ara h 1 (P43238, N1NG13, Q6PSU3, P43237,B3I XL2)	98841	KAMVIVVVNKGTGNLELVA V	[174]; [169]; [175]
43	IVVVNKGTGNLE		523259	NSKAMVIVVVNKGTGNLELV AVRK	[171]
43	IVVVNKGTGNLE		190708	AMVIVVVNKGTGNLELVAV	[170]
43	IVVVNKGTGNLE		148699	NSKAMVIVVVNKGTGNLELV	[176]
44	ISMPVNTPGQF		100433	QNLRVAKISMPVNTPGQFED	[169]
44	ISMPVNTPGQF	Ara h 1 (P43238, N1NG13, Q6PSU3, P43237,B3I XL2)	190882	NQNLRVAKISMPVNTPGQFE	[170]
44	ISMPVNTPGQF		434773	VAKISMPVNTPGQFEDFFPAS SR + MCM(K3)	[173]
44	ISMPVNTPGQF		434774	VAKISMPVNTPGQFEDFFPAS SR	[173]
45	IMPAAHPVAINAS	Ara h 1 (P43238, N1NG13,	190764	GDFVIMPAAHPVAINASS	[170]

45	IMPAAHPVAINAS	Q6PSU3, P43237,B3I XL2)	148649	KEGDVFIMPAAHPVAINASS	[170]; [176]
46	IMPAAHPVAINA	Ara h 1 (P43238, NING13, Q6PSU3, P43237,B3I XL2)	190764	GDFVIMPAAHPVAINASS	[170]
46	IMPAAHPVAINA		148649	KEGDVFIMPAAHPVAINASS	[170]; [176]
46	IMPAAHPVAINA		99167	DVFIMPAAHPVAINA	[166]
47	IFLAGDKDNVIDQ	Ara h 1 (P43238, NING13, Q6PSU3, P43237,B3I XL2)	100137	IFLAGDKDNVIDQIEKQAKD	[170]; [169]
47	IFLAGDKDNVIDQ		434746	IFLAGDKDNVIDQIEK + MCM(K7)	[173]
47	IFLAGDKDNVIDQ		434747	IFLAGDKDNVIDQIEK	[173]
48	FQNLQHR	Ara h 1 (P43238, NING13, Q6PSU3, P43237,B3I XL2)	100445	QRSRQFQNLQHRIVQIEAK	[176]; [169]
48	FQNLQHR		99646	RSRQFQNLQHRIVQ	[166]
48	FQNLQHR		98971	QRSRQFQNLQHRIV	[177]; [172]
48	FQNLQHR		99239	FDQRSRQFQNLQHR	[166]
48	FQNLQHR		190748	FDQRSRQFQNLQHRIVQIE	[170]
48	FQNLQHR		190757	FQNLQHR I	[170]
48	FQNLQHR		190758	FQNLQHR IVQIEAKPNTLV	[170]
48	FQNLQHR		40406	FQNLQHR IVQIEAK	[172]
49	FIMPAAHPVAINA		Ara h 1 (P43238, NING13, Q6PSU3, P43237,B3I	148649	KEGDVFIMPAAHPVAINASS
49	FIMPAAHPVAINA		99167	DVFIMPAAHPVAINA	[166]

49	FIMPAAHPVAINA	XL2)	190764	GDFVIMPAAHPVAINASS	[170]
50	EDFFPASSRDQSSYLQ G	Ara h 1 (P43238, N1NG13, Q6PSU3, P43237,B3I XL2)	99243	FFPASSRDQSSYLQ	[166]
50	EDFFPASSRDQSSYLQ G		190749	FEDFFPASSRDQSSYLQGF	[170]
50	EDFFPASSRDQSSYLQ G		524091	QFEDFFPASSRDQSSYLQGF RNT	[171]
51	EDFFPASSRDQSSY	Ara h 1 (P43238, N1NG13, Q6PSU3, P43237,B3I XL2)	190749	FEDFFPASSRDQSSYLQGF	[170]
51	EDFFPASSRDQSSY		524091	QFEDFFPASSRDQSSYLQGF RNT	[171]
51	EDFFPASSRDQSSY		99241	FEDFFPASSRDQSSY	[166]
52	EDFFPASSRDQSS	Ara h 1 (P43238, N1NG13, Q6PSU3, P43237,B3I XL2)	190749	FEDFFPASSRDQSSYLQGF	[170]
52	EDFFPASSRDQSS		524091	QFEDFFPASSRDQSSYLQGF RNT	[171]
52	EDFFPASSRDQSS		99241	FEDFFPASSRDQSSY	[166]
52	EDFFPASSRDQSS		98955	QFEDFFPASSRDQSS	[177]
53	EDFFPASSR	Ara h 1 (P43238, N1NG13, Q6PSU3, P43237,B3I XL2)	99241	FEDFFPASSRDQSSY	[166]
53	EDFFPASSR		98955	QFEDFFPASSRDQSS	[177]
53	EDFFPASSR		190749	FEDFFPASSRDQSSYLQGF	[170]
53	EDFFPASSR		524091	QFEDFFPASSRDQSSYLQGF RNT	[171]
53	EDFFPASSR		434773	VAKISMPVNTPGQFEDFFPAS SR + MCM(K3)	[173]
53	EDFFPASSR		434774	VAKISMPVNTPGQFEDFFPAS SR	[173]
53	EDFFPASSR		99530	PGQFEDFFPASSRDQ	[166]
53	EDFFPASSR		100400	PVNTPGQFEDFFPASSRDQS	[169]
53	EDFFPASSR		19983	SMPVNTPGQFEDFFPASSRD	[170]
53	EDFFPASSR		421060	GQFEDFFPASSRDQS	[172]; [18]
54	DLAFPGSGEQVEKL	Ara h 1 (P43238,	99368	KDLAFPGSGEQVEKL	[18]; [166]

54	DLAFPGSGEQVEKL	NING13, Q6PSU3, P43237,B3I	190804	KDLAFPGSGEQVEKLIKQK	[170]
55	DLAFPGSGEQVEK	Ara h 1 (P43238, NING13, Q6PSU3, P43237,B3I	99368	KDLAFPGSGEQVEKL	[18]; [166]
55	DLAFPGSGEQVEK	XL2)	190804	KDLAFPGSGEQVEKLIKQK	[170]
56	CVYDPR	Ara h 1 (P43238, NING13)	99385	KLEYDPRCVYDPRGH	[166]
56	CVYDPR		99782	YDPRCVYDPRGHTGT	[166]
56	CVYDPR		99919	CVYDPRGHTGTNQRSPPGE	[169]
56	CVYDPR		100455	RCTKLEYDPRCVYDPRGHTG	[169]
56	CVYDPR		190820	KLEYDPRCVYDPRGHTGTTN	[170]
57	AENNHRIFF	Ara h 1 (P43238, NING13, Q6PSU3, P43237,B3I XL2)	100037	FGINAENNHRIFFLAGDKDNV	[169]
57	AENNHRIFF		190771	GINAENNHRIFFLAGDKDNVI	[170]
57	AENNHRIFF		190988	SSELHLLGFGINAENNHRIFF	[170]
57	AENNHRIFF		420973	FGINAENNHRIFFLAG	[172]; [18]
57	AENNHRIFF		521205	LHLLGFGINAENNHRIFFLAGD KDN	[171]
58	CLQSCQQEPDDLKQK ACESR	Ara h 1 (P43238, NING13, Q6PSU3, P43237,B3I XL2)	98953	QEPDDLKQKA	[177]
58	CLQSCQQEPDDLKQK ACESR		99129	CQQEPDDLKQKACES	[166]
58	CLQSCQQEPDDLKQK ACESR		99443	LQSCQQEPDDLKQKA	[166]
59	CMCEALQQIMENQ	Ara h 2 (Q6PSU2, Q6PSU2-2, Q6PSU2-3, Q6PSU2-4)	53291	RCMCEALQQIMENQSDRLQ G	[180]; [170]; [181]
59	CMCEALQQIMENQ		15608	FENNQRCMCEALQQIMENQ	[27]
59	CMCEALQQIMENQ		53290	RCMCEALQQIMENQSDRLQ	[27]
59	CMCEALQQIMENQ		178803	FENNQRCMCEALQQIMENQS	[180]

60	NLPQQCGLRAPQR	Ara h 2 (Q6PSU2, Q6PSU2-2, Q6PSU2-3, Q6PSU2-4)	33124	KRELRLNLPQQCGLRAPQRCD	[170]; [181]
60	NLPQQCGLRAPQR		39150	LRNLPQQCGLRAPQRCDLD	[27]
60	NLPQQCGLRAPQR		99448	LRNLPQQCGLRAPQR	[166], [182]
60	NLPQQCGLRAPQR		105306	LPQQCGLRAPQR	[183]
60	NLPQQCGLRAPQR		179200	LRNLPQQCGLRAPQRCDLDV	[180]
60	NLPQQCGLRAPQR		179375	QFKRELRLNLPQQCGLRAPQR	[180]
60	NLPQQCGLRAPQR		514924	ELRNLPQQCGLRAPQRCDLE VESG	[171]
60	NLPQQCGLRAPQR		515929	FKRELRLNLPQQCGLRAPQRC DLEV	[171]

9. Literatura:

1. Zhou, Y., et al., *Peanut Allergy, Allergen Composition, and Methods of Reducing Allergenicity: A Review*. Int J Food Sci, 2013. **2013**: p. 909140.
2. Bannon, G.A., *What makes a food protein an allergen?* Current Allergy and Asthma Reports, 2004. **4**(1): p. 43-6.
3. Pekar, J., D. Ret, and E. Untersmayr, *Stability of allergens*. Molecular Immunology, 2018. **100**: p. 14-20.
4. Schmitt, D.A., et al., *Processing can alter the properties of peanut extract preparations*. J Agric Food Chem, 2010. **58**(2): p. 1138-43.
5. Astwood, J.D., J.N. Leach, and R.L. Fuchs, *Stability of food allergens to digestion in vitro*. Nat Biotechnol, 1996. **14**(10): p. 1269-73.
6. Fu, T.J., U.R. Abbott, and C. Hatzos, *Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid-a comparative study*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(24): p. 7154-60.
7. Thomas, K., et al., *A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins*. Regul Toxicol Pharmacol, 2004. **39**(2): p. 87-98.
8. Ofori-Anti, A.O., et al., *Establishing objective detection limits for the pepsin digestion assay used in the assessment of genetically modified foods*. Regul Toxicol Pharmacol, 2008. **52**(2): p. 94-103.
9. Tantoush, Z., et al., *Green tea catechins of food supplements facilitate pepsin digestion of major food allergens, but hampers their digestion if oxidized by phenol oxidase*. Journal of Functional Foods, 2012. **4**(3): p. 650-660.
10. Maleki, S.J., et al., *Comparison of the Digestibility of the Major Peanut Allergens in Thermally Processed Peanuts and in Pure Form*. Foods (Basel, Switzerland), 2014. **3**(2): p. 290-303.
11. Koppelman, S.J., et al., *Digestion of peanut allergens Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, and Ara h 6: a comparative in vitro study and partial characterization of digestion-resistant peptides*. Mol Nutr Food Res, 2010. **54**(12): p. 1711-21.
12. Vieths, S., et al., *Digestibility of peanut and hazelnut allergens investigated by a simple in vitro procedure*. European Food Research and Technology, 1999. **209**(6): p. 379-388.
13. Plundrich, N.J., et al., *Stability and immunogenicity of hypoallergenic peanut protein-polyphenol complexes during in vitro pepsin digestion*. Food Funct, 2015. **6**(7): p. 2145-54.
14. Brodkorb, A., et al., *INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion*. Nat Protoc, 2019. **14**(4): p. 991-1014.
15. Minekus, M., et al., *A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus*. Food Funct, 2014. **5**(6): p. 1113-24.
16. Di Stasio, L., et al., *Peanut digestome: Identification of digestion resistant IgE binding peptides*. Food and Chemical Toxicology, 2017. **107**: p. 88-98.
17. Rao, H., et al., *In vitro digestibility and immunoreactivity of thermally processed peanut*. Food and Agricultural Immunology, 2018. **29**(1): p. 989-1001.

18. Bøgh, K.L., et al., *Digested Ara h 1 Loses Sensitizing Capacity When Separated into Fractions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. **60**(11): p. 2934-2942.
19. de Leon, M.P., J.M. Rolland, and R.E. O'Hehir, *The peanut allergy epidemic: allergen molecular characterisation and prospects for specific therapy*. Expert Reviews in Molecular Medicine, 2007. **9**(1): p. 1-18.
20. du Toit, G., et al., *Prevention of food allergy*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2016. **137**(4): p. 998-1010.
21. Taylor, S.L. and S.L. Hefle, *Food allergies and other food sensitivities*. Food Technol, 2001. **55**(9): p. 68-82.
22. Breiteneder, H. and E.N. Mills, *Molecular properties of food allergens*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(1): p. 14-23; quiz 24.
23. Astier, C., et al., *Predictive value of skin prick tests using recombinant allergens for diagnosis of peanut allergy*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2006. **118**(1): p. 250-6.
24. Lehmann, K., et al., *Structure and stability of 2S albumin-type peanut allergens: implications for the severity of peanut allergic reactions*. Biochemical Journal, 2006. **395**(3): p. 463-72.
25. Vadas, P., et al., *Detection of Peanut Allergens in Breast Milk of Lactating Women*. JAMA, 2001. **285**(13): p. 1746-1748.
26. Tordesillas, L., et al., *Skin exposure promotes a Th2-dependent sensitization to peanut allergens*. The Journal of clinical investigation, 2014. **124**(11): p. 4965-4975.
27. King, N., et al., *Allergenic characteristics of a modified peanut allergen*. Molecular Nutrition & Food Research, 2005. **49**(10): p. 963-71.
28. Mondoulet, L., et al., *Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(11): p. 4547-53.
29. Turner, P.J., et al., *Loss of allergenic proteins during boiling explains tolerance to boiled peanut in peanut allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **134**(3): p. 751-3.
30. Maleki, S.J., et al., *The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **106**(4): p. 763-8.
31. Vissers, Y.M., et al., *Effect of roasting on the allergenicity of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2/6: the necessity of degranulation assays*. Clin Exp Allergy, 2011. **41**(11): p. 1631-42.
32. Beyer, K., et al., *Effects of cooking methods on peanut allergenicity*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**(6): p. 1077-81.
33. Maleki, S.J., et al., *The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2003. **112**(1): p. 190-5.
34. Bernard, H., et al., *Identification of a new natural Ara h 6 isoform and of its proteolytic product as major allergens in peanut*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(23): p. 9663-9.
35. Burks, A.W., *Peanut allergy*. Lancet, 2008. **371**(9623): p. 1538-46.
36. Lieberman, J.A. and S.H. Sicherer, *Quality of life in food allergy*. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology, 2011. **11**(3): p. 236-242.

37. Shin, D.S., et al., *Biochemical and structural analysis of the IgE binding sites on ara h1, an abundant and highly allergenic peanut protein*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(22): p. 13753-9.
38. Sicherer, S.H., et al., *Prevalence of peanut and tree nut allergy in the US determined by a random digit dial telephone survey*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1999. **103**(4): p. 559-562.
39. Fung-Leung, W.P., et al., *Transgenic mice expressing the human high-affinity immunoglobulin (Ig) E receptor alpha chain respond to human IgE in mast cell degranulation and in allergic reactions*. Journal of Experimental Medicine, 1996. **183**(1): p. 49-56.
40. Sanchez-Mejorada, G. and C. Rosales, *Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors*. Journal of Leukocyte Biology, 1998. **63**(5): p. 521-533.
41. Cezmi A. Akdis, I.A., *The underlying mechanisms in allergy*, in *Global Atlas of Allergy*, C.A. Akdis, Editor. 2014, European Academy of Allergy and Clinical Immunology: Zurich. p. 39-42.
42. Larche, M., C.A. Akdis, and R. Valenta, *Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy*. Nature Reviews. Immunology, 2006. **6**(10): p. 761-771.
43. Berne, R.M., & Levy, M. N., *Physiology, 4TH Edition*, ed. Mosby. 2010. 836.
44. Guyton, A.C. and J.E. Hall, *Gastrointestinal physiology*, in *Textbook of Medical Physiology*. 1996, W. B. Saunders company: Philadelphia, PA, USA. p. 793-851.
45. Dressman JB, B.R., Dermentzoglou LC, Russell TL, Schmaltz SP, Barnett JL, Jarvenpaa KM., *Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women*. Pharmaceutical Research, 1990. **7**(7): p. 756-761.
46. Feldman, M. and C. Barnett, *Fasting gastric pH and its relationship to true hypochlorhydria in humans*. Dig Dis Sci, 1991. **36**(7): p. 866-9.
47. Moore, J.G., P.E. Christian, and R.E. Coleman, *Gastric emptying of varying meal weight and composition in man. Evaluation by dual liquid- and solid-phase isotopic method*. Dig Dis Sci, 1981. **26**(1): p. 16-22.
48. Rimoldi, M. and M. Rescigno, *Uptake and presentation of orally administered antigens*. Vaccine, 2005. **23**(15): p. 1793-6.
49. Stertman, L., E. Lundgren, and I. Sjöholm, *Starch microparticles as a vaccine adjuvant: only uptake in Peyer's patches decides the profile of the immune response*. Vaccine, 2006. **24**(17): p. 3661-8.
50. Chehade, M. and L. Mayer, *Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(1): p. 3-12; quiz 13.
51. Rescigno, M., et al., *Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria*. Nature Immunology, 2001. **2**(4): p. 361-7.
52. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells*. Annual Review of Immunology, 2003. **21**: p. 685-711.
53. Mowat, A.M., *Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens*. Nature Reviews. Immunology, 2003. **3**(4): p. 331-41.
54. Allez, M., et al., *Expansion of CD8+ T cells with regulatory function after interaction with intestinal epithelial cells*. Gastroenterology, 2002. **123**(5): p. 1516-26.

55. Grdic, D., et al., *Lack of local suppression in orally tolerant CD8-deficient mice reveals a critical regulatory role of CD8+ T cells in the normal gut mucosa*. *Journal of Immunology*, 1998. **160**(2): p. 754-62.
56. Panel, N.I.-S.E., et al., *Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel*. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2010. **126**(6 Suppl): p. S1-S58.
57. Yu, J.W., et al., *Accidental ingestions in children with peanut allergy*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2006. **118**(2): p. 466-472.
58. de Jonge, J.D., et al., *The importance of dietary control in the development of a peanut allergy model in Brown Norway rats*. *Methods*, 2007. **41**(1): p. 99-111.
59. Bock, S.A., A. Munoz-Furlong, and H.A. Sampson, *Fatalities due to anaphylactic reactions to foods*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2001. **107**(1): p. 191-3.
60. Viquez, O.M., C.G. Summer, and H.W. Dodo, *Isolation and molecular characterization of the first genomic clone of a major peanut allergen, Ara h 2*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2001. **107**(4): p. 713-717.
61. Vereda, A., et al., *Peanut allergy: Clinical and immunologic differences among patients from 3 different geographic regions*. *J Allergy Clin Immunol*, 2011. **127**(3): p. 603-7.
62. Ballmer-Weber, B.K., et al., *IgE recognition patterns in peanut allergy are age dependent: perspectives of the EuroPrevall study*. *Allergy*, 2015. **70**(4): p. 391-407.
63. Koppelman, S.J., et al., *Relevance of Ara h1, Ara h2 and Ara h3 in peanut-allergic patients, as determined by immunoglobulin E Western blotting, basophil-histamine release and intracutaneous testing: Ara h2 is the most important peanut allergen*. *Clinical & Experimental Allergy*, 2004. **34**(4): p. 583-590.
64. Cabanos, C., et al., *Expression, purification, cross-reactivity and homology modeling of peanut profilin*. *Protein Expr Purif*, 2010. **73**(1): p. 36-45.
65. Schwager, C., et al., *Peanut oleosins associated with severe peanut allergy-importance of lipophilic allergens for comprehensive allergy diagnostics*. *J Allergy Clin Immunol*, 2017. **140**(5): p. 1331-1338 e8.
66. Petersen, A., et al., *Peanut defensins: Novel allergens isolated from lipophilic peanut extract*. *J Allergy Clin Immunol*, 2015. **136**(5): p. 1295-301 e1-5.
67. Burks, A.W., et al., *Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1992. **90**(6 Pt 1): p. 962-9.
68. Dunwell, J.M., A. Purvis, and S. Khuri, *Cupins: the most functionally diverse protein superfamily?* *Phytochemistry*, 2004. **65**(1): p. 7-17.
69. Koppelman, S.J., et al., *Peanut allergen Ara h 3: Isolation from peanuts and biochemical characterization*. *Allergy*, 2003. **58**(11): p. 1144-1151.
70. Jong, D.E., et al., *Identification and partial characterization of multiple major allergens in peanut proteins*. *Clinical & Experimental Allergy*, 1998. **28**(6): p. 743-751.
71. Mari, A., et al., *Bioinformatics applied to allergy: Allergen databases, from collecting sequence information to data integration. The Allergome platform as a model*. *Cellular Immunology*, 2006. **244**(2): p. 97-100.

72. Cabanos, C., et al., *Crystal structure of the major peanut allergen Ara h 1*. *Molecular Immunology*, 2011. **49**(1): p. 115-123.
73. Koppelman, S.J., et al., *Heat-induced conformational changes of Ara h 1, a major peanut allergen, do not affect its allergenic properties*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(8): p. 4770-7.
74. Shreffler, W.G., et al., *Microarray immunoassay: Association of clinical history, in vitro IgE function, and heterogeneity of allergenic peanut epitopes*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2004. **113**(4): p. 776-782.
75. Wichers, H.J., et al., *The Major Peanut Allergen Ara h 1 and Its Cleaved-off N-Terminal Peptide; Possible Implications for Peanut Allergen Detection*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004. **52**(15): p. 4903-4907.
76. Wichers, H.J., et al., *The major peanut allergen Ara h 1 and its cleaved-off N-terminal peptide; possible implications for peanut allergen detection*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004. **52**(15): p. 4903-7.
77. Palmer, G.W., et al., *Comparative potency of Ara h 1 and Ara h 2 in immunochemical and functional assays of allergenicity*. *Clinical Immunology*, 2005. **115**(3): p. 302-312.
78. Offermann, L.R., et al., *Structural biology of peanut allergens*. *J Contemp Immunol*, 2015. **2**(1): p. 1-26.
79. Mylne, J.S., I. Hara-Nishimura, and K.J. Rosengren, *Seed storage albumins: biosynthesis, trafficking and structures*. *Functional Plant Biology*, 2014. **41**(7): p. 671-677.
80. Shewry, P.R. and A.S. Tatham, *The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution*. *The Biochemical journal*, 1990. **267**(1): p. 1-12.
81. Viquez, O.M., C.G. Summer, and H.W. Dodo, *Isolation and molecular characterization of the first genomic clone of a major peanut allergen, Ara h 2*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2001. **107**(4): p. 713-7.
82. Koppelman, S.J., et al., *Quantification of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2 in the peanut varieties Runner, Spanish, Virginia, and Valencia, bred in different parts of the world*. *Allergy*, 2001. **56**(2): p. 132-137.
83. Maleki, S.J., et al., *The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2003. **112**(1): p. 190-195.
84. Sen, M., et al., *Protein structure plays a critical role in peanut allergen stability and may determine immunodominant IgE-binding epitopes*. *J Immunol*, 2002. **169**(2): p. 882-7.
85. Barre, A., et al., *Homology modelling of the major peanut allergen Ara h 2 and surface mapping of IgE-binding epitopes*. *Immunology Letters*, 2005. **100**(2): p. 153-158.
86. Eigenmann, P.A., et al., *Identification of unique peanut and soy allergens in sera adsorbed with cross-reacting antibodies*. *J Allergy Clin Immunol*, 1996. **98**(5 Pt 1): p. 969-78.
87. Rabjohn, P., et al., *Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3*. *J Clin Invest*, 1999. **103**(4): p. 535-42.
88. Wen, H.-W., et al., *Peanut Allergy, Peanut Allergens, and Methods for the Detection of Peanut Contamination in Food Products*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2007. **6**(2): p. 47-58.

89. Jin, T., et al., *Crystal structure of Ara h 3, a major allergen in peanut*. *Molecular Immunology*, 2009. **46**(8): p. 1796-1804.
90. Piersma, S.R., et al., *Proteolytic processing of the peanut allergen Ara h 3*. *Mol Nutr Food Res*, 2005. **49**(8): p. 744-55.
91. Koppelman, S.J., et al., *Relevance of Ara h1, Ara h2 and Ara h3 in peanut-allergic patients, as determined by immunoglobulin E Western blotting, basophil-histamine release and intracutaneous testing: Ara h2 is the most important peanut allergen*. *Clin Exp Allergy*, 2004. **34**(4): p. 583-90.
92. Koppelman, S.J., et al., *Purification and immunoglobulin E-binding properties of peanut allergen Ara h 6: evidence for cross-reactivity with Ara h 2*. *Clinical and Experimental Allergy*, 2005. **35**(4): p. 490-7.
93. Chen, X., et al., *Ara h 2 and Ara h 6 Have Similar Allergenic Activity and Are Substantially Redundant*. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2013. **160**(3): p. 251-258.
94. Suhr, M., et al., *Isolation and characterization of natural Ara h 6: Evidence for a further peanut allergen with putative clinical relevance based on resistance to pepsin digestion and heat*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2004. **48**(5): p. 390-399.
95. Lehmann, K., et al., *Structure and stability of 2S albumin-type peanut allergens: implications for the severity of peanut allergic reactions*. *Biochemical Journal*, 2006. **395**(3): p. 463.
96. van der Valk, J.P.M., et al., *Mono-sensitisation to peanut component Ara h 6: a case series of five children and literature review*. *European journal of pediatrics*, 2016. **175**(9): p. 1227-1234.
97. Privalle, L., et al., *Heat stability, its measurement, and its lack of utility in the assessment of the potential allergenicity of novel proteins*. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2011. **61**(3): p. 292-5.
98. Wal, J.M., *Thermal processing and allergenicity of foods*. *Allergy*, 2003. **58**(8): p. 727-729.
99. Davis, P.J. and S.C. Williams, *Protein modification by thermal processing*. *Allergy*, 1998. **53**(46 Suppl): p. 102-5.
100. Doke, S., R. Nakamura, and S. Torii, *Allergenicity of Food Proteins Interacted with Oxidized Lipids in Soybean-sensitive Individuals*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1989. **53**(5): p. 1231-1235.
101. Kalluri, R., et al., *Reactive oxygen species expose cryptic epitopes associated with autoimmune goodpasture syndrome*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(26): p. 20027-32.
102. Sathe, S.K., S.S. Teuber, and K.H. Roux, *Effects of food processing on the stability of food allergens*. *Biotechnol Adv*, 2005. **23**(6): p. 423-9.
103. Lee, S.-Y., C.V. Morr, and E.Y.W. Ha, *Structural and Functional Properties of Caseinate and Whey Protein Isolate as Affected by Temperature and pH*. *Journal of Food Science*, 1992. **57**(5): p. 1210-1229.
104. Chung, S.Y., S.J. Maleki, and E.T. Champagne, *Allergenic properties of roasted peanut allergens may be reduced by peroxidase*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004. **52**(14): p. 4541-5.
105. Baynes, J.W., *Role of Oxidative Stress in Development of Complications in Diabetes*. *Diabetes*, 1991. **40**(4): p. 405.

106. Kristal, B.S. and B.P. Yu, *An Emerging Hypothesis: Synergistic Induction of Aging by Free Radicals and Maillard Reactions*. Journal of Gerontology, 1992. **47**(4): p. B107-B114.
107. Al-Mussawir, H.E., et al., *Effects of preparation methods on the allergenicity of peanut in a murine model of peanut-induced anaphylaxis*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2002. **109**(1): p. S182.
108. Chung, S.Y. and E.T. Champagne, *Association of end-product adducts with increased IgE binding of roasted peanuts*. J Agric Food Chem, 2001. **49**(8): p. 3911-6.
109. Blanc, F., et al., *Boiling peanut Ara h 1 results in the formation of aggregates with reduced allergenicity*. Mol Nutr Food Res, 2011. **55**(12): p. 1887-94.
110. Mondoulet, L., et al., *Influence of Thermal Processing on the Allergenicity of Peanut Proteins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(11): p. 4547-4553.
111. Tao, B., et al., *Extended boiling of peanut progressively reduces IgE allergenicity while retaining T cell reactivity*. Clinical & Experimental Allergy, 2016. **46**(7): p. 1004-1014.
112. Sebei, K., et al., *Lipids, proteins, phenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of seeds of peanuts (Arachis hypogaea l) cultivated in Tunisia*. Biological Research, 2013. **46**: p. 257-263.
113. Sen, M., et al., *Protein Structure Plays a Critical Role in Peanut Allergen Stability and May Determine Immunodominant IgE-Binding Epitopes*. The Journal of Immunology, 2002. **169**(2): p. 882-887.
114. Bogh, K.L., et al., *Digested Ara h 1 loses sensitizing capacity when separated into fractions*. J Agric Food Chem, 2012. **60**(11): p. 2934-42.
115. Kopper, R.A., et al., *Peanut protein allergens: Gastric digestion is carried out exclusively by pepsin*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2004. **114**(3): p. 614-618.
116. Eiwegger, T., et al., *Gastro-duodenal digestion products of the major peanut allergen Ara h 1 retain an allergenic potential*. Clinical & Experimental Allergy, 2006. **36**(10): p. 1281-1288.
117. van Boxtel, E.L., et al., *Legumin allergens from peanuts and soybeans: Effects of denaturation and aggregation on allergenicity*. Molecular Nutrition & Food Research, 2008. **52**(6): p. 674-682.
118. van Boxtel, E.L., et al., *Allergen Ara h 1 occurs in peanuts as a large oligomer rather than as a trimer*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(19): p. 7180-6.
119. Maruyama, N., et al., *The roles of the N-linked glycans and extension regions of soybean beta-conglycinin in folding, assembly and structural features*. European Journal of Biochemistry, 1998. **258**(2): p. 854-62.
120. Hempel, J., et al., *Ultrastructural deposition forms and bioaccessibility of carotenoids and carotenoid esters from goji berries (Lycium barbarum L.)*. Food Chemistry, 2017. **218**: p. 525-533.
121. Rodrigues, D.B., L.R. Mariutti, and A.Z. Mercadante, *An in vitro digestion method adapted for carotenoids and carotenoid esters: moving forward towards standardization*. Food Funct, 2016. **7**(12): p. 4992-5001.

122. Ferreira-Lazarte, A., et al., *Study on the digestion of milk with prebiotic carbohydrates in a simulated gastrointestinal model*. Journal of Functional Foods, 2017. **33**: p. 149-154.
123. Nehir El, S., et al., *In vitro digestibility of goat milk and kefir with a new standardised static digestion method (INFOGEST cost action) and bioactivities of the resultant peptides*. Food Funct, 2015. **6**(7): p. 2322-30.
124. Mamone, G., et al., *Tracking the Fate of Pasta (T. Durum Semolina) Immunogenic Proteins by in Vitro Simulated Digestion*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015. **63**(10): p. 2660-2667.
125. Korte, R., J. Bräcker, and J. Brockmeyer, *Gastrointestinal digestion of hazelnut allergens on molecular level: Elucidation of degradation kinetics and resistant immunoactive peptides using mass spectrometry*. Molecular Nutrition & Food Research, 2017. **61**(10): p. 1700130.
126. Capozzi, F. and A. Bordoni, *Foodomics: a new comprehensive approach to food and nutrition*. Genes & nutrition, 2013. **8**(1): p. 1-4.
127. Picariello, G., et al., *The frontiers of mass spectrometry-based techniques in food allergenomics*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(42): p. 7386-7398.
128. Wen, S., et al., *Discrimination of in vitro and in vivo digestion products of meat proteins from pork, beef, chicken, and fish*. PROTEOMICS, 2015. **15**(21): p. 3688-3698.
129. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
130. Candiano, G., et al., *Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis*. ELECTROPHORESIS, 2004. **25**(9): p. 1327-1333.
131. Wen, S., et al., *Discrimination of in vitro and in vivo digestion products of meat proteins from pork, beef, chicken, and fish*. Proteomics, 2015. **15**(21): p. 3688-98.
132. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Analytical Biochemistry, 1985. **150**(1): p. 76-85.
133. Owusu-Apenten, R., *Food Protein Analysis: Quantitative Effects On Processing*. 2002, New York, NY, USA: Marcel Dekker, Inc.
134. Shevchenko, A., et al., *In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes*. Nature Protocols, 2006. **1**(6): p. 2856-2860.
135. Apostolovic, D., et al., *Conformational stability of digestion-resistant peptides of peanut conglutins reveals the molecular basis of their allergenicity*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 29249.
136. Apostolovic, D., et al., *Reduction and alkylation of peanut allergen isoforms Ara h 2 and Ara h 6; characterization of intermediate- and end products*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1834**(12): p. 2832-42.
137. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
138. Smiljanic, K., et al., *In-depth quantitative profiling of post-translational modifications of Timothy grass pollen allergome in relation to environmental oxidative stress*. Environ Int, 2019. **126**: p. 644-658.
139. Shevchenko, A., et al., *In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes*. Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 2856-60.

140. Johnson, P.E., et al., *Quantitative Proteomic Profiling of Peanut Allergens in Food Ingredients Used for Oral Food Challenges*. *Anal Chem*, 2016. **88**(11): p. 5689-95.
141. Radosavljevic, J., et al., *Insights into proteolytic processing of the major peanut allergen Ara h 2 by endogenous peanut proteases*. *J Sci Food Agric*, 2010. **90**(10): p. 1702-8.
142. Kain, R.J., et al., *Study on the Effect of Control Variables on the Extraction of Peanut Protein Isolates from Peanut Meal (Arachis hypogaea L.)*. *American Journal of Food Technology*, 2009. **4**: p. 47-55.
143. Prodić, I., et al., *Thermal Processing of Peanut Grains Impairs Their Mimicked Gastrointestinal Digestion While Downstream Defatting Treatments Affect Digestomic Profiles*. *Foods*, 2019. **8**(10).
144. Walczyk, N.E., et al., *Peanut protein extraction conditions strongly influence yield of allergens Ara h 1 and 2 and sensitivity of immunoassays*. *Food Chem*, 2017. **221**: p. 335-344.
145. Prodic, I., et al., *Influence of peanut matrix on stability of allergens in gastric-simulated digesta: 2S albumins are main contributors to the IgE reactivity of short digestion-resistant peptides*. *Clin Exp Allergy*, 2018. **48**(6): p. 731-740.
146. Frye, E.B., et al., *Role of the Maillard Reaction in Aging of Tissue Proteins: ADVANCED GLYCATION END PRODUCT-DEPENDENT INCREASE IN IMIDAZOLIUM CROSS-LINKS IN HUMAN LENS PROTEINS*. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **273**(30): p. 18714-18719.
147. Khan, I.J., et al., *Evaluating pH-Induced Gastrointestinal Aggregation of Arachis hypogaea 1 Fragments as Potential Components of Peanut Allergy*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013. **61**(35): p. 8430-8435.
148. Rejon, J.D., et al., *The Pollen Coat Proteome: At the Cutting Edge of Plant Reproduction*. *Proteomes*, 2016. **4**(1).
149. Pacini, E., M. Guarnieri, and M. Nepi, *Pollen carbohydrates and water content during development, presentation, and dispersal: a short review*. *Protoplasma*, 2006. **228**(1-3): p. 73-7.
150. Schmidt, H., et al., *2-D DIGE analysis of the proteome of extracts from peanut variants reveals striking differences in major allergen contents*. *Proteomics*, 2009. **9**(13): p. 3507-21.
151. Flinterman, A.E., et al., *Children with peanut allergy recognize predominantly Ara h2 and Ara h6, which remains stable over time*. *Clin Exp Allergy*, 2007. **37**(8): p. 1221-8.
152. Bogh, K.L., et al., *IgE epitopes of intact and digested Ara h 1: a comparative study in humans and rats*. *Mol Immunol*, 2012. **51**(3-4): p. 337-46.
153. Chen, X., et al., *Conformational IgE epitopes of peanut allergens Ara h 2 and Ara h 6*. *Clin Exp Allergy*, 2016. **46**(8): p. 1120-1128.
154. van Boxtel, E.L., et al., *Peanut allergen Ara h 1 interacts with proanthocyanidins into higher molecular weight complexes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007. **55**(21): p. 8772-8.
155. Guillon, B., et al., *Heat processing of peanut seed enhances the sensitization potential of the major peanut allergen Ara h 6*. *Molecular nutrition & food research*, 2016. **60**(12): p. 2722-2735.

156. Bowman, C.C. and M.K. Selgrade, *Utility of rodent models for evaluating protein allergenicity*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2009. **54**(3, Supplement): p. S58-S61.
157. Piersma, S.R., et al., *Proteolytic processing of the peanut allergen Ara h 3*. Molecular Nutrition & Food Research, 2005. **49**(8): p. 744-755.
158. Dyer, S., et al., *Contribution of Chemical Modifications and Conformational Epitopes to IgE Binding by Ara h 3*. Foods, 2018. **7**(11).
159. Macierzanka, A., et al., *Emulsification alters simulated gastrointestinal proteolysis of β -casein and β -lactoglobulin*. Soft Matter, 2009. **5**(3): p. 538-550.
160. Malaki Nik, A., A.J. Wright, and M. Corredig, *Surface adsorption alters the susceptibility of whey proteins to pepsin-digestion*. Journal of Colloid and Interface Science, 2010. **344**(2): p. 372-381.
161. Vereda, A., et al., *Peanut allergy: Clinical and immunologic differences among patients from 3 different geographic regions*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2011. **127**(3): p. 603-607.
162. Otsu, K., R. Guo, and S.C. Dreskin, *Epitope analysis of Ara h 2 and Ara h 6: characteristic patterns of IgE-binding fingerprints among individuals with similar clinical histories*. Clinical & Experimental Allergy, 2015. **45**(2): p. 471-484.
163. Schocker, F., et al., *Prospective investigation on the transfer of Ara h 2, the most potent peanut allergen, in human breast milk*. Pediatric Allergy and Immunology, 2016. **27**(4): p. 348-355.
164. Wang, M., et al., *Peanut-induced intestinal allergy is mediated through a mast cell \times IgE \times Fc \times RI \times IL-13 pathway*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2010. **126**(2): p. 306-316.e12.
165. Wang, M., et al., *Combined blockade of the histamine H1 and H4 receptor suppresses peanut-induced intestinal anaphylaxis by regulating dendritic cell function*. Allergy, 2016. **71**(11): p. 1561-1574.
166. Flinterman, A.E., et al., *Peanut epitopes for IgE and IgG4 in peanut-sensitized children in relation to severity of peanut allergy*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2008. **121**(3): p. 737-743 e10.
167. Roug , P., et al., *Mapping and conformational analysis of IgE-binding epitopic regions on the molecular surface of the major Ara h 3 legumin allergen of peanut (Arachis hypogaea)*. Molecular Immunology, 2009. **46**(6): p. 1067-1075.
168. Beyer, K., et al., *Measurement of peptide-specific IgE as an additional tool in identifying patients with clinical reactivity to peanuts*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2003. **112**(1): p. 202-207.
169. Naganawa, Y., et al., *Epitope analysis of peanut allergen Ara h1 with oligoclonal IgM antibody from human B-lymphoblastoid cells*. Cytotechnology, 2008. **57**(2): p. 177-80.
170. Prickett, S.R., et al., *Ara h 1 CD4+ T cell epitope-based peptides: candidates for a peanut allergy therapeutic*. Clin Exp Allergy, 2013. **43**(6): p. 684-97.
171. Hoh, R.A., et al., *Single B-cell deconvolution of peanut-specific antibody responses in allergic patients*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2016. **137**(1): p. 157-167.
172. Ramesh, M., et al., *Peanut T-cell epitope discovery: Ara h 1*. J Allergy Clin Immunol, 2016. **137**(6): p. 1764-1771 e4.

173. Mattison, C.P., et al., *In vitro evaluation of digestive and endolysosomal enzymes to cleave CML-modified Ara h 1 peptides*. Food Sci Nutr, 2015. **3**(4): p. 273-83.
174. Voskamp, A.L., et al., *MHC class II expression in human basophils: induction and lack of functional significance*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e81777.
175. Shinmoto, H., et al., *Generation of mouse-human hybridomas secreting antibodies against peanut allergen Ara h1*. Cytotechnology, 2004. **46**(1): p. 19-23.
176. DeLong, J.H., et al., *Ara h 1-reactive T cells in individuals with peanut allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(5): p. 1211-8 e3.
177. Zhuang, Y. and S.C. Dreskin, *Redefining the major peanut allergens*. Immunol Res, 2013. **55**(1-3): p. 125-34.
178. Christiansen, A., et al., *High-throughput sequencing enhanced phage display enables the identification of patient-specific epitope motifs in serum*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 12913.
179. Rouge, P., et al., *Mapping and conformational analysis of IgE-binding epitopic regions on the molecular surface of the major Ara h 3 legumin allergen of peanut (Arachis hypogaea)*. Mol Immunol, 2009. **46**(6): p. 1067-75.
180. Pascal, M., et al., *In silico prediction of Ara h 2 T cell epitopes in peanut-allergic children*. Clin Exp Allergy, 2013. **43**(1): p. 116-27.
181. Glaspole, I.N., et al., *Characterization of the T-cell epitopes of a major peanut allergen, Ara h 2*. Allergy, 2005. **60**(1): p. 35-40.
182. Albrecht, M., et al., *Relevance of IgE binding to short peptides for the allergenic activity of food allergens*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **124**(2): p. 328-36, 336 e1-6.
183. Ivanciuc, O., et al., *AllerML: markup language for allergens*. Regul Toxicol Pharmacol, 2011. **60**(1): p. 151-60.

Biografija autora

Ivana Prodić rođena je 16. 07. 1984. u Novom Sadu. Osnovnu, srednju školu završila je u Novom Sadu. Prirodno-matematički fakultet - Novi Sad završava 2010. godine. Master akademske studije na studijskom programu Diplomirani biohemičar – master upisuje 2010. godine, koje završava oktobra 2011. godine. Doktorske akademske studije na studijskom programu Doktor biohemijskih nauka upisuje 2011. godine. Angažovana je kao istraživač saradnik na Inovacionom centru Hemijskog fakulteta u Beogradu, u periodu od 2016. godine do 2019. godine. Autor je 8 naučnih publikacija i 16 saopštenja na skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja. Majka je jednog deteta.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Ивана З. Продић

Број индекса ДБ 05/2011

Изјављујем да је докторска дисертација под насловом

**„Дигестомика алергена кикрикија и карактеризација фрагмената отпорних
на протеолизу“**

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

У Београду,

Потпис аутора

18.11. 2019

Ивана Продић

Образац 6.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ивана З. Продић

Број индекса ДБ 05/2011

Студијски програм Биохемија

Наслов рада

**„Дигестомика алергена кикирикија и карактеризација фрагмената отпорних
на протеолизу“**

Ментори

др Тања Ћирковић Величковић, Редовни професор, Универзитет у Београду -
Хемијски факултет, Дописни члан Српске академије наука и уметности

и

др Катарина Смиљанић, Виши научни сарадник, Универзитет у Београду -
Хемијски факултет

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској
верзији коју сам предала ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму
Универзитета у Београду.**

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

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

У Београду,

Потпис аутора

18. 11. 2019

Zvezda Radic

Изјава о коришћењу

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

„Дигестомика алергена кикрикија и карактеризација фрагмената отпорних на протеолизу“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

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

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду,

Потпис аутора

18.11.2019

Žane Rodić

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

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

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

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

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

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