

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET



Andrijana N. Nešić

**Efekti proteazne aktivnosti
aktinidina na integritet ćelija
intestinalnog epitela**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY



Andrijana N. Nešić

**Effects of actinidin protease activity
on intestinal epithelial cells' integrity**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

Članovi komisije:

1. **dr Marija Gavrović-Jankulović**, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet (mentor)
-

2. **dr Milica Popović**, docent, Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet
-

3. **dr Milena Čavić**, viši naučni saradnik, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Beograd
-

Zahvalnica

Zahvaljujem se svom mentoru, dr Mariji Gavrović-Jankulović na bezrezervnom poverenju tokom izrade ove disertacije i dugogodišnje saradnje. Hvala Vam na svim savetima i smernicama koji su doprineli mom sazrevanju u naučnom radu. Veliko hvala na podršci koja me je naučila da je i ono nemoguće ostvarivo ako postoji želja.

Veliku zahvalnost dugujem i dr Milici Popović, koja mi je nesebično pomagala u svakom pogledu, kako tokom ove disertacije, tako i dok sam pravila svoje prve "korake" u laboratoriji. Veliko hvala na uloženom vremenu i trudu tokom svih godina zajedničkog naučnog rada.

Neizmernu zahvalnost dugujem dr Mileni Čavić, koja mi je nesebično prenela znanje i pomagala tokom izrade ove disertacije. Svaki naizgled nerešiv problem je prevaziđen uz osmeh i hvala na tome! Hvala za svu podršku tokom prethodnih godina.

Hvala svim sadašnjim i bivšim kolegama iz laboratorije 429 koji su ulepšali svaki dan proveden u laboratoriji.

Zahvaljujem se svim kolegama iz laboratorija 434 i 403 na nesebičnoj pomoći u svakom trenutku.

Veliko hvala svim mojim prijateljima koji su uz mene svakodnevno, već godinama, dajući mi vetar u leđa pri svakom napravljenom koraku! Ne imenujem vas, jer ne postoji redosled koji bi bio pravi.

Porodici i svojoj najvećoj podršci dugujem najveću zahvalnost, bratu Urošu i roditeljima Sabini i Nebojši. Hvala vam što ste verovali u mene i onda kada ni sama nisam!

Kada bih želela da rečima opišem koliko sam ti zahvalna ne bih mogla! Hvala mom Marku, mom osloncu, koji svaki moj dan ulepšava i čini ga kompletnim!

Mojim roditeljma, Sabini i Nebojši,

bez kojih ništa ne bi bilo moguće

Sažetak

Efekti proteazne aktivnosti aktinidina na integritet ćelija intestinalnog epitela

Gastrointestinalna barijera izgrađena je od veoma kompleksne mreže ćelija, mukusa i drugih važnih komponenti imunog sistema. Epitelni sloj ćelija gastrointestinalnog trakta predstavlja važnu komponentu urođene imunosti koja na dinamičan način održava homeostazu. Međutim, narušavanje integriteta gastrointestinalne barijere može se nepovoljno odraziti na organizam. Takav poremećaj dovodi do razvoja alergije na hranu, koja predstavlja neprimeren odgovor ćelija imunog sistema na proteine hrane. Epitelne ćelije gastrointestinalnog trakta, kao posledica kontakta sa alergenom hrane, utiču na komponente imunog sistema (smeštene u sloju *lamina propria*) u pravcu razvoja Th2 ćelijskog odgovora i proizvodnje specifičnih IgE antitela.

Alergije na hranu nastaju kao posledica narušavanja imunološkog odgovora označenog kao oralna toleranca na proteine hrane koji podrazumeva kako proizvodnju specifičnih regulatornih ćelija tako i sintezu određenih signalnih molekula. Alergijske reakcije izazivaju širok spektar kliničkih simptoma i mogu se manifestovati od vrlo blagih reakcija do fatalnih, kao što je anafilaktički šok.

Alergeni hrane koji poseduju proteaznu aktivnost u gastrointestinalnom traktu mogu da dovedu do narušavanja integriteta intestinalne barijere i time izazovu neprimerenu reakciju imunog sistema. Osim što pokazuju otpornost na proteolizu i drastične uslove digestivnog trakta, proteaze iz hrane mogu da zadrže i imunogena svojstva. Alergija na kivi je veoma rasprostranjena i značajan je uzročnik alergija na voće. Glavni alergen ploda zelenog kivija, aktinidin (Act d 1), je cistein proteaza (EC 3.4.22.14) koja je ujedno najzastupljeniji i najvažniji alergen kivija, čineći preko 50 % ukupnih solubilnih proteina kivija.

U ovoj disertaciji ispitivan je efekat aktinidina i posledice njegove proteazne aktivnosti na epitelne ćelije gastrointestinalnog trakta. Ispitivani su

Efekti proteazne aktivnosti aktinidina na integritet ćelija intestinalnog epitela

efekti na *in vitro* i *in vivo* model sistemu. Pokazano je da proteazna aktivnost aktinidina narušava integritet gastrointestinalne barijere kod C57BL/6 soja miševa. Isto zapažanje potvrđeno je i na humanim intestinalnim epitelnim Caco-2 ćelijama. Proteolitički aktivan aktinidin dovodi do raskidanja proteina čvrstih veza (okludina, ZO 1, kladina 3 i E-kadherina) u ispitivanim Caco-2 ćelijama i 2D organoidima dobijenim iz mišjih intestinalnih epitelih ćelija. Sa druge strane, aktivan aktinidin utiče na ekspresiju iRNK za proteine čvrstih veza u *in vitro* studijama, dok u mišjem modelu dovodi do istih posledica, ali diferencijalno, u različitim delovima intestinalnog trakta (proksimalnom, distalnom i kolonu).

U okviru ove disertacije, takođe, ispitan je i aktivacioni potencijal Act d 1 na intestinalne epitelne ćelije 2D organoida i Caco-2 ćelije za proizvodnju specifičnih proinflamatornih i proalergenih citokina. Rezultati su pokazali da proteolitički aktivan enzim dovodi do povećane ekspresije informacione ribonukleinske kiseline (iRNK) za proinflamatorne i proalergene citokine (interleukin $1-\beta$ (IL $1-\beta$), faktor nekroze tumora α (TNF α), timusni stromalni limfopietin (TSLP), interleukin 33 (IL-33)), kao i do sinteze i sekrecije IL $1-\beta$, TNF α , TSLP i IL-33 *in vitro*. Važno je napomenuti da je, u ovoj disertaciji, po prvi put ustanovljena veza između dejstva aktinidina i aktivacije NF- κ B signalnog puta *in vitro*.

Ključne reči: Act d 1, aktinidin, alergija na hranu, NF- κ B, čvrste veze

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

Effects of actinidin protease activity on intestinal epithelial cells' integrity

Abstract

Effects of actinidin protease activity on intestinal epithelial cells' integrity

The gastrointestinal (GI) barrier consists of a complex network of cells, mucus and other important components of the immune system. The epithelial cell layer of the gastrointestinal tract (GIT) is an important component of innate immunity, which dynamically maintains homeostasis. Therefore, disruption of the integrity of the gastrointestinal barrier can adversely affect the body. Food allergy, an inappropriate response of immune cells to food proteins, is an example of homeostasis disruption. After contact with a food allergen, gastrointestinal epithelial cells stimulate immune cells of *lamina propria* to induce Th2 cell response and produce specific immunoglobulin E (IgE).

Oral tolerance is a normal response of the immune system to food proteins, which includes the production of specific regulatory cells and signal molecules. Disruption of oral tolerance gives rise to food allergy with a wide array of clinical symptoms from mild to life-threatening anaphylaxis.

Food allergens with protease activity can impair the integrity of the gastrointestinal barrier and thus cause an inappropriate response of the immune system. These allergens are resistant to proteolysis in the harsh environment of the digestive tract and can also be immunogenic. Allergy to kiwi is among the most common fruit allergies with worldwide prevalence. Actinidin (Act d 1), cysteine protease (EC 3.4.22.14) is the most abundant allergen of green kiwi-fruit.

In this dissertation, the effect of Act d 1 proteolytic activity on gastrointestinal epithelial cells was investigated *in vitro* and *in vivo*. It is shown that the proteolytic activity of actinidin impairs the integrity of the gastrointestinal barrier in C57BL/6 mice. The same was confirmed in human intestinal epithelial Caco-2 cells. Actinidin hydrolyzes tight junction (TJ) proteins *in situ* (occludin, ZO 1, claudin 3 and E-cadherin) in Caco-2 cells and 2D organoids derived from murine intestinal epithelial cells. Additionally, active actinidin affects the expression of mRNA for tight junction proteins *in vitro*. *In vivo* study in mouse animal model confirmed the results from *in vitro* study. *In*

Effects of actinidin protease activity on intestinal epithelial cells' integrity

in vivo study also showed that the effect of actinidin on the mRNA expression of tight junction proteins depends on the segment of the intestinal tract examined (proximal, distal or colon).

Potential of Act d 1 to activate intestinal epithelial cells (2D organoids and Caco-2 cells) for the production of specific pro-inflammatory and pro-allergic cytokines was also examined in this dissertation. The results indicate that proteolytically active actinidin stimulates expression of pro-inflammatory and pro-allergic cytokines: interleukin 1- β (IL1- β), tumor necrosis factor α (TNF α), thymic stromal limphopietin (TSLP), interleukin 33 (IL-33) *in vitro*. It is important to note that, for the first time in the literature, a link has been established between the action of actinidin and the activation of the NF- κ B signaling pathway *in vitro*.

Keywords: Act d 1, actinidin, food allergy, NF- κ B, tight junction

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Biochemistry

Spisak skraćenica:

Act d 1 - aktinidin

ANOVA - analiza varijanse (*Analysis of variance*)

APĆ - antigen prikazujuće ćelije

APS - amonijum-persulfat

BCA - bicinhonska kiselina (*bicinchoninic acid*)

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

BLG - β -laktoglobulin

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

CBB - *Coomassie Brilliant Blue*

cDNK - komplementarna dezoksiribonukleinska kiselina

CLN - kladin

DC- dendritska ćelija

DTNB - 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoeva kiselina)

DTT - ditionitrol

E-64- N-(trans-Epoksisukcinil)-L-leucin 4-guanidinobutilamid

EDTA - etilendiamintetrasirćetna kiselina

ELISA - imunosorbentni esej povezan sa enzimom- (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

ESI - *electrospray*

FAO - Organizacija za hranu i poljoprivredu (*Food and Agricultural Organization of the United Nations*)

GALT - limfoidno tkivo povezano sa gastrointestinalnim traktom

GAPDH - gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

Spisak skraćenica

GIT - gastrointestinalni trakt

IAA - jodoacetamid

IEĆ - intestinalne epitelne ćelije

IgA - imunoglobulin A

IgE - imunoglobulin E

IL - interleukin

iRNK - informaciona ribonukleinska kiselina

LTP - protein koji transferuju lipide

MALDI - *Matrix-assisted laser desorption/ionization*

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

MLČ - mezenterični limfni čvor

MM – molekulski marker

MS – masena spektroskopija

MTT - 3-(4,5-dimetil(tiazol-2-il)-3,5-difenil-tetrazolijum-bromid

NBT - *4-nitroblue tetrazolium*

NC - nitroceluloza

OAS - oralni alergijski sindrom

OCLN - okludin

PAA - poliakrilamid

PBS - fosfatom puferisani fiziološki rastvor

PCR - lančana reakcija polimeraze

PR - protein povezan sa patogenezom

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

Spisak skraćenica

ROS - reaktivne kiseonične vrste

RT-PCR – Lančana reakcija polimeraze kojoj prethodi reverzna transkripcija

SD - standardna devijacija

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

SP – sulfo-propil

TBS- TRIS-om puferisan fiziološki rastvor

TEER - transepitelni električni otpor

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

TLP - taumatinu-sličan protein

TNF α - faktor nekroze tumora α (*Tumor Necrosis Factor*)

TOF – *time of flight*

Treg - T regulatorne ćelije

TSLP - stromalni limfopoietin timusa

UV– ultraljubičasto (*Ultraviolet*)

WHO - Svetska zdravstvena organizacija (*World Health Organization*)

ZO - *zonula occlude*

Sadržaj:

1. Uvod	1
2. Teorijski deo.....	3
2.1. Gastrointestinalna barijera: uloga u fiziološkom i patološkom stanju.....	3
2.1.1. Organizacija epitelne barijere i limfoidnog tkiva povezanog sa gastrointestinalnim traktom	3
2.1.2. Strukturne komponente čvrstih veza	8
2.1.3. Prepoznavanje i preuzimanje antigena u intestinumu.....	13
2.1.4. Prolaz antigena kroz epitelnu barijeru	14
2.2. Homeostaza i disfunkcija intestinalne barijere	15
2.2.1. Regulacija intestinalne barijere.....	16
2.2.2. Oralna toleranca	18
2.3. Eksperimentalne tehnike za praćenje funkcije intestinalne barijere	20
2.3.1. Model sistemi za izučavanje transepitelne propustljivosti	21
2.4. Alergija na hranu	22
2.4.1. Alergija na hranu posredovana IgE antitelima	23
2.4.2. Molekulski procesi koji dovode do senzitivacije na alergene hrane.....	29
2.5. Alergija na kivi	32
2.5.1. Epidemiologija, patogeneza i klinički simptomi alergije na kivi.....	34
2.5.2. Alergeni kivija.....	36
2.5.3. Aktinidin.....	38
2.5.3.1. Struktura aktinidina.....	38
3. Ciljevi.....	41
4. Rezultati	42
4.1. Prečišćavanje aktinidina iz sirovog ekstrakta ploda zelenog kivija	42
4.2. Karakterizacija prečišćenog preparata aktinidina	42
4.2.1. Masena analiza prečišćenog aktinidina.....	44
4.2.2. Proteolitička aktivnost preparata aktinidina	47
4.3. Optimizacija uslova aktivacije aktinidina.....	48
4.3.1. Aktivacija aktinidina inkubacijom sa ditiotreitolum (DTT).....	48
4.3.2. Aktivacija aktinidina inkubacijom u medijumu za uzgajanje ćelija	49
4.4. Uticaj aktinidina na propustljivost gastrointestinalne barijere	52
4.4.1. Aktinidin dovodi do povećane intestinalne permeabilnosti <i>in vivo</i>	52
4.4.2. Aktinidin povećava propustljivost epitelnog monosloja <i>in vitro</i>	53

4.5.	Uticaj aktinidina na proteine čvrstih veza <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>	55
4.6.	Uticaj aktinidina na gensku ekspresiju i sekreciju citokina <i>in vitro</i>	60
4.7.	Aktinidin aktivira NF- κ B signalni put <i>in vitro</i>	64
4.8.	Identifikacija fizioloških supstrata aktinidina <i>in vitro</i>	66
5.	Diskusija	68
5.1.	Aktivacija aktinidina u medijumu za gajenje ćelija	68
5.2.	Aktinidin narušava integritet intestinalne barijere	68
5.3.	Aktinidin utiče na ekspresiju iRNK za proteine čvrstih veza	70
5.4.	Aktinidin reguliše ekspresiju iRNK citokina	72
5.5.	Aktinidin dovodi do sekrecije proinflamatornih i proalergenih citokina.....	73
6.	Zaključak	75
7.	Materijal i metode	76
7.1.	Prečišćavanje aktinidina	76
7.2.	Analitičke tehnike	76
7.2.1.	Određivanje koncentracije proteina bicinoninskom metodom	76
7.2.2.	Masena spektrometrija.....	77
7.2.3.	Kvantifikacija endotoksina u preparatu aktinidina.....	78
7.2.4.	Protočna citometrija	78
7.2.5.	Denzitometrijska analiza agaroznih gelova.....	79
7.3.	Hromatografske tehnike	79
7.3.1.	Prečišćavanje Act d 1 na koloni SP-Sephadex-a C-50	79
7.3.2.	Prečišćavanje Act d 1 na koloni QAE-Sephadex A-50	79
7.4.	Kazeinolitički esej	80
7.4.1.	Aktivacija aktinidina.....	80
7.5.	Elektroforetske tehnike	81
7.5.1.	Agarozna gel elektroforeza	81
7.5.2.	Natrijum dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS PAGE) ...	81
7.6.	Imunohemijske tehnike	83
7.6.1.	Detekcija proteina u imunoblotu (opšti protokl)	83
7.6.2.	Imunofluorescentno bojenje ćelija	84
7.6.3.	Imunosorbentni esej povezan sa enzimom	85
7.7.	Molekularno-biološke metode.....	87
7.7.1.	Kultura ćelija	87
7.7.1.1.	Odmrzavanje ćelija	87
7.7.1.2.	Održavanje ćelijske kulture.....	88
7.7.1.3.	Pasažiranje ćelija.....	88

7.7.1.4.	Zamrzavanje ćelija.....	89
7.7.1.5.	Brojanje ćelija.....	89
7.7.1.6.	Postupak određivanja vijabilnosti ćelija	90
7.7.1.7.	Merenje transepitelnog električnog otpora	91
7.7.1.8.	Transfekcija ćelija.....	91
7.7.1.9.	Određivanje citotoksičnosti aktinidina	92
7.8.	Molekularno-genetičke metode	92
7.8.1.	Izolovanje ukupne RNK.....	92
7.8.1.1.	Reverzna transkripcija	93
7.8.2.	Reakcija lančanog umnožavanja (<i>Polymerase chain reaction – PCR</i>) ...	94
7.8.3.	Kvantitativni PCR u realnom vremenu (qRT-PCR)	94
7.9.	Rad sa životinjskim model sistemom	96
7.9.2.	<i>In vivo</i> ekspresija iRNK proteina čvrstih veza	97
7.9.3.	Uzgojanje 2D organoida iz intestinalnih ćelija miša	97
7.10.	Statistička obrada podataka	99
8.	Literatura	100
	Biografija	117
	Изјава о ауторству	119
	Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада	120
	Изјава о коришћењу	121

1. Uvod

Alergija na hranu predstavlja hroničnu inflamatornu bolest koja izaziva različite kliničke simptome i utiče na kvalitet života pojedinaca (1). Od alergije na hranu pati veliki broj ljudi, a statistički podaci ukazuju na to da su prisutne kod oko 2-6 % dece i 1-2 % odraslih osoba (2,3) i da je broj obolelih osoba u konstantnom porastu (4).

Razvoj alergije na hranu započinje fazom senzitivacije u kojoj alergen prolazi kroz mukoznu površinu gastrointestinalnog trakta kao imunološki reaktivan molekul. Nakon dalje obrade alergena i njegove prezentacije od strane ćelija imunog sistema, finalni događaj je lučenje specifičnih IgE antitela od strane plazma ćelija (5,6). Gastrointestinalna barijera učestvuje u održavanju i regulaciji homeostaze intestinuma i predstavlja prvu liniju odbrane od različitih antigena iz spoljašnje sredine. Epitelne ćelije gastrointestinalnog trakta imaju veoma važnu ulogu tokom faze senzitivacije na određeni alergen. Kao odgovor na prisustvo alergena, epitelne ćelije proizvode specifične citokine, hemokine i druge biološki aktivne molekule koji predstavljaju signal komponentama imunog sistema u mukoznom tkivu da pokrenu reakciju (7). Epitelne ćelije su međusobno povezane veoma kompleksnom mrežom proteina koji se nalaze u međućelijskom prostoru i učestvuju u regulaciji prolaska antigena kroz intestinalnu barijeru. Proteini međućelijskih veza imaju različite funkcije u održavanju intestinalne homeostaze: jedni učestvuju u formiranju pora između ćelija, drugi predstavljaju integralne komponente povezane sa citoskeletom, dok treći obezbeđuju mehaničku potporu ćeliji.

Širok spektar kliničkih manifestacija je zabeležen kod alergija na hranu, ali mehanizam koji leži u osnovi ovih poremećaja nije u potpunosti rasvetljen. Brojne činjenice su poznate, a najznačajnija je da poremećaj u intestinalnoj epitelnoj barijeri dovodi do narušavanja oralne tolerance prema određenim antigenima hrane (3,8). Odgovor epitelnih ćelija na alergene hrane je proizvodnja specifičnih Th2 proalergenih citokina koji omogućavaju preključivanje klasa imunoglobulina ka sintezi IgE antitela (9).

Kivi predstavlja bogat izvor hranljivih materija i pozitivno utiče na zdravlje ljudi (10). Međutim, osim povoljnih efekata po čoveka, kivi može dovesti i do alergijske reakcije štetne po zdravlje (11). Alergija na kivi je danas široko rasprostranjena, a simptomi se kreću od lakših - poput oralnog alergijskog sindroma i urtikarije, do anafilaktičkog šoka koji može biti smrtonosan. Do sada je u plodu kivija identifikovano 13 alergena. Aktinidin (Act d 1) pripada klasi cistein proteaza i čini oko 50 % ukupnih solubilnih proteina kivija (12). Smatra se glavnim alergenom kod monosenzitiziranih pacijenata na kivi (13, 14). Aktinidin se u plodu kivija može naći u aktivnoj i neaktivnoj formi (15, 16). Takođe, ova cistein proteaza može da, bez narušavanja strukture i gubitka proteolitičke aktivnosti, opstane u simuliranim uslovima želudačne digestije i do 2 h (16).

Mehanizam senzitivacije na aktinidin nije u potpunosti rasvetljen. Ova disertacija je imala za cilj da doprinese razumevanju dejstva aktinidina na modulaciju imunog odgovora u gastrointestinalnog trakta. U te svrhe korišćeni su različiti model sistemi (*in vivo* i *in vitro*) i, po našem saznanju, prvi put u naučnoj zajednici, upotrebljeni su mišji 2D organoidi dobijeni iz pluripotentne matične ćelije za testiranje aktivacionog potencijala alergena hrane.

Rezultati ove disertacije doprinose boljem razumevanju mehanizma dejstva aktinidina na epitelne ćelije kao i efekata na molekulskom nivou koji nastaju kao posledica ovih interakcija. Aktivna forma aktinidina dovodi do narušavanja integriteta intestinalne epitelne barijere i time omogućava inicijalni korak koji doprinosi nastanku alergije na kivi.

2. Teorijski deo

2.1. Gastrointestinalna barijera: uloga u fiziološkom i patološkom stanju

Organizam čoveka ima nekoliko mukoznih epitelnih površina koje doprinose formiranju zaštitne barijere od spoljašnje sredine. Gastrointestinalni trakt (GIT) predstavlja jednu od najvećih mukoznih površina koja igra ključnu ulogu u regulaciji imunog sistema (17). Gastrointestinalni trakt čoveka sastoji se od nekoliko organa kompleksne ćelijske i funkcionalne strukture. Svoju najvažniju ulogu ostvaruje kroz veoma kompleksnu selektivno propustljivu barijeru, čime se, sa jedne strane, omogućava apsorpcija različitih hranljivih materija, dok se sa druge strane ograničava prolaz potencijalno štetnih molekula. Regulacija ovih procesa ostvaruje se kroz interakcije sa intestinalnom mukozom i time doprinosi održavanju integriteta intestinalne barijere i imunološkoj homeostazi (18).

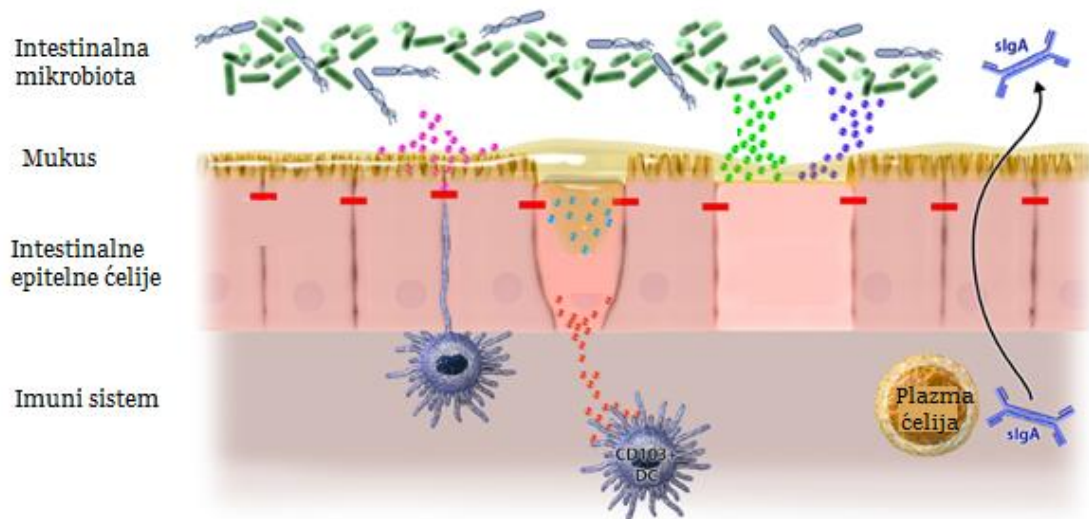
2.1.1. Organizacija epitelne barijere i limfoidnog tkiva povezanog sa gastrointestinalnim traktom

Tanko crevo je glavni organ koji učestvuje u razvoju oralne tolerance na unete antigene, kao i u započinjanju alergije na hranu. Čelije, zajedno sa ostalim strukturama tankog creva, igraju važnu ulogu kako u propustljivosti samog creva, tako i u uspostavljanju imunološke homeostaze, omogućujući da komponente iz hrane dođu u kontakt sa mukoznim imunim ćelijama, orkestrirajući pritom specifičan odgovor (19).

Crevna mikrobiota učestvuje u metaboličkim, nutritivnim i imunološkim procesima u telu. Intestinalne epitelne ćelije predstavljaju prvi senzor u kontaktu sa sadržajem hrane i crevnom mikrobiotom i taj signal prevode u anti-mikrobni i imunoregulatorni odgovor (**slika 1**) (20).

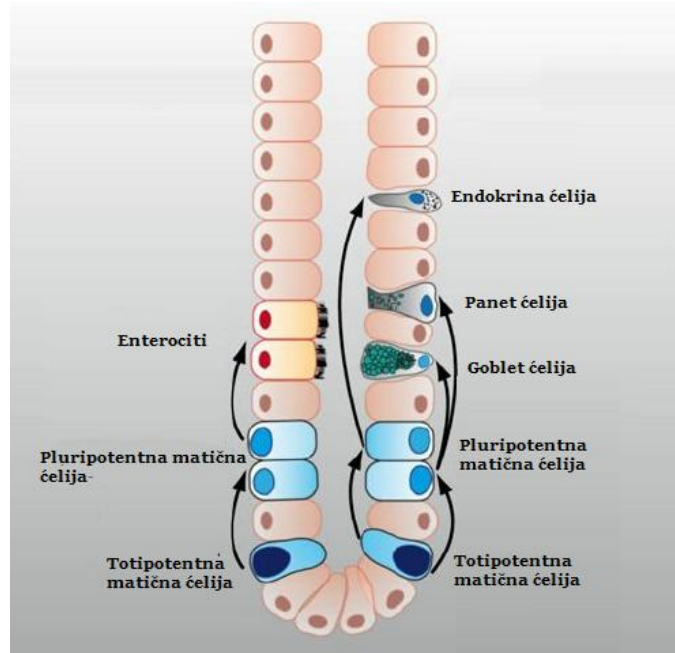
Crevni epitel pokriven je tankim slojem mukusa čija glavna komponenta predstavlja glikoprotein - mucin. Sekretovan od strane goblet ćelija, mukus

predstavlja značajnu fizičku i biohemijsku barijeru, sprečavajući direktan kontakt ćelija sa luminalnim sadržajem (**slika 1**) (21).



Slika 1. Komponente intestinalne barijere (modifikovano iz (22)).

Crevni epitel obezbeđuje fizičku barijeru koja odvaja komensalne bakterije u crevnom lumenu od *lamina propria*-je i dubljih intestinalnih slojeva. Površina epitela je organizovana u kripte, vile i mikrovile koje se stalno obnavljaju od strane pluripotentne matične ćelije koja se nalazi u aksijalnom delu (**slika 2**). Crevni epitel je izgrađen od četiri ćelijske linije koje potiču od pluripotentne matične ćelije: enterocita, koji čine većinu epitelnih ćelija mukoze creva i učestvuju u apsorpciji, hormon-produkujućih enteroendokrinih ćelija, koje učestvuju u povezivanju centralnog nervnog sistema sa enteričkim neuroendokrinim sistemom (sekrecijom hormona koji regulišu digestivnu funkciju), mukus-sekretujućih (goblet) ćelija i Panet ćelija, specijalizovanih za praćenje bakterija kroz kripte i vile sekrecijom antimikrobnih produkata kao što su lizozim, α -defenzini i kriptdini (23, 24).



Slika 2. Prikaz ćelija crevnog epitela (modifikovano iz (25)).

Stromalne ćelije, B ćelije (IgA - produkujuće plazma ćelije), T ćelije, makrofagi i dendritske ćelije *lamina propria*-je leže direktno ispod crevnog epitela (**slika 1**). Pored toga, specijalizovane T ćelije (intraepitelni limfociti) i neke dendritske ćelije lokalizovane su između enterocita. Ispod sloja *lamina propria* postoje dva sloja inervisane glatke muskulature koji stvaraju peristaltičke talase i time pokreću hranljive materije duž digestivnog trakta (26).

Intestinalne epitelne ćelije (IEĆ) su strukturno i funkcionalno polarizovane: apikalnom stranom okrenute su ka crevnom lumenu a bazolateralnom površinom ka bazalnoj membrani i *lamina propria*-ji. Polarizovana struktura IEĆ se ogleda u ekspresiji određenih membranskih proteina na apikalnoj ili bazolateralnoj strani. Ovo, zajedno sa mukoznim slojem na apikalnoj površini, čini barijeru koja je, generalno, nepropusna za komensalne bakterije i druge mikrobe u lumenu creva. Epitelne ćelije iskazuju receptore koji prepoznaju obrasce i omogućavaju razvijanje specifičnog imunološkog odgovora. Postoji nekoliko tipova receptora koji se nalaze na epitelnim ćelijama koji učestvuju u prepoznavanju liganada: takozvani "Toll-like" receptori, receptori slični oligomerizacionim domenima koji vezuju nukleotide (NOD) i receptori slični inducibilnom genu 1 za retinolnu kiselinu (RIG-1) (26–28).

Goblet ćelije su specijalizovane epitelne ćelije koje luče mucinske glikoproteine. Ovi mucini spojeni su u viskozni želatinasti sloj koji se proteže do 150 μm od površine crevne epitelne ćelije i formira dva strukturno različita sloja. Vizualizacija prostornih odnosa između mukoze, bakterija i epitela ukazuje na to da unutrašnji mukozni sloj čini zaštićenu zonu na apikalnoj strani epitelnih ćelija, dok spoljni sloj mukoze sadrži veliki broj bakterija. Dakle, unutrašnji sloj je otporan na ulazak bakterija i ograničava direktan kontakt bakterija sa epitelnim ćelijama (26).

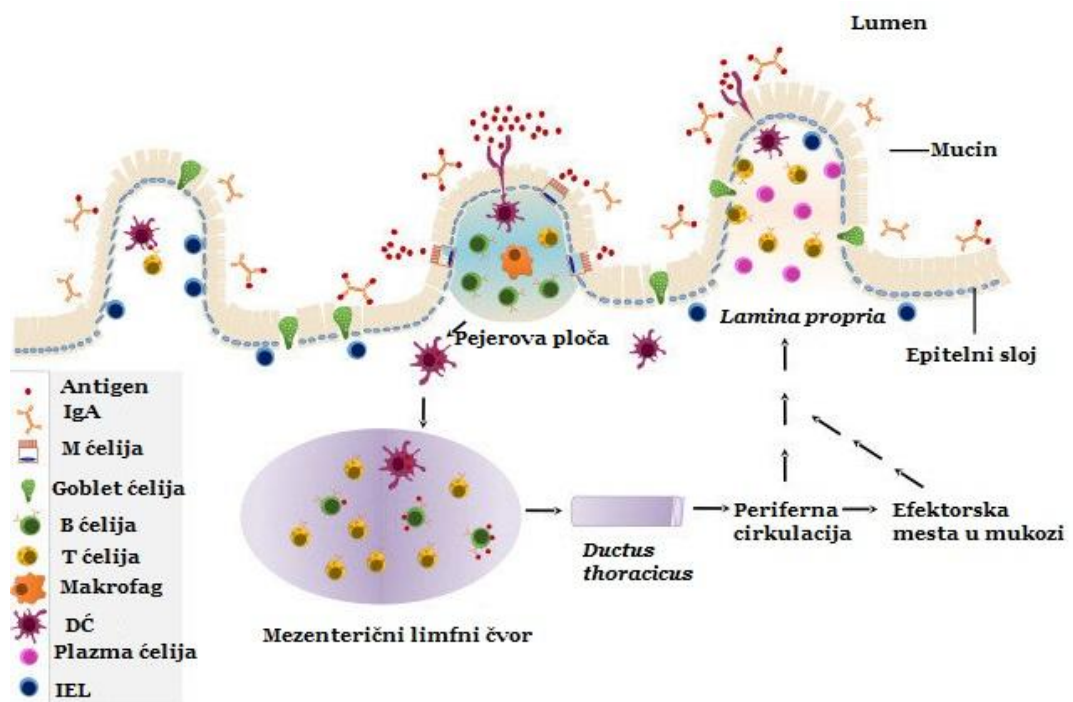
U održavanju intestinalne homeostaze učestvuju i Panetove ćelije koje proizvode antimikrobne peptide (α -defenzine, lektine, lizozim C i RegIII α (ili RegIII γ kod miševa)). Pored Panetovih ćelija, antimikrobne proteine proizvode gotovo sve epitelne ćelije creva, uključujući enterocite i goblet ćelije (26). Ovi antimikrobni proizvodi su neophodni za prostornu segregaciju luminalnih komensalnih mikroorganizama i patogena iz intestinalnog epitela. α -defenzini deluju protiv Gram + i Gram – bakterija, dok se RegIII γ lektin specifično vezuje za peptoglikane na površini Gram + bakterija (29).

Takođe, plazma ćelije sekretuju imunoglobulin A (IgA) koji sprečava kolonizaciju patogenih mikroorganizama (24, 29). IgA dimer u svojoj sekretovanoj formi (sIgA) je najzastupljeniji izotip imunoglobulina u mukozi. Sekretuju ga specijalizovane plazma ćelije koje se nalaze u *lamina propria*-ji i tako sekretovan vezuje se za specifične Fc receptore na bazolateralnoj strani intestinalnih epitelnih ćelija, koji su odgovorni za transcelularni prolaz do intestinalnog lumena (**slika 3**) (24).

Lamina propria je sloj mukoznog tkiva koji se nalazi direktno ispod epitelnih ćelija gastrointestinalnog trakta (26). Tu se nalaze ćelije imunog sistema i tkivno-specifične organizovane limfoidne strukture kao što su Pejerove ploče (nalaze se ispod specijalizovanih M ćelija), kriptoploče i izolovani limfoidni folikuli. Intestinalni imuni sistem se sastoji i od intraepitelnih efektorskih limfocita koji se nalaze u epitelnoj sluznici, a nazivaju se mezenterični limfni čvorovi (MLČ). Efikasna reakcija imunog sistema ne zavisi samo od stečene

imunosti, već predstavlja dirigovan proces u kome sinhronizovano učestvuju komponente i urođene i stečene imunosti (30).

Limfoidno tkivo povezano sa gastrointestinalnim traktom (GALT) (*engl. gut-associated lymphoid tissue, GALT*) se može podeliti na efektorska mesta, koja se sastoje od limfocita razbacanih širom epitela i *lamina propria*-je, i induktivnih mesta koja su organizovana u vidu Pejerovih ploča i mezenteričnih limfnih čvorova. Pejerove ploče su makroskopski limfni agregati koji se nalaze u submukozi duž tankog creva (**slika 3**) (31, 32).



Slika 3. Limfoidno tkivo povezano sa gastrointestinalnim traktom (modifikovano iz (33)).

Pejerove ploče sadrže B-ćelijske folikule i T-ćelijsku oblast. Limfna oblast je odvojena od crevnog lumena jednim slojem epitelnih ćelija, nazvanim folikul-pridruženi epitel (*engl. Folikul Associated Epithel, FAE*) i difuznim područjem odmah ispod epitela, poznatim kao subepitelna kupola. Takođe, tu dolazi do infiltriranja velikog broja B ćelija, T ćelija, makrofaga i dendritskih ćelija (DĆ). Folikulu pridruženi epitel pokriva kupole Pejerovih ploča. Transport preko epitela se odvija kroz specijalizovane M ćelije i DĆ koje izdužuju svoje nastavke

između čvrsto povezanih epitelnih ćelija. DĆ su prisutne i u subepitelialnoj kupoli i u interfolikularnoj T-ćelijskoj oblasti (34).

Dendritske ćelije (DĆ) prepoznaju bakterije na različitim lokacijama. Nalaze se ispod Pejerovih ploča i prepoznaju bakterije koje prodiru u epitel. DĆ u sloju *lamina propria* aktivno prepoznaju mali broj bakterija koje su prisutne na apikalnoj površini epitelnih ćelija proširivanjem dendrita između epitelnih ćelija (26). Mezenterični limfni čvorovi (MLČ) su najveći limfni čvorovi u telu (**slika 3**). Zbog jedinstvenih anatomskih karakteristika, MLČ mogu biti raskrsnica puteva između periferije i mukozne recirkulacije (34).

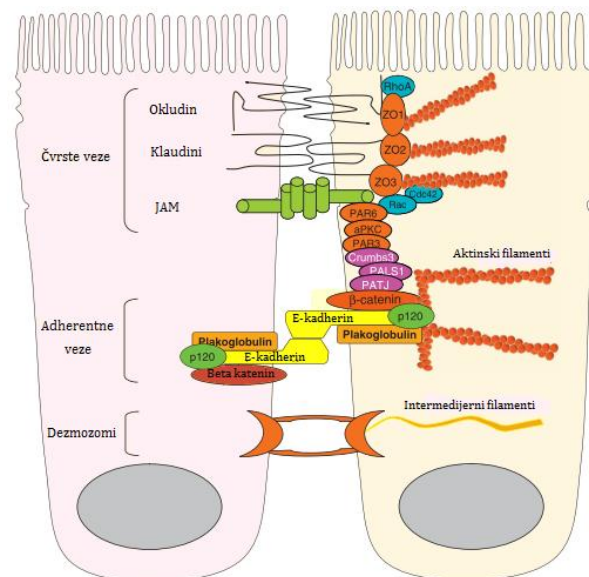
Smatra se da je formiranje ovih limfnih tkiva regulisano LTi ćelijama (*engl. lymphoid-tissue inducer (LTi) cells*). LTi ćelije interaguju sa lokalnim mezenhimom proizvodeći limfotoksin- β i faktor nekroze tumora (*engl. tumour necrosis factor -TNF*) koji aktiviraju ćelije strome da proizvode hemokine i adhezione molekule u formirajućem limfnom čvoru. Kao rezultat toga, cirkulišuće LTi ćelije, njihovi prekursori i zreli limfociti se privlače u limfne čvorove u razvoju i na taj način uspostavljaju samoodrživi *primordium*. LTi ćelije karakteriše ekspresija transkripcionog faktora ROR γ t (*engl. retinoic acid receptor-related orphan receptor- γ t*), interleukin-7 receptor α (IL-7R α , takođe poznat kao CD127) i limfotoksin- $\alpha_1\beta_2$. Iako se LTi ćelije ne mogu diferencirati u T ili B ćelije u *in vivo* uslovima, eksperimenti ukazuju da one mogu da se diferenciraju u ćelije nalik prirodnim ubicama (*engl. natural killer (NK)-like cells*). Klasteri LTi ćelija se nalaze u kriptama tankog creva, gde ostvaruju bliski kontakt sa dendritskim ćelijama. Zajedno, ovi ćelijski klasteri u tankom crevu generišu dinamičan mobilni agregat koji može da privuče druge ćelije imunog sistema i da se transformiše u izolovan limfni folikul (*engl. isolated lymphoid follicle, ILF*) koji sadrži IgA produkujuće B ćelije tokom inflamacije. Ćelije slične LTi ćelijama se takođe nalaze u sekundarnim limfnim organima, kao što je slezina, gde učestvuju u održavanju tkivne anatomije tokom virusne infekcije (35).

2.1.2. Strukturne komponente čvrstih veza

Intestinalne epitelne ćelije su između sebe povezane putem kompleksnih veza koji se nalaze na lateralnim membranama. Glavne komponente

interepitelnih veza su: čvrste veze, adherentne veze i desmozomi (36). Sastav čvrstih veza je prilično kompleksan, čak i u poređenju sa sastavom adherentnih veza i desmozoma. Na apikalnom intracelularnom prostoru epitelnih ćelija, proteini čvrstih veza obrazuju paracelularnu barijeru i pore koje regulišu paracelularni prolaz jona i molekula (22). Na bazolateralnoj strani ćelija, paracelularni transport je ograničen adherentnim vezama, desmozomima i “gap” vezama (**slika 4**). Epitelne čvrste veze čine kompleksi koji formiraju selektivno propustljivu barijeru između susednih ćelija i obrazuju granicu između apikalnih i bazolateralnih domena (37). Učestvuju u održavanju intestinalne barijere regulišući propustljivost jona, nutritijenata i vode (38). Čvrste veze čini više od 40 proteina, od kojih su mnogi članovi različitih genskih familija (39).

Adherentne veze (*zonula adherens*) su proteinski kompleksi koji se nalaze na lateralnoj membrani i omogućavaju mehaničko povezivanje susednih ćelija (**slika 4**).



Slika 4. Međucelijske veze koje učestvuju u očuvanju intestinalne barijere (modifikovano iz (40)).

Kadherini su proteini koji sačinjavaju ovu međucelijsku vezu i sastoje se od 5 podfamilija koje se klasifikuju kao tip I ili klasična familija kadherina, tip II, desmozomalni kadherini, protokadherini i molekuli slični kadherinima. Glavni protein ovih veza je E-kadherin koji spada u tip I transmembranskih

glikoproteina i smatra se prototipom kadherina, verovatno jer je prvi otkriven i dobro okarakterisan (41). E-kadherin se sastoji od jednog vanćelijskog domena koji formira homotipske, kalcijum-zavisne veze između epitelnih ćelija i jednog citoplazmatskog repa. Citoplazmatski rep je strukturno stabilizovan u membrani samo kada je povezan sa kateninima ($p120$, β i α) i time je omogućena interakcija sa mrežom mikrotubula i aktinom (42, 43).

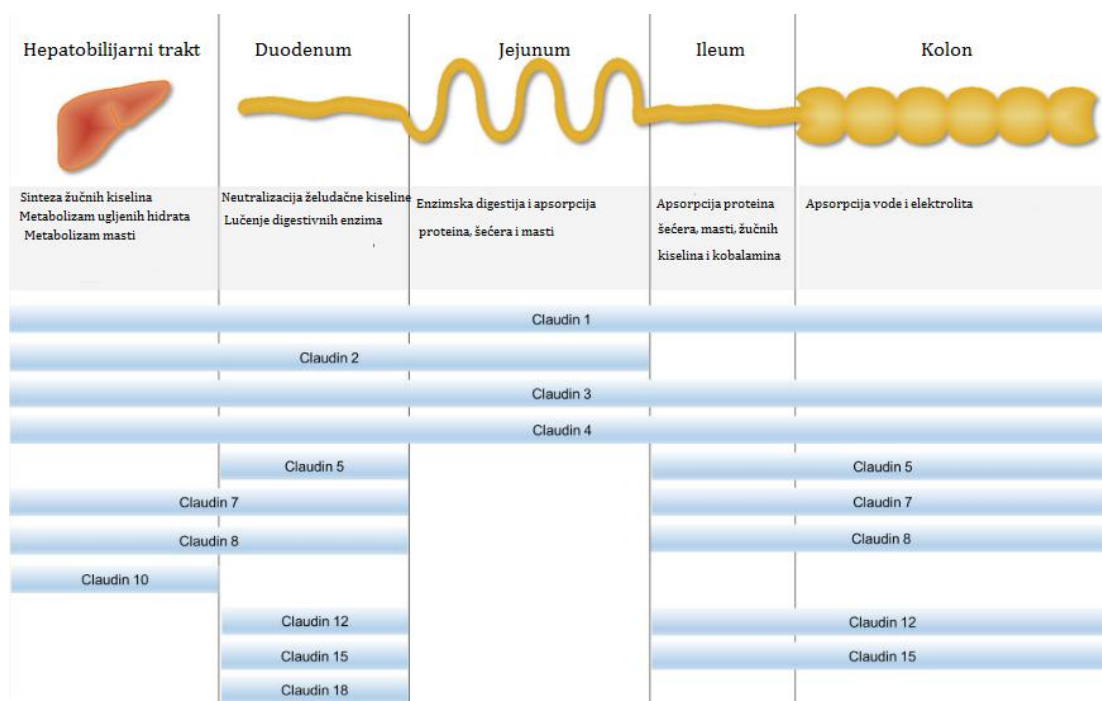
Na bazolateralnoj strani E-kadherinom - posredovanog međućelijskog kontakta, desmozomi omogućavaju mehaničku potporu tkivu kroz uspostavljene veze. Desmozomi sadrže netipične kadherine i formiraju adhezivne veze sa ćelijskim filamentima, kao što su tzv. "armadilo" proteini (plakoglobin i plakofilin) (44).

Čvrste veze su apikalni adhezivni kompleksi koji se nalaze na granici između apikalnog i lateralnog membranskog regiona (**slika 4**). Predstavljaju dinamične, multiproteinske komplekse čija je funkcija održavanje selektivno propustljive barijere kroz koju prolaze joni i tečnost, ali ne i luminalni antigeni, mikroorganizmi i njihovi toksini. U okviru čvrstih veza postoje 4 integralna transmembranska proteina: okludin, kladini, adhezioni molekuli (JAM) i tricelulin koji su okarakterisani. Unutarćelijski domeni ovih proteina su povezani sa citoplazmatskim proteinima, kao što su *zonula occludens* (ZO) proteini. ZO proteini interaguju sa citoskeletom (aktinom), što predstavlja veoma važnu strukturu za održavanje integriteta epitelne barijere (38).

Okludin (~65 kDa) je protein koji čini integralni deo membrane i prvi put je identifikovan 1993. godine (45). Eksprimira se u epitelnim i endotelnim ćelijama, astrocitima, neuronima i dendritskim ćelijama. Ima četiri transmembranska domena, 2 vanćelijske petlje i jednu unutarćelijsku petlju: kratak N-terminalni i duži C-terminalni domen koji se nalaze u citoplazmi. Homofilne interakcije vanćelijskih petlji okludina između susednih ćelija formiraju barijeru za prolaz makromolekula, ali ne i za prolaz jona. Dugačak C-terminalni domen interaguje sa nekoliko unutarćelijskih proteina čvrstih veza, kao što su ZO proteini. Funkcija okludina nije još uvek u potpunosti razjašnjena,

ali je na životinjskim i ćelijskim modelima pokazano da ima ključnu ulogu u održavanju strukture i propustljivosti epitelne barijere (46).

Klaudini (20-27 kDa) su membranski proteini (20-27 kDa) koji imaju 4 hidrofobna transmembranska domena, dve vanćelijske petlje, jednu unutarćelijsku i N- i C-terminalne citoplazmatske domene (45). Klaudini sa okludinom, tricelulinom i MarvelD3 proteinima formiraju važnu komponentu čvrste veze (47). Vanćelijske petlje klaudina formiraju homofilne interakcije između susednih ćelija i time omogućavaju nastajanje selektivnih pora za paracelularni transport. C-terminalni domeni interaguju sa ZO proteinima i preko tih veza interaguju sa citoskeletom. Familija klaudina ima 24 člana kod čoveka i svaka izoforma ima jedinstveni obrazac ekspresije u tkivima i ćelijama (slika 5).



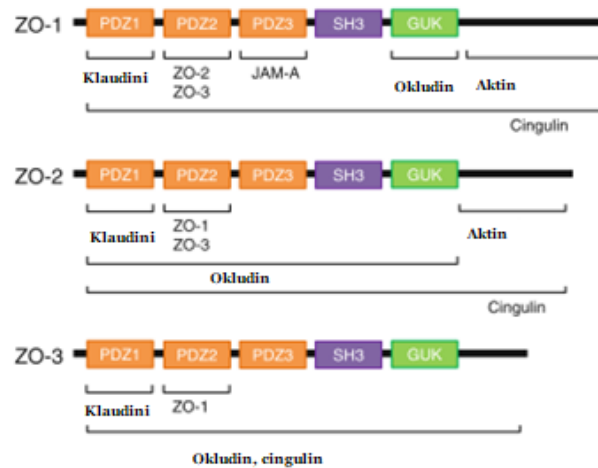
Slika 5. Ekspresija klaudina u intestinalnom i hepatobilijarnom traktu čoveka (47).

Poznato je da su klaudin-1, -3, -4, -5, -8, -9, -11 i -14 potrebni za održavanje integriteta barijere i učestvuju u njenom formiranju, dok klaudin-2, -7, -12 i -15 su klaudini koji učestvuju u formiranju pora. Funkcionalne osobine svakog

klaudina zavise od broja i pozicije naelektrisanih aminokiselina u prvoj vanćelijskoj petlji molekula (48).

Adhezioni molekuli (JAM) su membranski proteini koji pripadaju superfamiliji imunoglobulina i karakteriše ih postojanje 2 vanćelijska imunoglobulinska domena, jedan transmembranski domen i jedan unutarćelijski C-terminalni domen. Podeljeni su u dve superfamilije, u zavisnosti od sličnosti sekvenci u svojim citoplazmatskim domenima. Unutarćelijski domeni JAM proteina interaguju sa ZO proteinima, dok vanćelijski N-terminalni domeni vezuju različite ligande putem homofilnih ili heterofilnih interakcija (49).

Zonula occludens su prvi proteini čvrstih veza koji su identifikovani i do danas su poznata tri: ZO1 (~220 kDa), ZO2 (~160 kDa) i ZO3 (~130 kDa). Prema analizi aminokiselinske sekvence, ZO proteini su svrstani kao članovi familije homologa guanilat kinaze povezanih sa membranom (MAGUK) (49). To su multidomenski proteini koji imaju ulogu u obrazovanju i regulisanju same strukture čvrstih veza (**slika 6**). Biohemijska funkcija i osobine ZO 1 su najbolje opisane i izučene od svih ZO proteina. ZO1 je lokalizovan u međućelijskim kontaktima i smatra se da ima osnovnu ulogu u obrazovanju i aranžmanu čvrstih veza na samom kontaktu između dve ćelije (46).



Slika 6. Interakcije proteina čvrstih veza sa ZO proteinima (modifikovano iz (46)).

2.1.3. Prepoznavanje i preuzimanje antigena u intestinumu

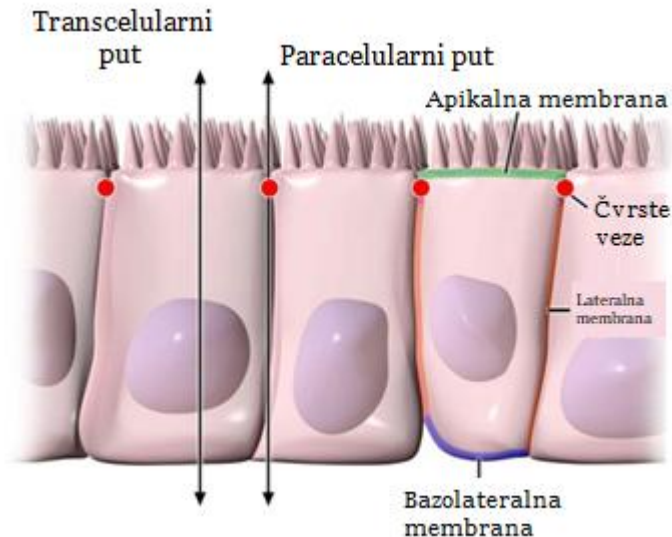
Mukoza epitela je primarno mesto za ulazak antigena. Aferentni limfni sudovi nose antigene iz mukoze do limfnih čvorova u kojima se nalaze specijalizovane antigen-prikazujuće ćelije (APĆ) (*engl. antigen-presenting cell-APC*) koje ih prikazuju imunom sistemu. Mukozno limfoidno tkivo gastrointestinalnog trakta sadrži najveći broj limfocita i najpotpunije je okarakterisano. Iako se sastoji od samo jednog sloja ćelija, intestinalni epitel mora da kontroliše pristup potencijalnih antigena i patogena i, u isto vreme, ima ulogu u apsorpciji hranljivih materija. Ovu dvojnu ulogu obezbeđuju čvrste međućelijske veze koje ograničavaju prolaz čak i vrlo malih (2 kDa) molekula. Intestinalni epitel, takođe, poseduje i veliki broj specijalizovanih zaštitnih adaptacija koje se ne mogu naći na drugim mestima u organizmu, i to su: antimikrobni peptidi (defenzini), sekretorni imunoglobulin A i mucini. Apikalna površina enterocita, okrenuta ka crevnom lumenu, idealna je za završno varenje hranljivih materija zbog guste prevlake na apsorptivnim mikrovilima. Na vrhovima mikrovila, sloj membranski usidrenih glikoproteina čini glikokaliks filamentoznih četkastih ivica (*engl. filamentous brush border glycocalyx - FBBG*). Svarene hranljive materije mogu da prođu kroz glikokaliks, koji je relativno nepropustljiv za makromolekule ili bakterije (20).

2.1.4. Prolaz antigena kroz epitelnu barijeru

Solubilni proteini i mikrobi prolaze kroz epitelnu barijeru. Enterociti su primarni ćelijski tip u epitelnom monosloju. Oni su izmešteni u nekim regionima i zamenjeni specijalizovanim epitelnim ćelijama poznatim kao M ćelije. Glikokaliks koji karakteriše vile enterocita odsutan je sa apikalne površine M ćelije. Naime, zamenjen je sa tzv. *microfold* -ovima (otuda naziv "M ćelija") koji su dostupniji luminalnim antigenima. M ćelije koriste transepitelni vezikularni transport kako bi prenele mikrobe do APC u gastrointestinalnom limfoidnom tkivu. GALT sačinjavaju limfoidne strukture i agregati koji su povezani sa intestinalnom mukozom (krajnici, Pejerove ploče, limfni folikuli, slepo crevo i mezenterični limfni čvorovi). Oni su bogati konvencionalnim i nekonvencionalnim limfocitima, specijalizovanim dendritskim ćelijama i makrofagimama. GALT je podeljen na diskretna induktivna i efektorska mesta. Pre mnogo godina pokazano je da M ćelije obezbeđuju glavni, ako ne i jedini, način na koji antigeni mogu da dođu u kontakt sa imunim ćelijama u intestinumu. M ćelije verovatno ne prezentuju antigene, pošto ne eksprimiraju MHC molekule klase II i umesto toga, one prenose netaknute antigene do APC, bilo u epitelu ili u regionu kupole. Odatle, APC prelaze u T-ćelijsku oblast ili B-ćelijski folikul, gde mogu da komuniciraju sa naivnim limfocitima (34). Pejerove ploče su agregacije limfnog folikula, prvenstveno u distalnom ileumu tankog creva. Za M ćelije, lokalizovane u strukturi nalik kupoli u folikulo-asosovanom epitelu, dugo se mislilo da su "kapija za mukozni imuni sistem". Ispostavilo se, međutim, da M ćelije nisu jedini tip ćelija sposoban za transport antigena preko epitelne barijere. Dendritske ćelije (DĆ) su profesionalne antigen-prikazujuće ćelije, koje izdužuju svoje nastavke nalik dendritima između čvrsto povezanih epitelnih ćelija i sakupljaju antigene direktno iz lumena. Integritet barijere se održava tokom ovog procesa, jer se čvrste veze ponovo formiraju pomoću proteina koji se eksprimiraju i na enterocitima i na DĆ (20).

2.2. Homeostaza i disfunkcija intestinalne barijere

Kako bi se osiguralo preuzimanje vode i nutritivnih komponenti, selektivnost intestinalne propustljivosti je neophodna i postiže se posredstvom paracelularnog i transcelularnog transporta (**slika 7**). Transcelularni put podrazumeva transport tečnosti kroz epitelne ćelije i regulisan je selektivnim transporterima za amino-kiseline, elektrolite, šećere i masne kiseline kratkih lanaca. Transcelularni put je povezan sa lizozomalnom degradacijom antigena (50). Paracelularni prolaz vode, jona i većih molekula je ograničen čvrstim vezama i selektivnost se vrši na osnovu molekulske mase, dok se selektivnost na osnovu naelektrisanja postiže proteinima kladinima (51). Preuzimanje antigena se odvija pomoću epitelnog sloja. Jedan put podrazumeva preuzimanje solubilnih i agregiranih antigena ili imunih kompleksa od strane M ćelija, paracelularnim putem. Ovakav način selektivne i balansirane intestinalne propustljivosti je veoma važan ne samo za adekvatan unos nutritijenata, već i za razvoj oralne tolerance (52).

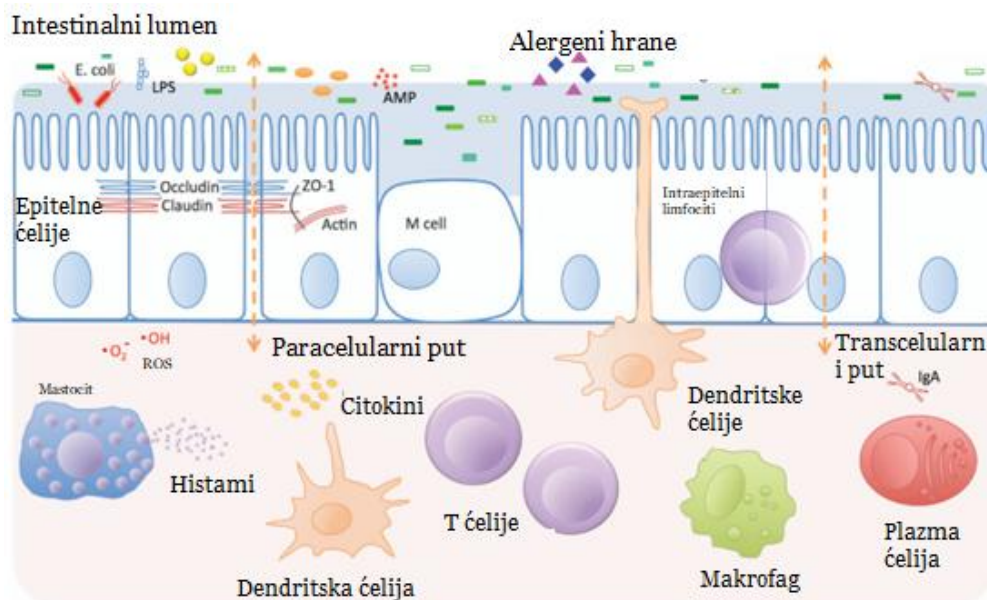


Slika 7. Putevi prolaska kroz epitelnu barijeru (modifikovano iz (53)).

2.2.1. Regulacija intestinalne barijere

Epitel gastrointestinalnog trakta formira fizičku granicu između organizma i spoljašnje sredine. Osim što efektivno obezbeđuje selektivnost barijere, čime vrši restrikciju unosa luminalnih molekula i patogena, on obezbeđuje unos neophodnih molekula vode i nutritivnih molekula (46). Poremećaj intestinalne barijere, praćen prodorom luminalnog sadržaja, izaziva poremećaj imunog sistema mukoze, što dovodi do razvoja intestinalnih i sistemskih bolesti. U svetlu toga ulaže se mnogo napora da se rasvetle mehanizmi kojim različiti vanćelijski faktori (citokini, komponente hrane i patogeni) utiču na regulaciju intestinalne barijere.

Funkcija epitelne barijere može biti regulisana samom ekspresijom i lokalizacijom proteina čvrstih veza (40). Dobar primer je regulacija ekspresije kladina tipa 2. Naime, ekspresija kladina-2 je u intestinumu povećana u odgovoru na određene inflamatorne stimulse, kao što su interleukin 1 β (IL-1 β) (54), interleukin 6 (IL-6) (55).



Slika 8. Faktori koji regulišu funkciju intestinalne barijere (modifikovano iz (56)).

Uloga citokina u regulaciji intestinalne barijere u patofiziološkim uslovima je dobro ispitana na različitim *in vivo* i *in vitro* modelima. Disregulacija čvrstih veza posredovana citokinima dovodi do aktivacije imunog sistema i razvoja intestinalnih bolesti (17). U **tabeli 1.** je sumirana lista citokina koja dovodi do povećanja propustljivosti epitelne barijere dejstvom na proteine čvrstih veza i mehanizma preko kojeg dolazi do narušavanja integriteta čvrstih veza (57).

Tabela 1. Citokini koji povećavaju epitelnu propustljivost (57)

Citokin	Permeabilnost^a	Ćelijska linija	Mehanizam^b
IL-1 β	Povećava	Caco-2	Okludin \downarrow (58)
IL-6	Povećava	Caco-2, T84	Klaudin-2 \uparrow (55)
TNF α	Povećava	Caco-2, HT29/B6	ZO1 \downarrow (59), Klaudin-2 \uparrow (60)

a- Permeabilnost je bazirana na merenju TEER i paracelularnom prolazu molekula

b- Simboli \uparrow i \downarrow se odnose na povećanu odnosno sniženu proteinsku ili ekspresiju iRNK, respektivno

Faktor nekroze tumora (TNF) je proinflamatorni citokin koga sekretuju aktivirane T ćelije i makrofagi. Brojne studije pokazuju da je ekspresija ovog citokina povišena u različitim tipovima bolesti creva (46). Takođe, neke studije navode da narušavanje epitelne barijere može biti posredovano i TNF α citokinom, kao i aktivacijom nuklearnog faktora κ B (NF- κ B) (46). Sa druge strane, IL-1 β se značajno eksprimira u različitim inflamatornim stanjima creva. U skladu sa tim, postoji direktna korelacija između ekspresije ovog citokina i intestinalne inflamacije kod pacijenata sa Kronovom bolešću (61). U intestinalnim ćelijskim modelima IL-1 β smanjuje TEER što dovodi do povećanja propustljivosti ćelijskog monosloja. Ovaj poremećaj u barijeri je u korelaciji sa sniženom ekspresijom okludina i njegovom redistribucijom u intestinalnim ćelijama. IL-1 β dovodi do smanjenja TEER i ekspresije iRNK okludina, što je povezano sa kanonskim signalnim putevima koji vode do aktivacije NF- κ B (58,62). IL-6 je citokin čija je ekspresija važna u odgovoru domaćina na različite tipove infekcija i učestvuje u proinflamatornom i antiinflamatornom antigen-specifičnom imunom odgovoru. Sekretovanje ovog citokina od strane epitelnih ćelija u *lamina propria*-ji ima glavnu ulogu u patogenezi inflamatornih bolesti creva (63). IL-6 dovodi do selektivnog povećanja intestinalne propustljivosti za

katjone, ali ne i za makromolekule i dovodi do povećanja ekspresije kladina-2 u Caco-2 ćelijama (55).

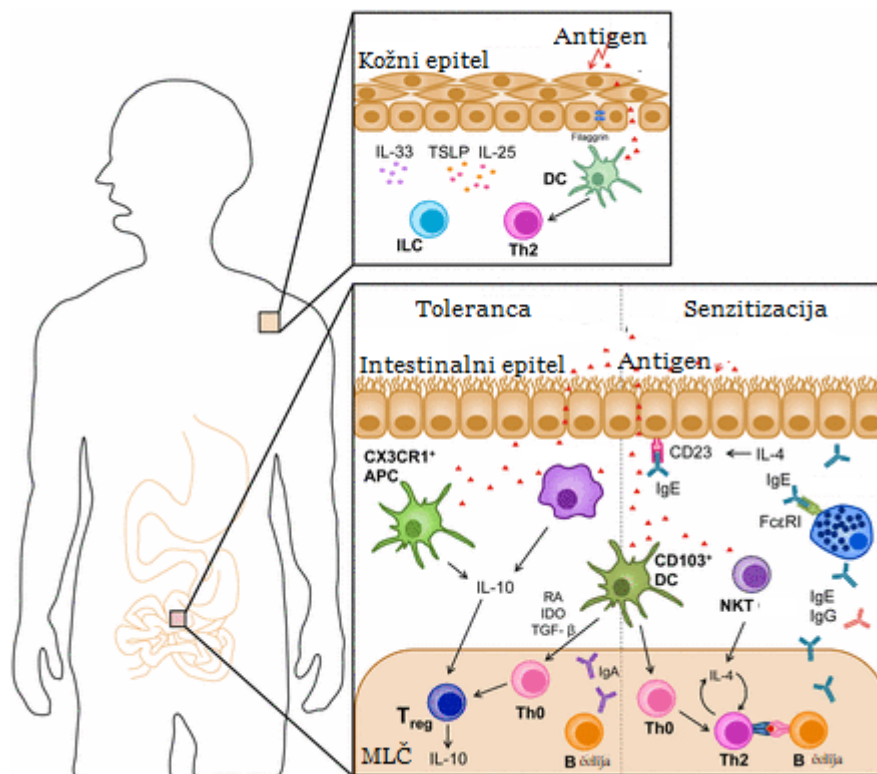
Različit obrazac ekspresije kladina utiče na obrazovanje pora između susednih ćelija a, samim tim, i na propustljivost intestinalne barijere. Nivo ekspresije kladina je različit u zavisnosti od stepena razvoja i diferencijacije intestinalnog trakta sa jedne, ili patološkog stanja sa druge strane. U skladu sa tim, različiti signali utiču i na njihovu ekspresiju, bilo da su u pitanju citokini ili npr. komponente hrane. Osim što narušavanje obrasca ekspresije kladina ima posledice na propustljivost intestinalnog epitelnog sloja, može doći i do drugih posledica. Primera radi, kladini se dovode u vezu sa samim razvojem ćelija pa određene promene u ekspresiji kladina dovode do povećanja regenerativnih osobina ćelija i njihove proliferacije. To objašnjava povećanu ekspresiju kladina-1 u intestinalnim epitelnim ćelijama pacijenata koji imaju inflamatornu bolest creva (64). Takođe, ekspresija kladina-2 je povišena kod pacijenata sa istom kliničkom slikom. Različite *in vitro* studije pokazale su da povećanje ekspresije kladina-2 dovodi i do povećanja broja pora između susednih ćelija u čijoj izgradnji učestvuje upravo kladin-2. To za posledicu ima povećanje paracelularnog transporta i protok katjona (Na^+ i molekula prečnika manjeg od 4 Å) (17).

2.2.2. Oralna toleranca

Limfno tkivo povezano sa gastrointestinalnim traktom je najveći sekundarni limfni organ u organizmu. Ovo tkivo konstantno preuzima uzorke antigena unesenih ishranom i time učestvuje u selekciji potencijalno opasnih patogena od bezopasnih antigena u cilju aktivacije imunog sistema ili ignorisanja bezopasnih antigena (hrana ili komensalne bakterije) (56, 65). Oralna toleranca je osnovni imuni odgovor u gastrointestinalnom traktu na antigene unesene hranom kod većine ljudi koji nemaju alergiju na hranu. Međutim, kada dođe do narušavanja oralne tolerance, dolazi do razvoja alergija na hranu (66).

Ključne ćelije u razvoju oralne tolerance su regulatorne T ćelije (FoxP3+). U *lamini propria*-ji se nalaze i dve ćelijske populacije koje eksprimiraju CXCR3 ili CD103 (19). Ove ćelije migriraju u limfne čvorove gde aktiviraju naivne T ćelije

i promovišu FoxP3⁺ T reg fenotip, proces koji uključuje sintezu TGF- β i retinolne kiseline (31,32,67–70). Retinolna kiselina je signal za ekspresiju specifičnih CCR9 i $\alpha 4\beta 7$ receptora na Treg i IgA-sekretujućim B ćelijama, što dodatno doprinosi razvoju oralne tolerancije (71). CD103⁺ dendritske ćelije koriste indolamin-2, 3-dioksigenazu (IDO) za razvoj tolerancije, a gubitak ove funkcije vodi do razvoja Th1 ili Th17 fenotipa, ograničavajući time razvoj Treg ćelija i oralnu toleranciju (72). Takođe, MUC2, mucin sekretovan od strane intestinalnih goblet ćelija, ide u prilog anti-inflamatornom potencijalu CD103⁺ dendritskih ćelija. Pacijenti sa mutacijama u FoxP3⁺ lokusu razvijaju alergiju na hranu (19, 69, 72).



Slika 9. Mehanizmi koji vode do tolerancije na antigene, odnosno razvoja IgE specifičnog odgovora (modifikovano iz (73)).

Oralna tolerancija predstavlja normalan fiziološki odgovor na unesene antigene, a poremećaj u tom procesu dovodi do senzitivacije na antigene (**slika 9**) (3). Učestalost nastanka alergija na hranu je u porastu u poslednjih 20 godina. Istraživanja su usmerena na bolje razumevanje ovog procesa i događaja koji vode

ka senzitivaciji i nastanku bolesti (74). Postoji veliki broj životinjskih modela razvijenih za ispitivanje različitih ćelijskih i molekulskih događaja koji su uključeni u proces senzitivacije (75), a jedno od značajnih zapažanja je to da oralno administriran antigen dovodi do tolerancije sa jedne strane, ali može dovesti i do neželjenog efekta - senzitivacije, sa druge strane (75–77).

2.3. Eksperimentalne tehnike za praćenje funkcije intestinalne barijere

Različite tehnike su razvijene za procenu funkcije intestinalne barijere (78–80). Sam izbor tehnike zavisi od predmeta istraživanja, kao i od dostupnosti biološkog materijala. Većina dostupnih eseja bazira se na merenju propustljivosti creva i interpretira u smislu prolaska molekula kroz intestinalni epitel. Ovi testovi se koriste za ispitivanje funkcije intestinalne barijere, a termini "propustljivost" i "funkcija barijere" se u tom kontekstu naizmenično koriste. Za potrebe ovih ispitivanja se koriste različiti molekuli kao markeri za procenu intestinalnog protoka, odnosno prolaska kroz barijeru. U zavisnosti od naelektrisanja i veličine tih molekula meri se i propustljivost. Poznato je da molekuli mogu da se kreću paracelularno i transcelularno. Veći antigeni molekuli, lipofilne komponente i nutritivni preferiraju transcelularnu rutu posredstvom endocitoze, pasivne difuzije ili vezivanjem za specifične membranske transportere na površini ćelija. Joni (posebno katjoni) i mali hidrofilni molekuli (<600 Da) prolaze uglavnom paracelularno posredstvom difuzije kroz međućelijski prostor i pora koje formiraju proteini čvrstih veza (81–84).

Testovi permeabilnosti kod životinjskih modela podrazumevaju upotrebu većih molekula (ovalbumina, peroksidazu iz rena, dekstrane) koji mogu biti fluorescentno obeleženi. Ove probe se mogu detektovati u uzorcima krvi ili u mezenteričnoj ili portalnoj veni (85). Tehnika koju je prvi razvio danski biolog Hans Henriksen Ussing podrazumeva korišćenje komora kao reprezentativnu alternativu merenja transporta jona i molekula kroz uzorke epitelnih tkiva dobijene biopsijom (7, 86).

2.3.1. Model sistemi za izučavanje transepitelne propustljivosti

Upotreba *in vitro* model sistema u ove svrhe se bazira na apsotivnim ćelijama intestinalnog trakta. S obzirom na poteškoće uzimanja i uzgajanja primarnih humanih epitelnih ćelija, najčešće se u ove svrhe koriste ćelijske linije humanog kolorektalnog adenokarcinoma: Caco-2, HT-29 i T84. Caco-2 ćelije se najčešće koriste kao model sistem humanih intestinalnih enterocita za ispitivanje preuzimanja antigena (87). One se spontano diferenciraju u polarizovane epitelne ćelije sa formiranim čvrstim vezama između susednih ćelija (88). HT-29 ćelije su, takođe, humane intestinalne ćelije ali, za razliku od Caco-2 ćelija, one nisu u potpunosti diferencirane i u manjoj meri sadrže mukus-sekretujuće ćelije i apsorptivne ćelije. T84 ćelije, sa druge strane, proizvode mukus (89). Indikacija za dobro definisan i uspostavljen ćelijski monosloj (sa pravilno formiranim čvrstim vezama) je transepitelni električni otpor. Studije na primarnim mišjim ili humanim matičnim ćelijama dobijenim iz intestinalnog trakta su u fokusu mnogih istraživanja. Embrionalne matične ćelije rastu pod specifičnim uslovima tako da se mogu samoorganizovati u organoide tzv. "mini-creva" (engl. *mini guts*) (90). Oni mogu formirati trodimenzionalne strukture i time zadržavaju brojne osobine koje se nalaze u *in vivo* intestinalnom sistemu, uključujući kripte i vile koje oblažu lumen creva. Intestinalni organoidi sadrže sve tipične ćelije koje se nalaze u intestinalnom epitelu i obezbeđuju fiziološki relevantan model. Postoji nekoliko metoda za uzgajanje organoida, a najčešće korišćeni je trodimenzionalni sistem za uzgajanje organoida baziran na Matrigelu koji obezbeđuje regeneraciju i rast ćelija u odsustvu fiziološke niše (91, 92). Navedeni *in vitro* model sistemi imaju i ograničenja, pored brojnih prednosti koje pružaju. Glavno ograničenje je da ne obezbeđuju mehanički aktivnu mikrosredinu intestinalnog trakta (peristaltičke pokrete i intraluminalni protok tečnosti) i ne mogu biti kolonizovani od strane mikroorganizama (91, 93).

In vitro ćelijski modeli se sve češće koriste kako bi se smanjila upotreba životinjskih modela (94). Prednosti korišćenja organoida su da se mogu formirati iz matičnih ćelija različitih organizama, kao i iz različitih delova gastrointestinalnog trakta (stomak, ileum, kolon) (95).

2.4. Alergija na hranu

Alergija na hranu podrazumeva širok spektar poremećaja koji nastaju kao rezultat odgovora imunog sistema na antigene iz hrane. Ovo stanje organizma karakteriše akutnu, potencijalno fatalnu reakciju (anafilaksu), kao i hronično stanje koje se, u najvećoj meri, odražava na kožu i gastrointestinalni trakt. Nepovoljan odgovor imunog sistema na hranu dešava se kod oko 5 % dece i 3-4 % odraslih u zapadnim zemljama. Ti statistički podaci nisu konačni jer sa povećanjem industrijalizacije dolazi i do povećanog rizika za nastanak alergija. Reakcije na hranu predstavljaju 1/3 do 1/2 slučajeva anafilakse u Severnoj Americi, Evropi, Aziji i Australiji (96). Drugi simptomi koji se klasifikuju kao alergijska reakcija na hranu podrazumevaju utrikariju, angioedem, atopijski dermatitis, oralni alergijski sindrom, astmu, rinitis, konjuktivitis, hipotenziju i aritmiju, a svi nastaju kao posledica oslobađanja medijatora od strane efektorskih ćelija imunog sistema (bazofila i mastocita) (97).

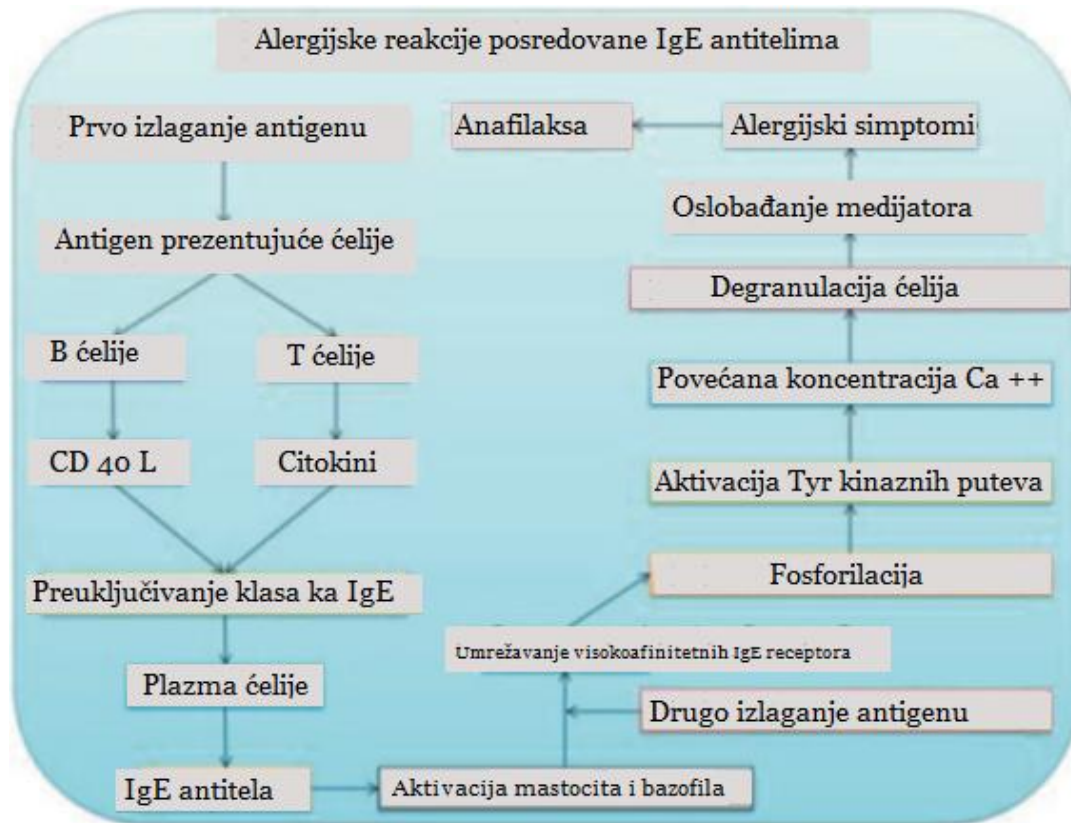
Faktori koji dovode do nastanka alergija na hranu obuhvataju kako genetičke tako i faktore sredine. Kod pacijenata alergičnih na hranu, IgE antitela se proizvode na proteine iz hrane koji najčešće zadržavaju alergena svojstva nakon termičke obrade i proteolize. Organizacija za hranu i poljoprivredu (*Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO)*) i svetska zdravstvena organizacija (*World Health Organization (WHO)*) označili su 8 najčešćih alergernih izvora: mleko, školjke, jaja, riba, kikiriki, soja, orasi i pšenica. Nova hrana, kasnije uvedena u ljudsku ishranu, koja sadrži alergene je tropsko voće, susam i začini. Ukrštena reaktivnost se najčešće dešava sa alergenima iz drugih izvora, kao što su polen ili lateks (98). Kravlje mleko, jaja, soja, pšenica, kikiriki, orašasti plodovi, riba i plodovi mora uzrokuju više od 90 % alergija na hranu širom sveta (97).

Alergija na hranu se deli na: (1) reakcije posredovane imunoglobulinom E (IgE), (2) reakcije koje nisu posredovane IgE antitelima i (3) mešovite reakcije. IgE-posredovani poremećaji se mogu klasifikovati kao oralni alergijski sindrom (OAS) ili anafilaksa. Alergija na hranu povezana sa polenom ili OAS se najčešće manifestuje kao prolazni svrab u orofarinksu (lat. *oropharynx* -usni deo ždrela),

koji je nekada praćen blagim do umerenim oticanjem usana i manifestuje se u roku od nekoliko minuta od unosa sirove biljne hrane (voće, povrće ili orašasti plodovi) kod osoba sa alergijom na polen (99). Anafilaksa je brza, potencijalno fatalna sistemska reakcija koja obuhvata simptome kao što su mučnina, povraćanje, abdominalni grčevi i dijareja. Ovi simptomi se javljaju kroz nekoliko minuta od unosa hrane i mogu trajati do nekoliko sati (66). Poremećaji koji nisu povezani sa IgE antitelima se odnose na reakcije koje nastaju kao posledica preosetljivosti povezane sa ćelijama kao što su T ćelije (proktokolitis i enteropatija izazvani proteinima hrane). Mešovite reakcije na hranu podrazumevaju tzv. gastrointestinalne poremećaje posredovane eozinofilima. One predstavljaju hronična inflamatorna stanja gastrointestinalnog trakta kome doprinose eozinofili (eozinofilni gastritis i kolitis) (100).

2.4.1. Alergija na hranu posredovana IgE antitelima

Proteini iz hrane koji su odgovorni za nastanak IgE-posredovane reakcije na dati izvor hrane nazivaju se alergenima. Alergeni hrane su proteini ili glikoproteini, najčešće molekulske mase između 5-70 kDa. Reakcija preosetljivosti se odlikuje simptomima koji nastaju nekoliko minuta nakon unosa određene hrane i uključuju preteran odgovor humoralne imunosti praćen formiranjem alergen-specifičnih IgE antitela. U odloženim reakcijama preosetljivosti simptomi se javljaju i posle 24 h ili duže nakon unosa hrane i podrazumeva uključivanje ćelija imunog sistema i razvoj senzitivisanih T ćelija (101). Alergijska reakcija, ili preosetljivost, je proces koji podrazumeva dve faze: fazu senzitivizacije i efektorsku fazu. Niz događaja koji obuhvataju obe faze su sumirani na **slici 10**.



Slika 10. Prikaz svih faza i komponenti uključenih u razvoj alergijske reakcije posredovane IgE antitelima (modifikovano iz (101)).

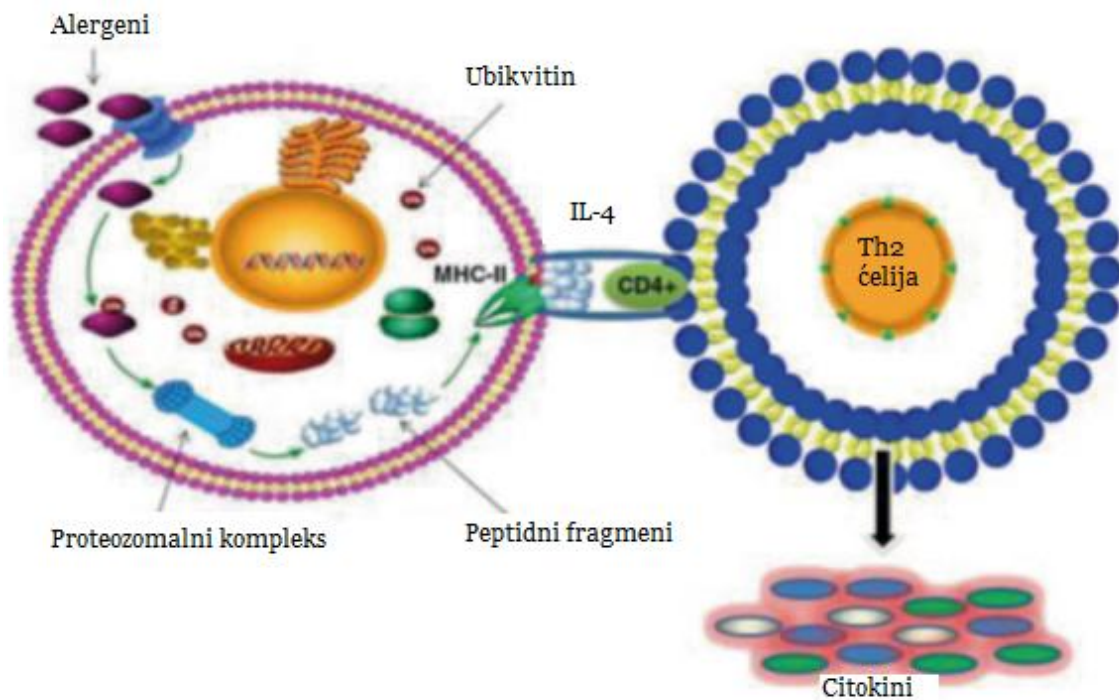
Faza senzitivacije

Imuni odgovor kod alergija na hranu se razvija u pravcu fenotipa povezanog sa citokinima tipa 2. Zašto neke komponente hrane predstavljaju okidač za razvoj ovog tipa imunog odgovora i dalje ostaje nerazjašnjen iako neki antigeni iz hrane poseduju potencijal da stimulišu urođeni imuni odgovor. Predmet interesovanja su postali citokini koji se proizvode od strane epitelnih ćelija: IL-25, TSLP, IL-33. Na intestinalnim epitelnim ćelijama, IL-4 indukuje ekspresiju niskoafinitetnog IgE receptora, CD23, koji vezuje antigen-specifične IgE molekule i promoviše preuzimanje antigena. Takođe, do prolaska antigena kroz intestinalnu barijeru može dovesti i narušavanje integriteta epitelne barijere, tj. narušavanje mreže koju formiraju proteini čvrstih veza (73, 102, 103).

Da bi se inicirala alergijska reakcija, alergeni hrane moraju da dođu u kontakt sa imunim sistemom preko mukoznih površina. Stoga se senzitivacija na antigene iz hrane može razviti u gastrointestinalnom traktu, koži i respiratornom

traktu. Nakon unosa, proteini iz hrane bivaju u najvećoj meri digestovani u želucu i intestinumu pomoću gastričnih i intestinalnih enzima. Nedigestovani proteini i peptidi se zatim transportuju iz lumena u mukozu kroz intestinalne epitelne ćelije gastrointestinalnog trakta (IEĆ) i specijalizovane epitelne ćelije M ćelije, koje su lokalizovane iznad Pejerovih ploča. Dodatno, direktno preuzimanje ingestovanih antigena/alergena se može izvršiti pomoću mukoznih dendritskih ćelija (DĆ) koje svojim proširenim dendritima mogu preuzeti sadržaj lumena pomoću receptor-posredovane endocitoze, makropinocitoze ili preko mikrovezikula i njihovom interakcijom sa nanovezikulama i egzozomima (104).

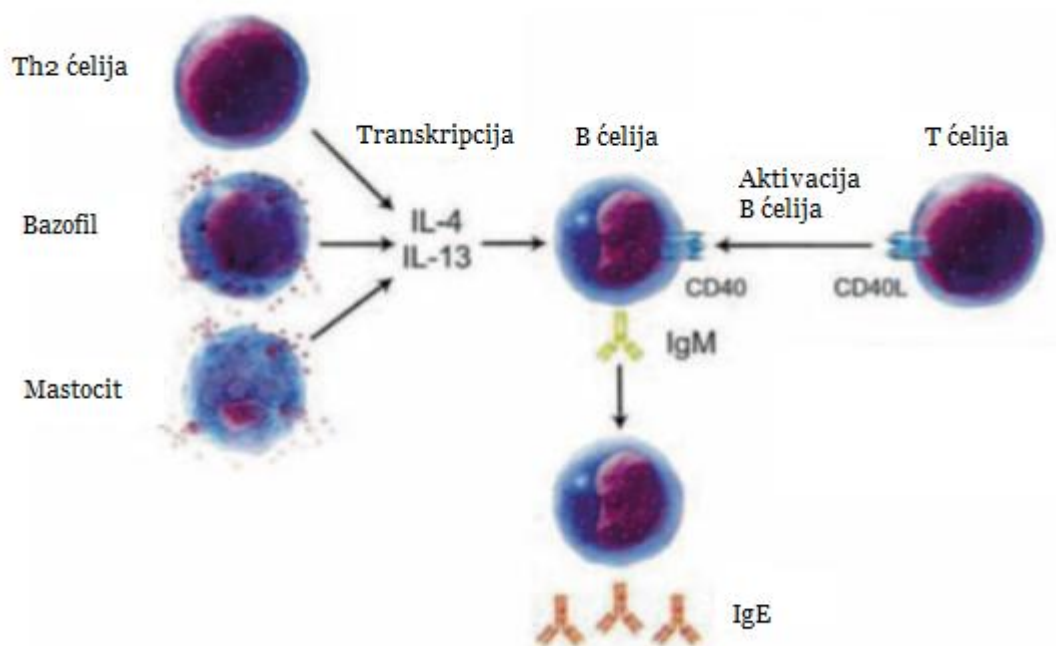
Alergeni, zatim, bivaju prepoznati od strane ubikvitina, visoko konzerviranog proteina koji sadrži 76 aminokiselina. Selektivno prepoznavanje alergena od strane ubikvitina predstavlja inicijalni signal za degradaciju proteina. Ubikvitinom obeleženi alergeni prelaze u tzv. proteozomalni kompleks i bivaju degradovani do peptidnih fragmenata. Tako nastali peptidni fragmenti se iskazuju preko glavnog kompleksa histokompatibilnosti klase II (MHC II) i DĆ migriraju ka T-ćelijskim zonama u limfnim čvorovima. Zatim DĆ prezentuju antigen tzv. naivnim T-ćelijama. Pomoćničke T ćelije (Th ćelije) ili CD4⁺ T ćelije se dele u dve klase - Th1 i Th2, u zavisnosti od citokina koje proizvode. CD4⁺ ćelije se diferenciraju u Th2 u prisustvu interleukina-4 (IL-4) (**slika 11**) (101).



Slika 11. Događaji koji nastaju nakon prvog izlaganja alergenu (modifikovano iz (101)).

Interleukin 4 (IL-4) sekretovan od strane urođenih limfoidnih ćelija, bazofila i NK ćelija (engl. *natural killer*) je ključan molekul u daljem razvoju Th2 imunog odgovora (105,106). Dodatno, aktivacija DĆ posredovana OX40 ligandom (OX40L) važan je korak u razvoju senzitivacije na alergene hrane (102).

Diferencirane Th2 ćelije sekretuju IL-4 i IL-13 koji indukuju preuključivanje klasa ka proizvodnji IgE. Otpočinjanje sinteze IgE od strane B ćelija zahteva signal od T ćelija (**slika 12**).

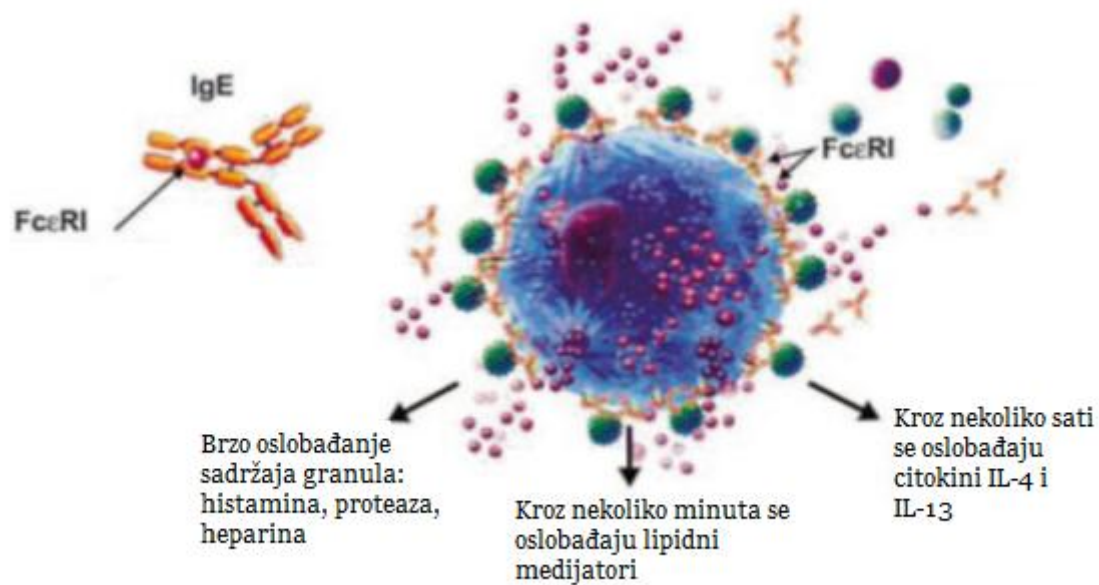


Slika 12. Sinteza specifičnih IgE molekula tokom faze senzitivacije (modifikovano iz (107)).

B ćelijama su neophodna dva signala za preključivanje klasa u pravcu sinteze IgE antitela. Prvi signal je indukovano IL-4 i IL-13, a drugi signal podrazumeva interakciju CD40 molekula na B ćelijama i CD40-L koji se nalazi na Th2 ćelijama. Oba signala pokreću niz događaja koji za posledicu imaju prenos signala u pravcu aktivacije određenih transkripcionih faktora, što za krajnju posledicu ima sintezu ϵ -teškog lanca imunoglobulina E (108).

Efektorska faza

Prva faza nastajanja alergijske reakcije podrazumeva formiranje IgE molekula od strane B ćelija, dok je druga faza efektorska. IgE molekuli cirkulacijom dospevaju do efektorskih ćelija: bazofila i mastocita (tkivni analog bazofila) i vezuju se za visokoafinitetne IgE receptore koji se nalaze na tim ćelijama. Prilikom drugog izlaganja alergenu dolazi do umrežavanja vezanih IgE molekula od strane alergena i degranulacije mastocita (**slika 13**) (108).



Slika 13. Medijatori koji se oslobađaju nakon umrežavanja IgE molekula alergenom (modifikovano iz (107)).

Nekoliko sati nakon oslobađanja alergijskih medijatora, efektorske ćelije sekretuju citokine IL-4 i IL-13. Bazofili i mastociti tokom degranulacije oslobađaju prostaglandine, leukotrijene, histamin, heparin, faktor aktivacije trombocita i eozinofilni hemotaktični faktor anafilakse, različite tipove proteolitičkih enzima i druge medijatore (101). Oslobađanje ovih medijatora za posledicu ima konstrikcije glatke muskulature, povećanu vazodilataciju i vazopermeabilnost. Kod nekih alergičnih ljudi, ove reakcije mogu dovesti do sistemske anafilakse i smrtnog ishoda (109–113).

Tokom efektorske faze medijatori koji se oslobađaju iz mastocita dovode do niza događaja koji izazivaju lučenje Th2 specifičnih medijatora, kao što su timusni stromalni limfopoietin (TSLP), IL-25 i IL-33. Ovi citokini dovode do povećanja ekspresije OX40 liganda i doprinose ekspanziji populacija ćelija koje sadrže IL-4 i IL-13, što za posledicu ima stimulaciju DĆ, smanjenje količine alergena-specifičnih T ćelija (Treg) i aktivaciju mastocita (114, 115). U mišjim modelima za astmu je pokazano da IL-33 dovodi do disregulacije Treg ćelija i, samim tim, narušavanja imunološke tolerance (112, 116).

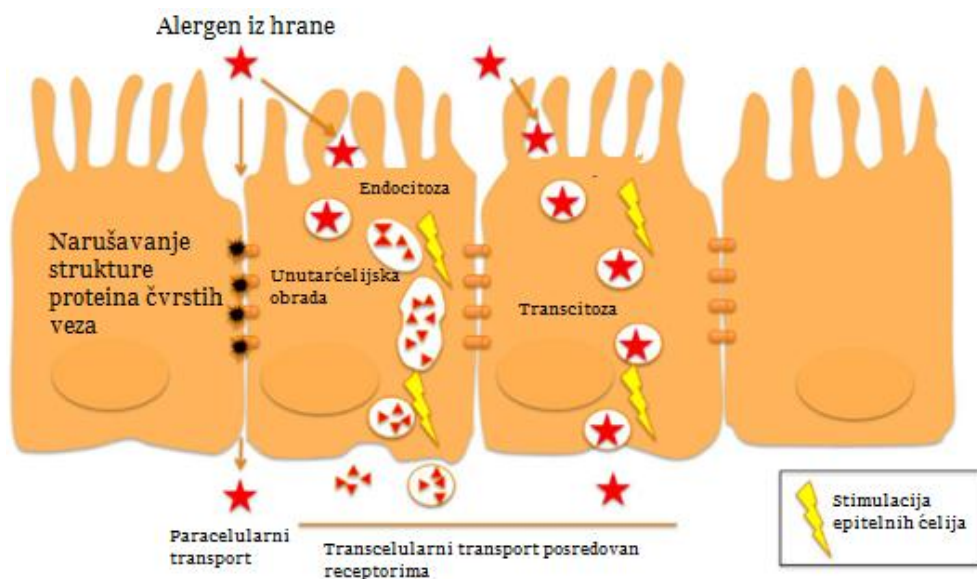
2.4.2. Molekulski procesi koji dovode do senzitivacije na alergene hrane

Kod dece i odraslih koji imaju kliničku sliku alergije na hranu propustljivost epitelnog sloja je povećana i prisutna i u slučajevima kada je ishrana svedena na maksimalno izbegavanje alergena hrane. Studija koja se bavila ispitivanjem propustljivosti epitela kod pacijenata sa alergijom na hranu pokazala je da čak 38 % pacijenata ima povećanu propustljivost premda je iz ishrane izbacilo alergenu hranu (117). Smatra se da povećana propustljivost crevnog epitela može omogućiti prolaz antigena i time dovesti do senzitivacije na određene antigene iz hrane. Sa druge strane, inflamatorni medijatori (citokini i proteaze) dodatno doprinose i vode do još većeg narušavanja integriteta barijere. Ove studije pokazuju da je, zapravo, jedan od mogućih uzroka nastanka alergija na hranu kompromitovana intestinalna barijera koja predstavlja faktor rizika za razvoj alergija na hranu (56).

Opšte prihvaćena činjenica je da proces senzitivacije u gastrointestinalnom traktu uključuje ćelije koje se nalaze u epitelnom monosloju (enterociti, Goblet ćelije, Panet ćelije, endokrine i M ćelije, kao i ćelije koje se nalaze u sloju *lamina propria* i koje se aktiviraju tokom tog procesa. M ćelije transportuju antigen direktno do ćelija imunog sistema. Makrofagi i dendritske ćelije direktno uzorkuju antigen iz lumena creva posredstvom svojih pseudopodija. Ovom prilikom se čvrste veze otvaraju i omogućava se uzorkovanje antigena, nakon čega se međućelijske veze odmah regrupišu i ponovo formiraju intaktnu barijeru (118, 119). Uloga Goblet ćelija u ovom procesu je u transportu manjih peptida (<10 kDa) kroz intestinalni zid. Gastrointestinalni epitel tokom faze senzitivacije luči reaktivne kiseonične vrste (ROS), medijatore koji vode ka razvijanju specifičnog Th2 odgovora (IL-1, TSLP, IL-25, IL-33). Kod senzitivisanih pacijenata, Th2 ili urođene limfoidne ćelije lučenjem inflamatornih medijatora (TNF- α , IL1- β) stimulišu transport antigena preko CD23 receptora koji je eksprimiran na enterocitima. Alergen-IgE kompleksi se transcelularno prenose putem ovih receptora (120, 121). Neke studije su pokazale da antigeni koji se transportuju posredstvom ovog receptora bivaju zaštićeni od lizosomalne

degradacije (120, 122). Senzitivizacija u gastrointestinalnom traktu može se desiti i nakon kutanog izlaganja alergenu, što potkrepljuju studije na miševima testiranjem ovalbumina i proteina lešnika. Pokazano je da kožnim izlaganjem alergenima može doći do anafilaktičkih reakcija (123).

Paracelularni transport je ograničen veličinom pora propustljivih za manje molekule (**slika 14**) (82, 124). Proteini koji se transportuju paracelularnim putem ne bivaju izloženi lizosomalnoj degradaciji u enterocitima (120, 121). Sa druge strane, prolaz celih proteina omogućava kontakt sa imunim ćelijama u sub-epitelnom kompartmentu gastrointestinalnog trakta.



Slika 14. Molekulski događaji koji prethode senzitivizaciji na alergene hrane (modifikovano iz (123)).

Određeni alergeni dovode do promena na nivou ekspresije iRNK za proteine čvrstih veza zahvaljujući svojoj proteznoj aktivnosti (Der p 1) (125). Neki alergeni (Ara h 2) utiču na propustljivost monosloja procesom koji uključuje endocitozu i utiču na ekspresiju proteina A20 (engl. *zink finger*), koji učestvuje u održavanju tkivne homeostaze i reguliše proces ubikvitinacije (126). Većinu proteina i peptida apsorbuju epitelne ćelije putem endocitoze. Oko 90 % transcelularno transportovanih proteina se unutarćelijskim enzimima degraduje do aminokiselina i peptida (124).

Alergeni koji potiču iz različitih izvora poseduju proteaznu aktivnost (alergeni iz kućne prašine, gljiva, ili polena) i, kao takvi, mogu direktno narušiti strukturu međucelijskih veza a, samim tim, i integritet gastrointestinalne barijere (**tabela 2**) (89).

Tabela 2. Alergeni hrane sa proteaznom aktivnošću i njihov efekat na integritet epitelne barijere *in vitro* i *in vivo*

Izvor alergena	Enzim i dejstvo	Efekat
Kućna prašina (127)	Der p 1; Raskidanje okludina i kladina	Povećanje propustljivosti u uzorcima biopsije
Kivi (128,129)	Act d 1; Raskidanje okludina	Povećanje propustljivosti u Caco-2 i T84 ćelijama
Ananas (130)	Ana c 2; Čvrste veze	Povećanje propustljivosti u Caco-2
Papaja (130)	Car p 1; Čvrste veze	Povećanje propustljivosti u Caco-2

Alergeni sa proteolitičkom aktivnošću mogu da raskidaju veze koje formiraju okludin i E-kadherin, što za posledicu ima direktnu aktivaciju imunog sistema (44).

Takođe, pokazano je da alergeni sa proteaznom aktivnošću (Der p 1) uzrokuju proizvodnju ROS i to proteolizom i samom aktivacijom receptora koje aktiviraju proteaze (PAR-2) (125). Kao posledica tih događaja, proteini čvrstih veza kao što su ZO 1 i okludin bivaju dostupni proteolitičkoj aktivnosti alergena i njihovim dejstvom se povećava transepitelni prolaz do ćelija imunog sistema (131, 132). Produkcija ROS se može izazvati i direktnom aktivacijom TLR. Aktivacija TLR podrazumeva i fosforilaciju od strane c-Src signala i aktivaciju fosfoinozimid-3 kinaze i fosfolipaze C za aktivaciju NF- κ B, kao i ekspresiju hemokina koji obezbeđuju regrutaciju limfocita i dovode do povećane sinteze mukusa. Kalcijum-zavisne proteaze vrše proteolizu transmembranskih proteina čvrstih veza (okludin i E-kadherin) i time indukuju trans-migraciju leukocita (133).

Aktivacija NF- κ B je povezana sa povećanom ekspresijom IL-33, IL-25, TSLP, mokraćne kiseline i ATP od strane epitelnih ćelija intestinuma, kao i aktivacijom i migracijom dendritskih ćelija prilikom senzitivacije na Der p 2 alergen (134). Pri

tom procesu se sintetišu IL-1 β i IL-6, omogućavajući proinflamatornu mikrosredinu i promovišući Th2 odgovor, kome dodatno doprinosi i mokraćna kiselina (95,135,136). Doprinos TSLP, IL-33 i IL-25 citokina u razvoju Th2 odgovora je značajan, a sam IL-33 učestvuje u senzitivaciji i u aktivaciji dendritskih ćelija, bazofila, mastocita i eozinofila. Takođe, IL-33 aktivira različite signalne puteve (ERK, MAPK, NF- κ B) relevantne za Th2 odgovor (137).

Mnogi signalni putevi koji bivaju aktivirani različitim stimulusima iz spoljašnje sredine konvergiraju ka transkripcionoj aktivaciji NF- κ B u respiratornom epitelu, a aktivacija ovog puta vodi do gubljenja tolerance i izazivanja imunološke reakcije (138, 139). Indukcija ekspresije E-kadherina sprečava aktivaciju NF- κ B, dok gubitak međucelijskog kontakta, narušavanjem strukture E-kadherina, ima suprotan efekat aktivaciju NF- κ B puta (140). Iz tog razloga balans između ekspresije E-kadherina i aktivacije NF- κ B konstituše epitelnu molekulsku spregu između tolerogenog i proinflamatornog/imunogenog fenotipa (44). U skladu sa ovim, snižena ekspresija E-kadherina vodi do povećane proinflamatorne aktivnosti respiratornog epitela, promovišući ekspresiju Th2 hemokina CCL17 i TSLP. Posledica ovih događaja je povećana propustljivost epitela i aktivacija NF- κ B signalnog puta. Sveukupno posmatrano, E-kadherin ima značajnu funkciju u održanju tolerogenog fenotipa epitela (44).

2.5. Alergija na kivi

Kivi (*Actinidia deliciosa*) pripada porodici *Actinidiaceae*. Uspeva u predelima koji se prostiru dolinom reke Jangcekjang u Kini. Prvi put je izvezen na Novi Zeland 90-tih godina prošlog veka pod nazivom "kineski ogrozd". Od tada je razvijeno mnogo sorti kivija (oko 55) koje rastu kao strukture po visini slične vinovoj lozi, a dostižu i do 9 metara. Kada je Novi Zeland počeo da izvozi ovo voće, ime mu je tada i promenjeno u danas poznato - kivi, kako bi se bliže identifikovalo sa pticom koja predstavlja nacionalni simbol ove države. Najčešće vrste kivija koje se nalaze na trpezi su *Actinidia deliciosa* (zeleni kivi) i *Actinidia chinensis* (zlatni kivi) koji imaju zelenu i žutu pulpu, respektivno, a razlikuju se, kako po ukusu, tako i sadržaju alergena (13,141).



Slika 15. Plodovi zelenog (*Actinidia deliciosa*) i zlatnog kivija (*Actinidia chinensis*)¹

Donedavno se širom sveta proizvodio mahom zeleni kivi, ali od 1999. godine je počela proizvodnja i zlatne sorte ovog voća. Ukus zlatnog kivija se razlikuje od zelenog po kiselosti, koja je znatno manja, i u zreloj formi je slađi (142).



Slika 16. Ptica kivi sa Novog Zelanda po kojoj je ovo voće dobilo ime²

Danas se kivi uzgaja u južnoj Kaliforniji, južnom Teksasu i delovima Floride. Kivi je veoma bogat vitaminom C, a glavna upotreba u ljudskoj ishrani je u pripremi različitih salata i deserata, gde pruža osim dekorativnih i za ishranu značajne nutritivne sastojke (143). Kivi ima snažan antioksidativni kapacitet zahvaljujući prisustvu brojnih fitonutritijenata (karotenoida, luteina, fenola, flavonoida i hlorofil) (144). Prema Bazi podataka hranljivih sastojaka Sjedinjenih Američkih država iz 2018. godine, kivi je odličan izvor vlakana, ugljenih hidrata,

¹ Slika dostupna na URL: <https://www.zespri.eu/en/kiwi/organic-kiwi>

² Slika dostupna na URL: <https://fineartamerica.com/featured/kiwi-bird-and-kiwifruit-daniel-eskridge.html?product=wood-print>

vitamina C i E, minerala, omega-3 masnih kiselina, antioksidanata (145) (**tabela 3**).

Tabela 3. Nutritivni sastav ploda kivija na 100 g voća (preuzeto i modifikovano iz (146)).

Nutritijenti	Količina
Energija	61 kcal
Voda	83 %
Ugljeni hidrati	14.66 g
Vlakna	3 g
Šećeri	8.99 g
Proteini	1.14 g
Kalcijum	34 mg
Magnezijum	17 mg
Kalijum	312 mg
Fosfor	34 mg
Vitamin C	92.7 mg
Vitamin E	1.46 mg
Masne kiseline	363 mg

Prvi zabeležen slučaj alergije na kivi datira iz 1981 godine (143). Alergija na kivi se klasifikuje kao jedna od značajnih alergija na voće i može se razviti kao monosenzitizacija ili kao ukrštena reaktivnost na alergiju na polen ili lateks (147). Smatralo se čak da je alergija na kivi, zapravo, nova manifestacija alergija povezanih sa polenom breze (148).

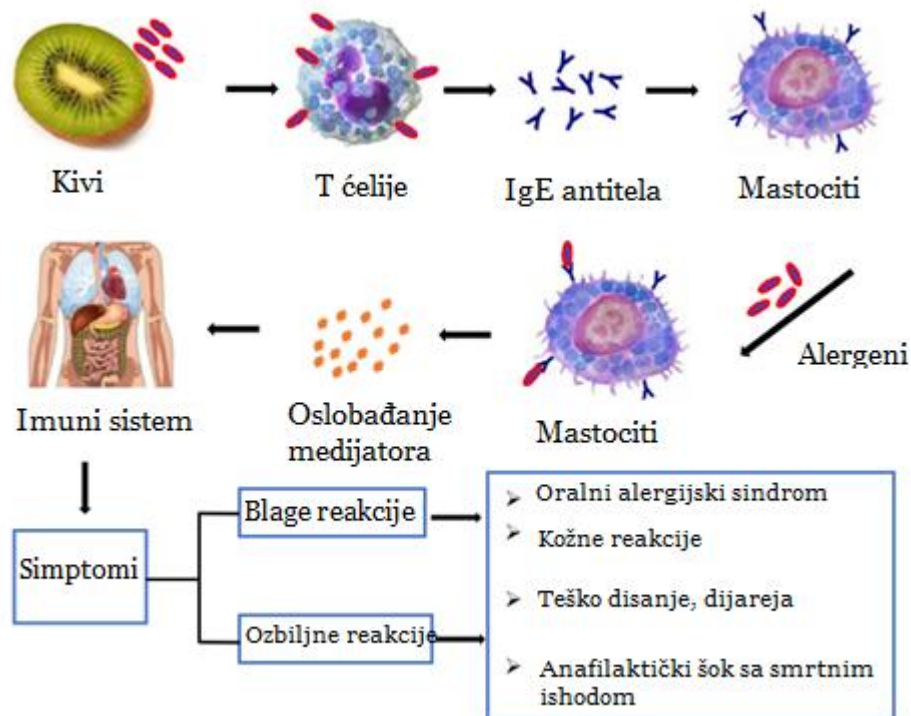
Kliničke manifestacije alergije na kivi su širokog spektra i mogu biti u opsegu od ne tako ozbiljnih simptoma povezanih sa oralnim alergijskim sindromom do anafilakse (13). Najčešće alergijske reakcije se ispoljavaju nekoliko minuta nakon konzumacije ovog voća. Glavni simptomi su oralni alergijski sindrom (oko 75 % alergičnih na kivi), urtikarija, abdominalni bol, rinitis, umerena dispneja, cijanoza i anafilaksa (148–151).

2.5.1. Epidemiologija, patogeneza i klinički simptomi alergije na kivi

Kako je prvi zabeležen slučaj alergije na kivi iz 1981. godine, do danas je zapažen rast slučajeva alergija na kivi posebno kod odraslih. Podaci iz aprila 2018.

u bazi podataka Web of Science ukazuju na porast broja publikovanih naučnih radova u kojima se ispituju mehanizmi senzitivacije na kivi, što je zapravo u korelaciji sa rastom rasprostranjenosti ove alergije širom sveta. U nekim evropskim zemljama, npr. Španiji, oko 2 % ukupne populacije pati od alergije na kivi (152). Statistika ukazuje na to da se velika količina stabala breze nalazi u Evropi što može doprineti i porastu broja zabeleženih slučajeva alergije na kivi, shodno ukrštenoj reaktivnosti alergena breze sa homologim proteinima kivija (146, 153, 154).

Alergija na kivi se zasniva na specifičnoj reakciji imunog sistema do koje dolazi nakon ingestije ovog voća. Razvoj alergije na kivi je šematski prikazan na **slici 17**. Ovaj odgovor imunog sistema dovodi do nastanka alergen-specifičnih IgE antitela u prvoj fazi poznatoj kao faza senzitivacije. Novoformirana IgE antitela se vezuju za specifične efektorske ćelije imunog sistema (mastociti, bazofili).



Slika 17. Put senzitivacije na kivi i razvoj alergijske reakcije (modifikovano iz (146)).

Prilikom sledeće konzumacije kivija ili sličnog voća, alergeni se vezuju za specifična IgE antitela i time se aktiviraju visokoafinitetni IgE receptori na površini mastocita (6). Aktivacija mastocita dovodi do oslobađanja histamina i drugih inflamatornih medijatora koji karakterišu inicijalne simptome alergije na kivi (155). Kivi, polen breze i trava (150), avokado (156), banana (157), kikiriki i orašasti plodovi (158) sadrže homologe alergene i iz tog razloga senzitivizacija na jedan izvor može rezultovati simptomima koji se javljaju po ingestiji drugog, zbog prisustva ukršteno reaktivnim proteina. Primera radi, individue koje su senzitivisane na polen drvetu imaju IgE specifičan na proteine polena. Ovi IgE molekuli mogu prepoznati proteine sa sličnim strukturama koji se nalaze u kiviju. To zatim vodi do aktivacije IgE molekula vezanih za površinu mastocita. (159).

Simptomi alergije na kivi su raznoliki, uključujući simptome oralnog alergijskog sindroma (svrab, peckanje u ili oko usana, jezika i grla). Simptomi na koži mogu biti osip, svrab, ekcemi, eritem i angioedem. Takođe, alergija na kivi može izazvati i ozbiljne reakcije kao što je anafilaktički šok, a ishod može biti fatalan (13).

2.5.2. Alergeni kivija

Prema internacionalnoj Uniji Imunoloških društava podkomiteta za nomenklaturu alergena (IUIS- www.allergens.org) do sada je identifikovano 13 alergeni proteina kivija, sa opsegom molekularnih masa od 10 do 50 kDa (14) (**Tabela 4**). Prvootkriveni su bili aktinidin (Act d 1) i taumatinu sličan protein Act d 2 (160). Najvažniji među njima, aktinidin (Act d 1) pripada familiji cistein-proteaza i identifikovan je u većini monosenzitivisanih pacijenata na kivi (13, 150, 151). Act d 2, taumatinu-sličan protein, je drugi po važnosti alergen kivija. On je ukršteno reaktivan sa proteinima drugog voća iz iste familije (Mal d 2 iz jabuke i Pru av 2 iz trešnje) (161). Act d 1 i Act d 2 se u biljnom tkivu kivija sintetišu u odgovoru na stres prilikom sušnih perioda ili napada patogenih mikroorganizama koji pokreću reakcije imunog sistema (146). Ostali proteini kivija su, takođe, opisani kao alergeni ali imaju znatno niži alergeni potencijal od Act d 1 i Act d 2 (11).

Tabela 4. Alergeni kivija

Alergen	MM (kDa)	Naziv proteina
Act d 1	27	Aktinidin
Act d 2	24	Protein sličan taumatinu
Act d 3	42	Glikoprotein nepoznate funkcije
Act d 4	11	Inhibitor cistein proteaza
Act d 5	26	Kivelin
Act d 6	18	Pektin metilesterazni inhibitor
Act d 7	50	Pektin metilesteraza
Act d 8	17	Protein povezan sa patogenezom klasa 10 (PR-10)
Act d 9	14	Profilin
Act d 10	10	Nespecifični protein za transfer lipida (LTP)
Act d 11	17	Glavni lateks protein/pretein povezan sa zrenjem
Act d 12	50	11S globulin
Act d 13	11	2S albumin

Alergeni kivija pripadaju biljnim proteinima koji su povezani sa patogenezom, i pripadaju sledećim familijama: PR10, taumatinu-slični proteini (TLP), nespecifični proteini za transfer lipida (nsLTP) i profilini. Proteini povezani sa patogenezom 10 (PR-10) su prisutni u raznom voću (višnja, trešnja, breskva) i imaju između 151-162 aminokiseline (162). Ovi proteini izazivaju simptome specifične za oralni alergijski sindrom. LTP familiju čine proteini koji se sintetišu u odgovoru biljke na različite stresne agense iz spoljašnje sredine (virusne ili bakterijske infekcije) (163). Proteini iz ove familije su izgrađeni od oko 200 aminokiselinskih ostataka. ns-LTP se, generalno, nalaze u jagodama, breskvama, itd. i molekulska masa im se kreće od 7-9 kDa (154). Profilini su proteini molekulske mase od 12 do 15 kDa i učestvuju u regulaciji polimerizacije aktinskih filamenata. Nalaze se u različitim vrstama voća (mango, dinja, jagode, pomorandža). (162).

Period sazrevanja voća nakon branja poboljšava boju, ukus i sadržaj nutritijenata, što se odnosi na sam kvalitet (164). Takođe, proces sazrevanja utiče i na prisutnost alergena u plodu kivija. Pokazano je da se tokom sazrevanja povećava i ukupan sadržaj proteina sa 20 do 300 mg/100 g voća (165). Postoje proteini koji pripadaju ovoj klasi alergena, a nazivaju se proteinima povezanim sa

procesom sazrevanja. Sadržaj Act d 1, Act d 2 i Act d 5 nakon branja (42. dan) se drastično menja tokom procesa sazrevanja (104 dana), pa se ovi alergeni i svrstavaju u ovu klasu (165). Osim alergena iz kivija, ovoj klasi pripadaju i alergeni breskve (Pru p 3) (166) i jabuke (Mal d 1 i Mal d 3) (146, 167).

2.5.3. Aktinidin

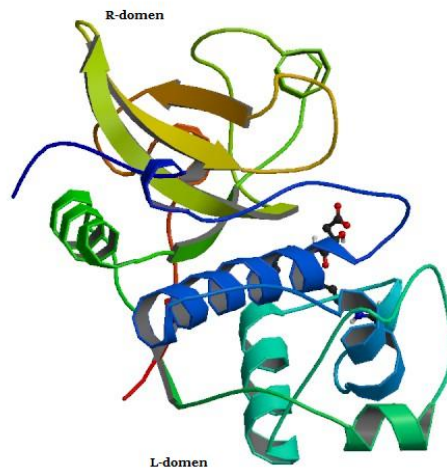
Naziv aktinidin je prvi put predložen od strane Arkusa 1959. Godine, a izvedeno iz naziva roda biljke *Actinidia*. U zavisnosti od konteksta spominjanja, pojavljuju se i nazivi Actinidia, kada se govori o enzimskoj aktivnosti ovog proteina, ili Act d 1, kada se opisuju njegove imunološke osobine. Prvi izveštaj o izolovanju ove cistein proteaze iz kivija (tada znanom kao kineski ogrozd) datira iz 1959. godine (168). Prva studija o prečišćavanju aktinidina i njegovoj kristalizaciji je zabeležena 1970. godine (169). Istraživanja iz prethodnih decenija donela su detaljne podatke o primarnoj sekvenci aktinidina (170), kristalnoj strukturi (170–174) i enzimskoj aktivnosti (175).

Biološka uloga biljnih cistein proteaza još uvek nije u potpunosti razjašnjena. Aktinidin ima široku supstratnu specifičnost i prisutan je u većem broju izoformi od kojih su neke neaktivne. Zbog toga se pretpostavlja da je uloga aktinidina u kiviju odbrana od patogenih mikroorganizama (176). Različite vrste kivija imaju različit nivo aktinidina, pa tako se u zlatnom kiviju može naći oko 1 % ovog proteina, za razliku od zelenog, gde aktinidin čini oko 50 % ukupnih solubilnih proteina (177). Sa druge strane, neke sorte kivija ne eksprimiraju aktinidin ili eksprimiraju njegove neaktivne izoforme. Ove informacije dodatno idu u prilog mišljenju da aktinidin nema krucijalnu ulogu u metabolizmu voća. Prisustvo aktinidina u kiviju je uglavnom u mesu ploda, a aktivnost mu se povećava par nedelja nakon branja (165). Aktinidin se eksprimira kao neaktivan zimogen, koji je oko 15 kDa duži u odnosu na aktivan enzim sa N-terminalnim (57 aminokiselina) ili C-terminalnim završecima (25 aminokiselina) (176, 178). Mehanizam *in vivo* aktivacije još uvek nije poznat.

2.5.3.1. Struktura aktinidina

Aktinidin (EC 3.4.22.14) je globularni protein koji se sastoji iz jednog polipeptidnog lanca (220 aminokiselina) uvijenog u dva domena. L domen

(domen I) sastoji se od aminokiselina 19-115 i od 214-220 a R domen (domen II) od 1-18 i 116-213 (12). Molekulska masa aktinidina je 23.8 kDa, a pI vrednost 3.5 (10). L domen sadrži tri područja sa α -heliksima pri čemu glavni heliks prolazi kroz centralni deo molekula koji se nalazi između dva domena. R domen formira uvijeno antiparalelno β -bure sa hidrofobnom unutrašnjošću. Dva kraja se završavaju kratkim heliksima koji se nalaze na površini proteina. Svaki od domena sadrži hidrofobno jezgro i mesto između dva domena u kome se nalazi katalitičko mesto, izgrađeno pretežno od hidrofilnih aminokiselina. Struktura proteina je stabilizovana prisustvom tri disulfidna mosta: Cys22-Cys65, Cys56-Cys98 i Cys156-Cys206. Postoje i kisele i bazne forme aktinidina opsega pI 4.1-8.6 (176).



Slika 18. Kristalna struktura aktinidina sa inhibitorom E-64 u rezoluciji 1.7 \AA^3

Aktinidin katalizuje reakciju hidrolize peptidnih veza i estara. Obrazac hidrolize je sličan papainu: P2 ostatak (druga aminokiselina koja se nalazi na N-terminalu od mesta hidrolize) je hidrofobna (Leu, Val ili Phe). Aktinidin ima širok pH opseg aktivnosti (3-6) sa optimumom na pH 4.0 kada se kao supstrat koriste proteini kao što je želatin. Aktivnost aktinidina se inhibira različitim supstratima specifičnim za cistein proteaze: jodoacetamid (IAA), Hg^{2+} , 5,5'-dithio-bis-(2-

³ Dostupno na URL: [10.2210/pdb1AEC/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb1AEC/pdb)

nitrobenzoeva kiselina) (DTNB), N-(trans-Epoksisukcinil)-L-leucin 4-guanidinobutilamid (E-64) (179).

Aktinidin se smatra glavnim alergenom kivija i markerom monosenzitizacije na kivi jer ne pokazuje svojstva ukrštene reaktivnosti sa alergenima polena trava ili breze (142,153,160,180). Aktinidin zadržava alergena svojstva i nakon inkubacije na višim temperaturama (95 °) (181). U uslovima simulirane želudačne i intestinalne digestije, aktinidin zadržava enzimsku aktivnost, što implicira da ovaj enzim ostaje intaktan u gastrointestinalnom traktu čoveka i može da pospeši digestiju proteina (182, 183). Pokazano je da proteolitička aktivnost Act d 1 utiče na morfologiju intestinalnih epitelnih ćelija (184).

3. Ciljevi

Molekulski mehanizam kojim proteolitički enzimi iz određenih alergeni izvora mogu doprineti procesu senzitivacije kod prvog tipa imunološke preosetljivosti, koji se označava kao alergija, još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Predmet istraživanja ove doktorske disertacije ima za cilj ispitivanje efekta aktinidina na mehanizam senzitivacije kod alergije na kivi. Aktinidin je cistein proteaza iz ploda zelenog kivija, koji je, zahvaljujući strukturnim i imunološkim svojstvima, označen kao glavni alergen ovog voća. U cilju razumevanja molekulskog mehanizma senzitivacije kod alergije na kivi, korišće se *in vivo* i *in vitro* model sistemi za ispitivanje efekta aktinidina. Naime, u ovom radu su prvi put do sada korišćeni 2D organoidi iz mišjih intestinalnih ćelija i ispitivan je njihov odgovor na tretman aktinidinom. Tokom izrade ove disertacije, praćen je efekat aktinidina na integritet intestinalnih epitelnih ćelija i proteina čvrstih veza. Takođe, ispitivana je sposobnost aktinidina da utiče na proizvodnju signalnih molekula od strane epitelnih ćelija koji su odgovorni za pokretanje imunološkog odgovora.

U okviru ove doktorske disertacije formulisani su sledeći ciljevi:

- Prečišćavanje aktinidina iz ploda kivija klasičnim biohemijskim metodama i određivanje proteolitičke aktivnosti
- Ispitivanje efekta aktinidina na integritet epitela gastrointestinalnog trakta miša (C57BL/6 soj) i ekspresiju proteina čvrstih veza (ZO 1, klaudin 3, E-kadherin)
- Ispitivanje efekta aktinidina na integritet 2D organoida poreklom od mišjih intestinalnih ćelija i proizvodnju proinflamatornih citokina (IL-33)
- Ispitivanje efekta aktinidina na integritet čvrstih veza epitelne ćelijske linije (Caco-2) *in vitro* i proizvodnju proinflamatornih citokina (TNF α , IL1- β , IL-33 i TSLP)
- Ispitivanje efekta aktinidina na čvrste veze (ZO 1, klaudin 3, E-kadherin) u intestinalnim epitelnim ćelijama

4. Rezultati

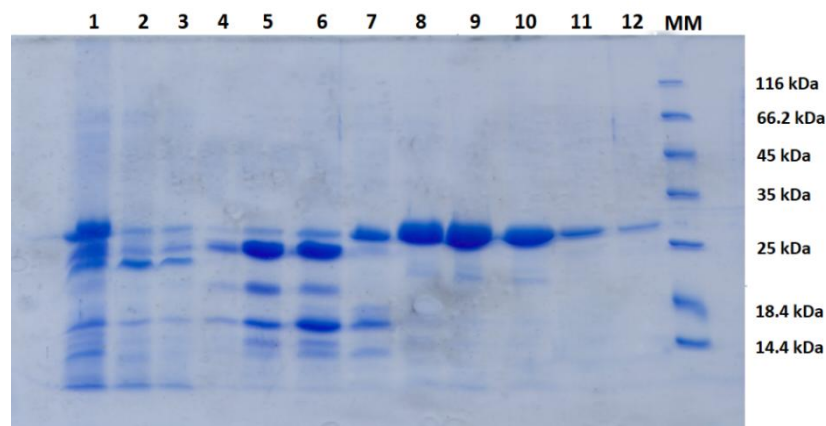
4.1. Prečišćavanje aktinidina iz sirovog ekstrakta ploda zelenog kivija

Priprema sirovog ekstrakta zelenog kivija, kupljenog u lokalnoj prodavnici, je rađena po prethodno optimizovanoj metodi (16,181). Izolovanje aktinidina iz sirovog ekstrakta je omogućeno kombinacijom dve jonoizmenjivačke hromatografije na kolonama sa QAE-Sephadex A-50 i SP-Sephadex C-50 matriksom. Prilikom izolovanja, nisu dodavani inhibitori enzima a homogenost izolovanog preparata aktinidina je proveravana pomoću SDS-PAG elektroforeze (u redukujućim uslovima) kao i masenom analizom fragmenata dobijenih nakon tripsinske digestije traka isečenih iz poliakrilamidnih gelova. Iz 400 g kivija dobijeno je oko 80 mg prečišćenog aktinidina. Prečišćeni protein je liofilizovan i uskladišten na -20 °C.

4.2. Karakterizacija prečišćenog preparata aktinidina

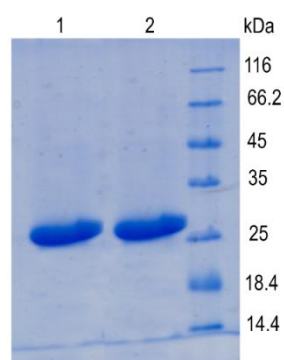
Svaki korak tokom izolovanja aktinidina analiziran je SDS-PAG elektroforezom, čime se stiče uvid o čistoći i sastavu pojedinačnih frakcija tokom prečišćavanja. Elektroforeza je rađena u redukujućim uslovima uz korišćenje proteinskih markera, radi približnije provere molekulskih masa izolovanih proteina. Tokom prečišćavanja aktinidina hromatografijom na anjonskom izmenjivaču (QAE-Sephadex A-50), vezani proteini su eluirani gradijentom soli od 0,1 do 0,5 M NaCl u radnom puferu (20 mM TRIS pH 8.0).

Analizom elektroforetskog profila sakupljenih frakcija nakon hromatografije na QAE-Sephadex A-50 zapaža se prisustvo aktinidina u frakcijama 8-12, gde je uočljiva pojava dominantne trake koja odgovara pokretljivosti proteina od približno 25 kDa, što odgovara literaturnim podacima za aktinidin (**slika 19**) (160).



Slika 19. Provera čistoće izolovanog preparata aktinidina na SDS-PAGE. 1) ekstrakt nanesen na QAE-Sephadex kolonu, 2,3) frakcije nevezanih proteina, 4) frakcija eluirana 0,1 M NaCl, 5,6) frakcije eluirane 0,2 M NaCl, 7,8) frakcije eluirane 0,3 M NaCl, 9,10) frakcije eluirane 0,4 M NaCl, 11,12) frakcije eluirane 0,5 M NaCl, MM) molekularni markeri.

Preparat aktinidina najveće čistoće dobijen je u frakcijama koje su eluirane 0,4 M i 0,5 M NaCl. Ove frakcije, zajedno sa jednom frakcijom eluiranom 0,3 M NaCl, su dijalizovane i skoncentrovane do 1 mg/mL. Tako skoncentrovan preparat aktinidina je liofilizovan, a na **slici 20** je prikazan profil preparata prečišćenog proteina, dobijen na SDS-PAGE nakon liofilizacije, rastvaranjem u fosfatnom puferu pH 6.6 i medijumu za gajenje intestinalnih epitelnih ćelija.

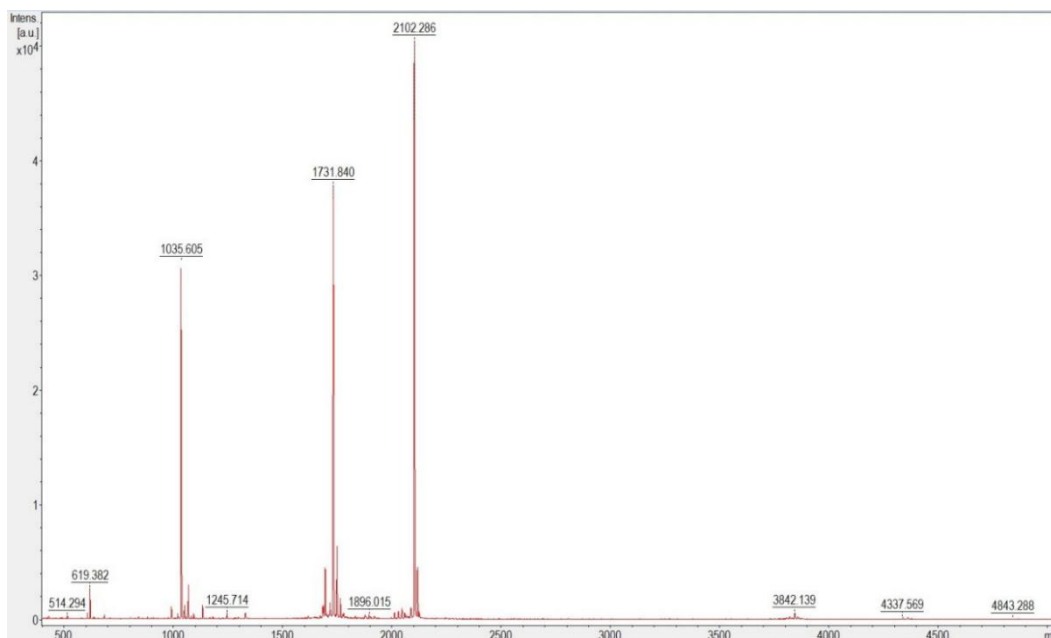


Slika 20. SDS-PAGE liofilizovanog preparata aktinidina. Liofilizovani protein je rastvoren u 1) medijumu za uzgajanje intestinalnih epitelnih ćelija, 2) fosfatnom puferu pH 6.6.

Uzorci prečišćenog aktivnog i inhibiranog aktinidina (1 mg/mL i 0.1 mg/mL) nisu uticali na vijabilnost ćelija (*MTT assay*). Takođe, količina LPS u prečišćenom preparatu aktinidina, koji je korišćen u ovom radu, je iznosila 0.53 EU/mg proteina (*Limulus ameobocyte lysate (LAL) chromogenic endotoxin quantification kit* (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)).

4.2.1. Masena analiza prečišćenog aktinidina

Proteinska traka dobijena na oko 25 kDa nakon analize na SDS-PAGE je isečena iz gela, obezbojena i tretirana standardnim protokolom za pripremu uzorka za masenu analizu (redukcija, alkilacija i tripsinizacija). Dobijeni peptidi su analizirani pomoću MALDI TOF/TOF uređaja (Ultraflextreme, Bruker) (**slika 21**). Matriks korišćen tokom ove analize je α -cijano-4-hidroksicinaminska kiselina a spektri su sakupljeni u pozitivnom modu.



Slika 21. MS spektar peptida dobijenih tripsinskom digestijom trake (25 kDa) isečene iz SDS-PA gela.

Pretraživanje peptida je izvršeno prema sekvencama aktinidina koje se nalaze u bazi Uniprot⁴ a pomoću MASCOT⁵ programa. Identifikovani peptidi odgovaraju sekvenci aktinidina zavedenoj pod pristupnim brojem A5HII1 sa pokrivenošću sekvence od 47 % (**slika 22, tabela 5**).

Pokrivenost sekvence 47 %

Detektovani peptidi su označeni *crvenom bojom*

```

1  MGLPKSFVSM  SLLFFSTLLI  LSLAFNAKNL  TQRTNDEVKA  MYESWLIKYG
51  KSYNSLGEWE  RRFEIFKETL  RFIDEHNADT  NRSYKVGLNQ  FADLTDEEFR
101 STYLGFTSGS  NKTKVSNRYE  PRVGQVLPSY  VDWRSAHAVV  DIKSQGECEGG
151 CWAFSAIATV  EGINKIVTGV  LISLSEQELI  DCGRTQNTRG  CNGGYITDGF
201 QFIINNGGIN  TEENYPYTAQ  DGEENLDLQN  EKYVTIDTYE  NVPYNNEWAL
251 QTAVTYQPVS  VALDAAGDAF  KHYSSGIFTG  PCGTAIDHAV  TIVGYGTEGG
301 IDYWIVKNSW  DTTWGEEGYM  RILRNVGAG  TCGIATMPSY  PVKYNQNHHP
351 KPYSSLINPP  AFSMSKDGVP  GVDDGQRYSA
    
```

Slika 22. Peptidi aktinidina (A5HII1) detektovani masenom spektrometrijom, analizirani pomoću MASCOT programa.

Tabela 5. Peptidni fragmenti identifikovani masenom spektrometrijom (crvena boja)

Molekulska masa (Da)	Sekvenca
4729.073	GCNGGYITDGFQFIINNGGINTEENYPYTAQDGEENLDLQNEK
4337.092	YVTIDTYENVPYNNEWALQTAVTYQPVSVALDAAGDAFK
3784.832	HYSSGIFTGPCGTAIDHAVTIVGYGTEGGIDYWIVK
2634.277	YNNQNHPKPYSSLINPPAFS MSK
2228.011	SQGECEGCWAFSAIATVEGI NK
2045.095	IVTGVLISLSEQELIDCGR
1822.883	NVGGAGTCGIATMPSZPVK
1731.707	NSWDTTWGEEGYMR
1114.512	DGPVGVDDGQR
1035.526	LPSYVDWR
859.4883	SAGAVVDIK
619.3158	TQNTR
401.2871	ILR
340.1503	YSA

⁴ Dostupno na URL: <https://www.uniprot.org/>

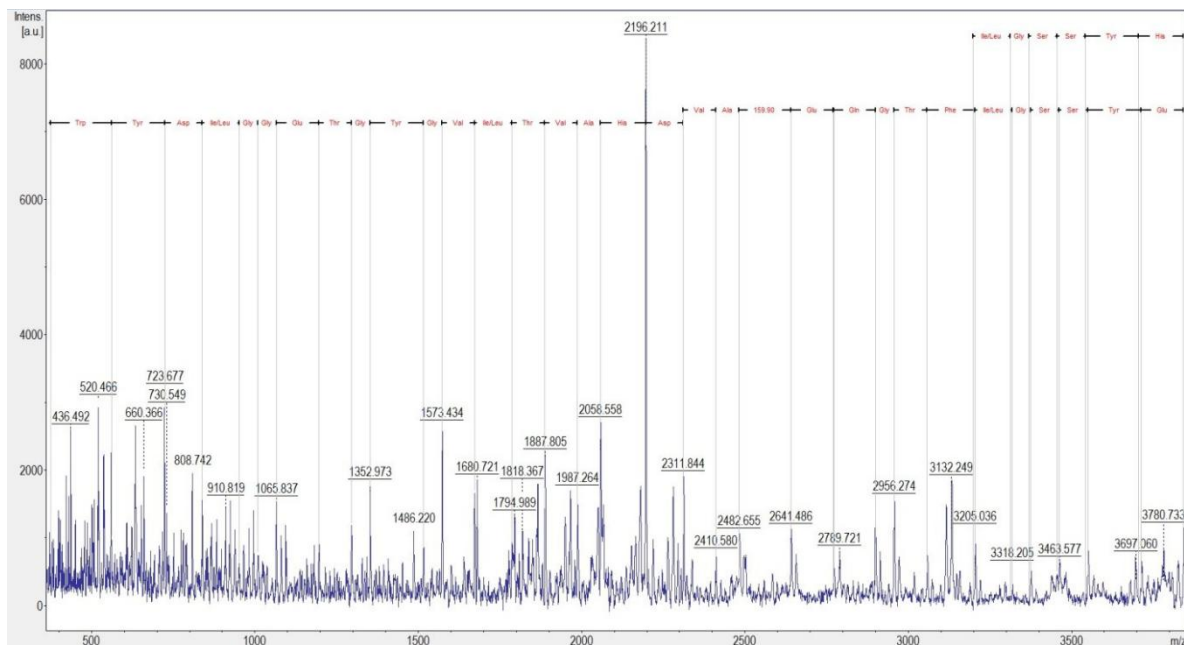
⁵ Dostupno na URL: http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF

Međutim, masa intaktnog prečišćenog aktinidina je bila za oko 3.5 kDa niža od A5HII1 sekvence aktinidina (27452 Da). Sekvence 6 peptida identifikovane su pomoću MS/MS analize (**tabela 6**).

Tabela 6. Peptidi aktinidina identifikovani pomoću MS/MS (crvena boja)

Molekulska masa (Da)	Sekvenca
4729.073	GCNGGYITDGFQFIINNGGINTEENYPYTAQDGECLDLQNEK
4337.092	YVTIDTYENVPYNNEWALQTAVTYQPVSVALDAAGDAFK
3784.832	HYSSGIFTGPCGTAIDHAVTIVGYGTEGGIDYWIVK
2634.277	YNNQNHPKPYSSLINPPAFS MSK
2228.011	SQGECCGCWAFSAIATVEGI NK
2045.095	IVTGVLLISLSEQELIDCGR
1822.883	NVGGAGTCGIATMPSZPVK
1731.707	NSWDTTWGEEGYMR
1114.512	DGPVGVDDGQR
1035.526	LPSYVDWR
859.4883	SAGAVVDIK
619.3158	TQNTR
401.2871	ILR
340.1503	YSA

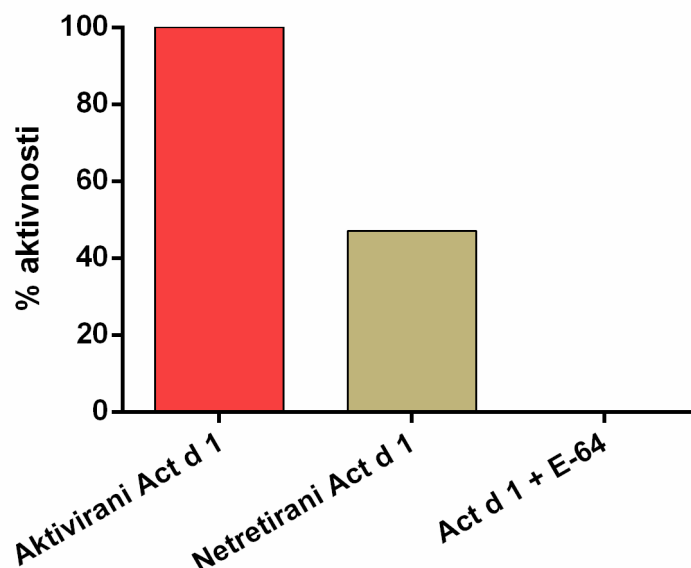
Peptidi masa 619.3158, 1035.526, 1731.707, 1822.882 i 2045.094 Da imaju iste sekvence kao i A5HII1. Međutim, MS/MS spektar peptida molekulske mase 3784.831 Da odgovara aminokiselinskoj sekvenci EYSSGIFTGQECAVDHAVT IVGYGTEGGIDYWIVK (**slika 23**). Ova sekvenca se razlikuje od peptidne sekvence (molekulske mase 3784.831 Da) iz A5HII1 (HYSSGIFTGPCGTAIDHAVT IVGYGTEGGIDYWIVK), bez obzira na istu molekulsku masu. Ovi rezultati pokazuju da je identifikovana prirodna izoforma aktinidina.



Slika 23. MS/MS spektar peptida molekulske mase 3784.831 Da. Identifikovane serije Y-jona odgovaraju sledećoj aminokiselinskoj sekvenci: YSSGIFTGQECAVDHAVTIVGYGTEGGIDYWIVK.

4.2.2. Proteolitička aktivnost preparata aktinidina

Proteolitička aktivnost je određena u preparatu aktinidina nakon liofilizacije upotrebom kazeinolitičkog testa. Jedna jedinica proteolitičke aktivnosti (U) je definisana kao količina enzima koja daje 0,1 jedinicu A_{280} po minutu (185). Aktinidin je aktiviran inkubacijom u fosfatnom puferu sa optimalnom vrednošću za aktivnost aktinidina pH 6.5 koji sadrži 2 mM L-cisteina. Inaktivacija je omogućena inkubacijom preparata aktinidina sa inhibitorom cistein proteaza E-64 u molekulskom odnosu 1:1. Netretiran uzorak aktinidina je pokazao oko 50 % kazeinolitičke aktivnosti u poređenju sa aktiviranim aktinidinom (100 %). Aktinidin inaktiviran inhibitorom cistein-proteaza je pokazao približno 0.02 % kazeinolitičke aktivnosti (**slika 24**).



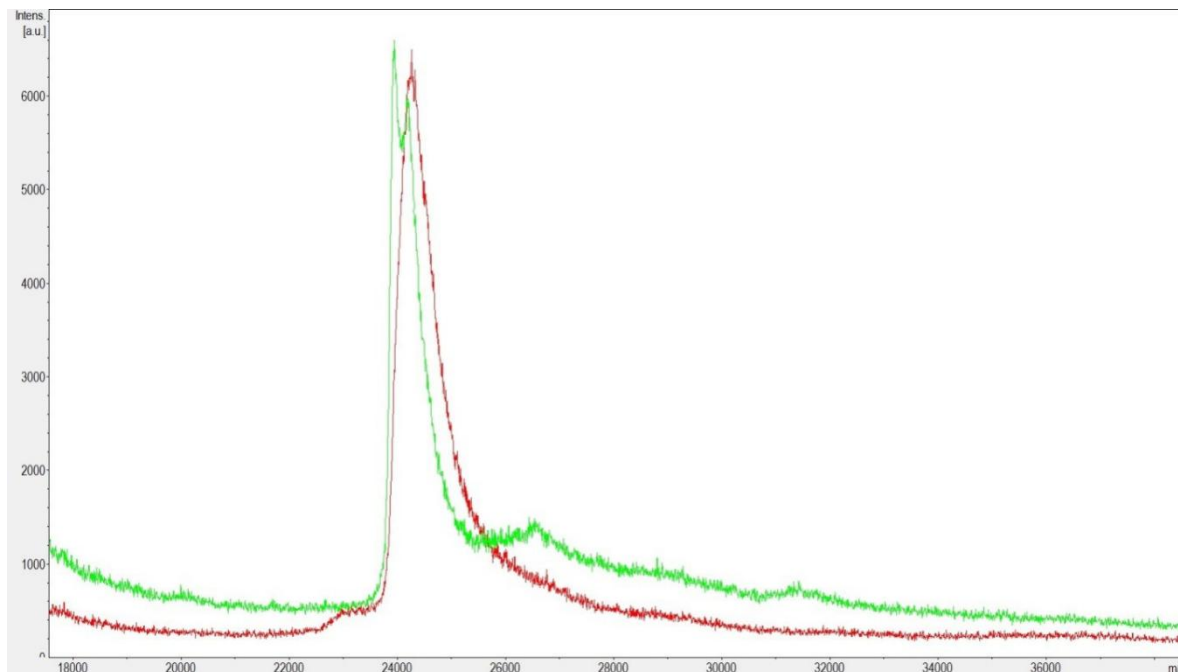
Slika 24. Kazeinolitička aktivnost preparata aktinidina. Rezultati su prikazani kao % relativne kazeinolitičke aktivnosti u odnosu na aktivirani aktinidin (100 %).

4.3. Optimizacija uslova aktivacije aktinidina

Aktinidin se, u plodu kivija, nalazi u aktivnoj i inaktivnoj formi (15). Standardni protokoli za aktivaciju podrazumevaju proces inkubacije preparata aktinidina sa rastvorom L-cisteina (186). U ovoj disertaciji su ispitivani uslovi aktivacije aktinidina pri kojima je, između ostalog, testirano da li, i u kojoj meri L-cistein prisutan u medijumu za uzgajanje ćelijskih kultura dovodi do aktivacije aktinidina.

4.3.1. Aktivacija aktinidina inkubacijom sa ditioneitolom (DTT)

Liofilizovani preparat aktinidina je rastvoren u 20 mM fosfatnom puferu pH 6.6 u koji je dodat 2 mM ditioneitol (DTT) i 2 mM etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA). Preparat aktinidina je inkubiran 1 h na 37 °C. MALDI/TOF spektar u linearnom modu (DHAP matriks) preparata aktinidina je prikazan na **slici 25**.



Slika 25. MALDI-TOF maseni spektar aktinidina. Profil neaktiviranog aktinidina je prikazan crvenom bojom, dok je profil aktiviranog aktinidina prikazan zelenom bojom.

MS spektar aktinidina pokazao je prisustvo dva pika sa razlikom masa od oko 325 Da. Rezultati ukazuju na to da inkubacija aktinidina u fosfatnom puferu pH 6.6 koji sadrži 2 mM DTT i 2 mM EDTA tokom 60 minuta na 37°C nije potpuna. Međutim, prilikom eksperimenata koji podrazumevaju korišćenje humanih ćelijskih linija, upotreba agensa kao što je DTT može imati toksičan efekat po ćelije. Shodno tome, potrebno je održati uslove što približnije fiziološkim, u kojima se ćelije inače nalaze. Iz tog razloga je urađena optimizacija aktivacije aktinidina inkubacijom u medijumima koji se koriste za uzgajanje ćelija, u trajanju od 60 minuta na 37 °C.

4.3.2. Aktivacija aktinidina inkubacijom u medijumu za uzgajanje ćelija

Medijumi za uzgajanje ćelija sadrže sve neophodne hranljive materije koji obezbeđuju diferencijaciju, polarizaciju i funkciju koju imaju u gastrointestinalnom traktu. Standardni protokol za aktivaciju aktinidina podrazumeva inkubaciju enzima u rastvoru cisteina u toku 60 minuta. Kako

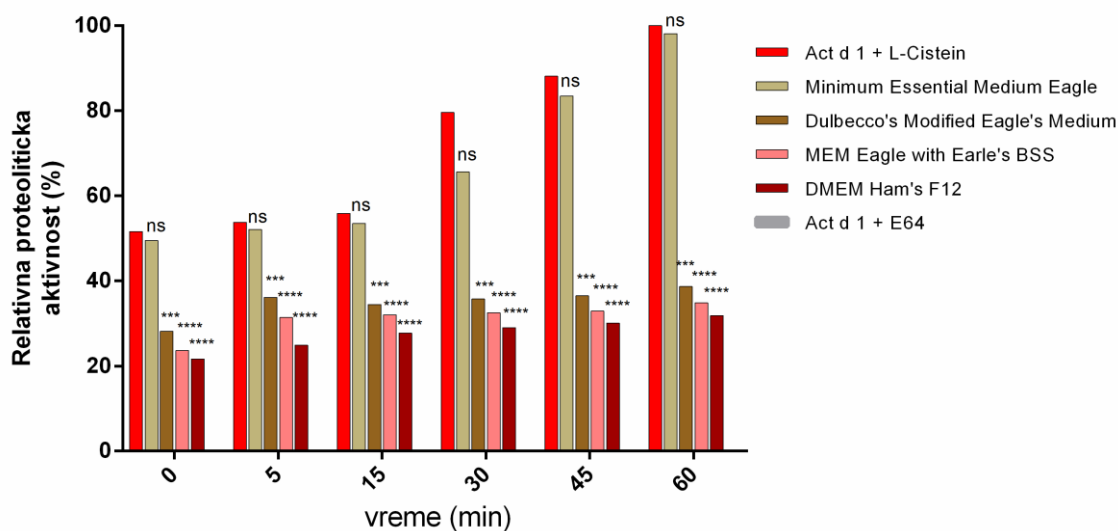
bismo izbegli dodavanje cisteina tokom aktivacije, cilj je bio ispitati da li je inkubacija aktinidina u medijumu za uzgajanje ćelija dovoljna da dovede do njegove aktivacije. Odnosno, da li je količina cisteina koja se nalazi u medijumu dovoljna za njegovu aktivaciju.

Za ispitivanje aktivacije aktinidina korišćena su 4 medijuma za uzgajanje ćelijskih linija, od različitih proizvođača: Minimum Essential Medium (MEM, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, USA); Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, USA); MEM Eagle with Earle's BSS (*Lonza*, Basel, CH); DMEM Ham's F12 (*Gibco*, Invitrogen, Paisley, UK). Količine L-cisteina u svakom medijumu prikazane su u **tabeli 5**.

Tabela 7. Količina L-cisteina u medijumima za uzgajanje ćelija

Medijum	L-Cistein (mM)
Minimum Essential Medium (MEM, <i>Sigma-Aldrich</i> , St. Louis, USA);	0.84
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, <i>Sigma-Aldrich</i> , St. Louis, USA);	0.69
DMEM Ham's F12 (<i>Gibco</i> , Invitrogen, Paisley, UK)	0.26
MEM Eagle with Earle's BSS (<i>Lonza</i> , Basel, CH)	0.15

Preparat aktinidina je rastvoren u svakom od navedenih medijuma i, nakon inkubacije od 60 minuta, određivana je enzimska aktivnost pomoću kazeinolitičkog eseja. Kao pozitivna kontrola korišćen je preparat aktinidina aktiviran u prisustvu L-cisteina. Inhibirani aktinidin je pripremljen inkubacijom sa inhibitorom cistein proteaza (E-64) u molekulskom odnosu 1:1. Relativna proteolitička aktivnost je određivana u različitim vremenskim tačkama tokom inkubacije od 60 minuta (**slika 26**).



Slika 26. Aktivacija aktinidina u različitim medijumima za uzgajanje humanih intestinalnih ćelija. Rezultati su prikazani kao procenat relativne proteolitičke aktivnosti (srednja vrednost \pm SD) uzoraka aktinidina inkubiranih u hranljivom medijumu u poređenju sa aktinidinom inkubiranim sa L-cisteinom. ns, nije statistički značajno; *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$ u poređenju sa L-cisteinom-aktiviranim Act d 1.

Rezultati pokazuju da aktivacija aktinidina u *Minimum Essential Medium* nakon 60 minuta pokazuje 98 % proteolitičke aktivnosti, u poređenju sa L-cisteinom aktiviranim aktinidinom (100 %). Takođe, netretirani aktinidin pokazao je oko 50 % proteolitičke aktivnosti. Kod inaktiviranog aktinidina nije detektovana aktivnost tokom ispitivanog vremenskog intervala, ili je bila ispod 0.02 %. Inkubacija aktinidina u ostalim testiranim medijumima je pokazala umerenu proteolitičku aktivnost nakon inkubacije od 60 minuta (**tabela 8**).

Tabela 8. Aktivnost aktinidina nakon 60 minuta inkubacije u različitim medijumima za uzgajanje ćelija

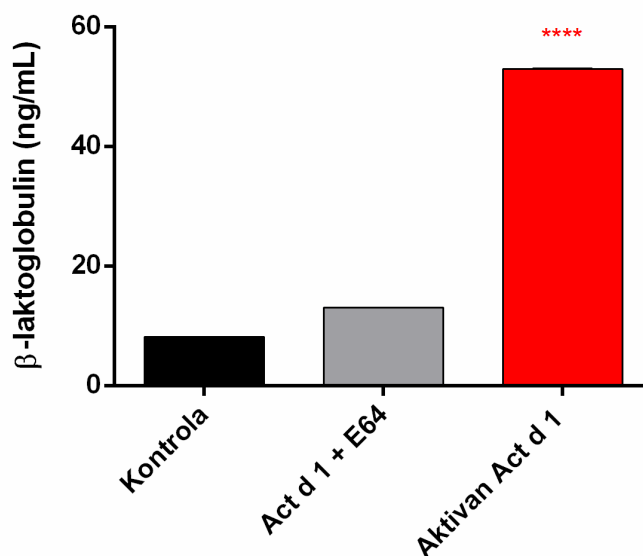
Medijum	Aktivnost aktinidina (%)
Minimum Essential Medium (MEM, <i>Sigma-Aldrich</i> , St. Louis, USA);	98
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, <i>Sigma-Aldrich</i> , St. Louis, USA);	38.71
DMEM Ham's F12 (<i>Gibco</i> , Invitrogen, Paisley, UK)	31.87
MEM Eagle with Earle's BSS (<i>Lonza</i> , Basel, CH)	38.44

4.4. Uticaj aktinidina na popustljivost gastrointestinalne barijere

Ispitivanje efekta aktinidina na propustljivost epitelnog sloja urađena je u *in vivo* i *in vitro* uslovima. Za ove eksperimente korišćeni su C57BL/6 soj miševa i intestinalne epitelne ćelije- Caco-2. Efekat proteolitičke aktivnosti aktinidina na intestinalni trakt miševa praćen je detekcijom β -laktoglobulina (BLG) u serumu, nakon oralne administracije aktinidina. Narušavanje intestinalne barijere u *in vitro* model sistemu praćeno je merenjem TEER epitelnog monosloja i detekcijom BLG u bazolateralnom delu inserata na kojima su ćelije uzgajane.

4.4.1. Aktinidin dovodi do povećane intestinalne permeabilnosti *in vivo*

Prilikom ispitivanja efekta aktinidina na gastrointestinalni trakt miševa, životinje su oralnom administracijom primile aktivirani ili inaktivirani aktinidin. Kontrolna grupa životinja je primila rastvor PBS-a. Dvadeset četiri časa nakon oralne administracije aktinidina, životinjama je oralno dat β -laktoglobulin (BLG), protein molekulske mase od oko 14 kDa. Pola sata nakon ingestije, uzeti su uzorci seruma u kojima je ispitivana koncentracija BLG pomoću ELISA testa. Rezultati su pokazali da je statistički značajna količina BLG detektovana u serumu životinja kojima je oralno administrovan aktivirani aktinidin (**slika 27**).



Slika 27. Aktivirani aktinidin povećava propustljivost intestinalnih epitelnih ćelija C57BL/6 miševa. 24 h nakon oralne administracije preparata aktiviranog i inaktiviranog aktinidina (0.35 mL, 5 mg/mL) miševima je oralno administrovan BLG (500 mg/kg telesne težine). Vrednosti su prikazane kao standardna devijacija \pm SD; n=6 životinja/grupi. **** $P \leq 0.0001$ u poređenju sa kontrolnom grupom (PBS)

U serumima grupe životinja koja je primila inhibiran enzim, nije detektovana značajna količina BLG. Rezultati potvrđuju da povećana propustljivost intestinalnog trakta potiče od proteolitičke aktivnosti aktinidina.

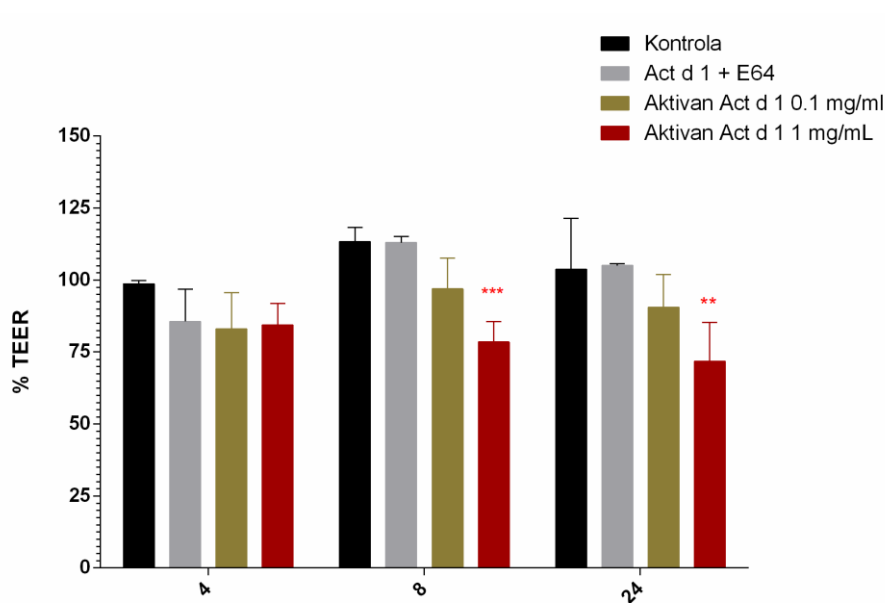
4.4.2. Aktinidin povećava propustljivost epitelnog monosloja *in vitro*

Transepitelni električni otpor (TEER) je široko prihvaćena tehnika koja omogućava merenje dinamike integriteta čvrstih veza u intestinalnim epitelnim ćelijskim modelima pri formiranju monosloja. Smanjenje vrednosti za TEER je znak narušavanja integriteta epitelne barijere.

U cilju ispitivanja efekta aktinidina na integritet epitelne barijere, Caco-2 ćelije su uzgajane na poroznim polikarbonatnim insertima koji omogućavaju

fizičko razdvajanje apikalnog i bazolateralnog prostora ćelijskog monosloja a time se omogućava i ispitivanje propustljivosti ćelijskog monosloja.

Proteolitički aktivna forma aktinidina utiče na propustljivost Caco-2 monosloja i dovodi do smanjenja TEER. Kontrolni monosloj Caco-2 ćelija zadržava vrednosti za TEER koji odgovara bazalnoj vrednosti tokom 4 h inkubacije (**slika 28**).

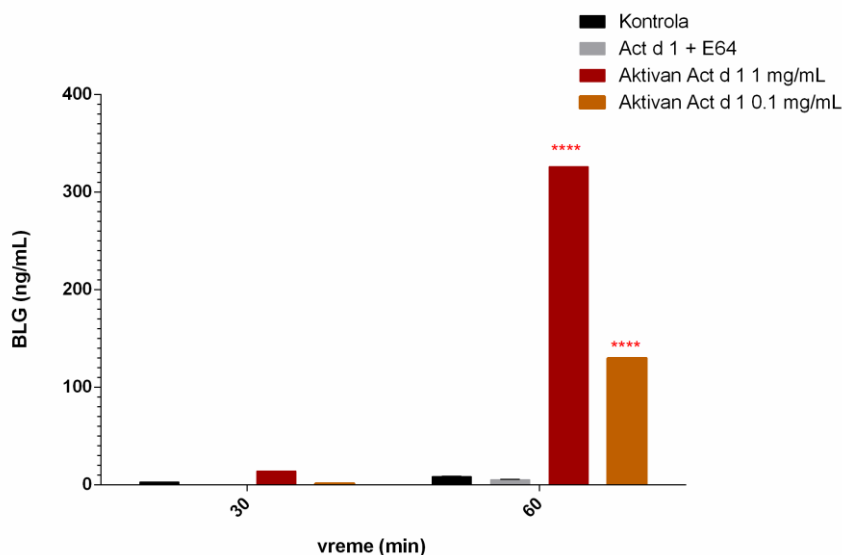


Slika 28. Relativan transepitelni električni otpor Caco-2 monosloja nakon 4, 8 i 24 h tretmana aktinidinom. Vrednosti su prikazane kao % TEER u odnosu na TEER intaktnog monosloja (100 %). * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$ u poređenju sa kontrolom.

Sa druge strane, ćelije tretirane aktiviranim aktinidinom (1 mg/mL) pokazuju smanjenje u transepitelnom otporu na 84 % nakon 4 h inkubacije. Ovaj efekat se značajno povećava sa porastom vremena inkubacije pa nakon 8 h i 24 h tretmana, TEER vrednosti se smanjuju na 71 % (** $P \leq 0.01$) i 65 % (*** $P \leq 0.001$) u poređenju sa kontrolom. Aktinidin tretiran inhibitorom cistein proteaza E-64 ne dovodi do značajnih promena u propustljivosti monosloja epitelnih ćelija. Rezultati ukazuju na činjenicu da efekat povećanja epitelne propustljivosti zavisi od proteazne aktivnosti aktinidina. Niže koncentracije aktinidina (0.1 mg/mL) takođe dovode do povećanja epitelne propustljivosti i smanjenja TEER vrednosti

nakon 24 h inkubacije (78 % TEER u poređenju sa kontrolnim monoslojem, $*P \leq 0.05$).

Integritet epitelnog monosloja je ispitivan i prolaskom β -laktoglobulina, glavnog proteina kravljeg mleka. BLG (5 μ L, 20 mg/mL) je apikalno dodat u bunare sa Caco-2 ćelijama 23 h nakon trajanja tretmana aktinidinom. Zatim su, u različitim vremenskim intervalima uzimani alikvoti (30 i 60 minuta) iz bazolateralnog dela u cilju kvantifikacije BLG pomoću ELISA testa. Nakon 30 min koncentracija BLG u bazolateralnom delu je bila relativno niska ali, nakon 1 h, se značajno povećala (**slika 29**).



Slika 29. Prolaz BLG kroz monosloj Caco-2 ćelija tokom tretmana aktinidinom. Vrednosti su prikazane kao koncentracija BLG u bazolateralnom medijumu izmerena nakon 30 i 60 minuta.

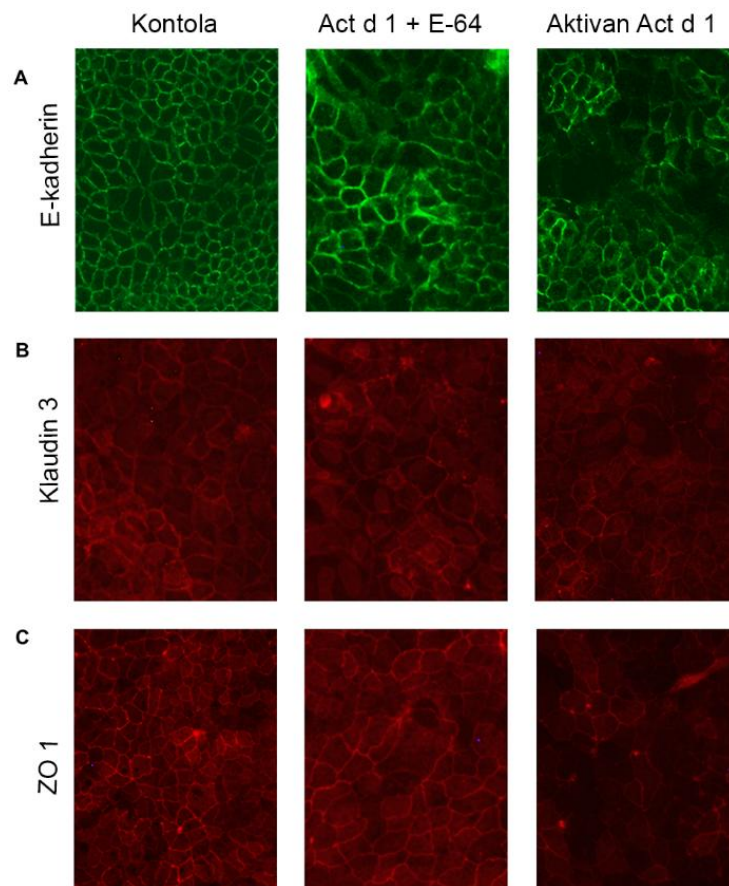
Monosloj tretiran inhibiranim aktinidinom nije pokazao značajne koncentracije BLG u bazolateralnom delu monosloja.

4.5. Uticaj aktinidina na proteine čvrstih veza *in vitro* i *in vivo*

Propustljivost epitelnih ćelija gastrointestinalnog trakta regulisana je, između ostalog, i ekspresijom proteina čvrstih veza. Poremećaj u obrascu ekspresije ili same strukture tih proteina dovodi do nastanka različitih patoloških

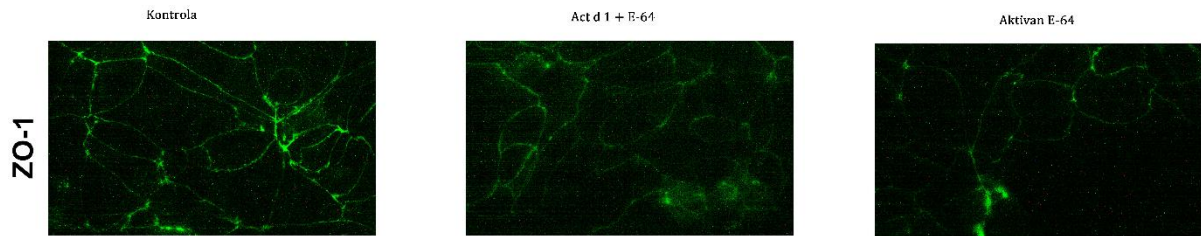
stanja. Shodno tome, bilo je potrebno ispitati uticaj aktinidina i njegove proteolitičke aktivnosti na strukturu i ekspresiju iRNK za proteine čvrstih veza u cilju razumevanja molekulskih mehanizama senzitivacije na ovaj alergen.

Efekti protezane aktivnosti aktinidina na proteine čvrstih veza su analizirani *in situ* korišćenjem 2D intestinalnih organoida i Caco-2 ćelija. Ispitivan efekat na kladin-3, E-kadherin i ZO 1 je detektovan pomoću fluorescentnog mikroskopa. Kontrolni uzorci su pokazali membransku lokalizaciju ovih proteina koji se pojavljuju kao kontinualni prstenovi koji okružuju susedne ćelije (**slika 30A, B, C**).



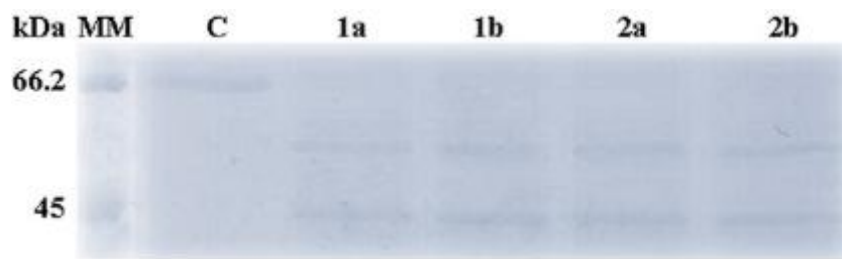
Slika 30. Imunofluorescentno bojenje mišjih intestinalnih 2D organoida. Organoidi su tretirani aktivnim ili inhibiranim aktinidinom 24 h i detekcija je postignuta bojenjem specifičnim antitelima za E-kadherin (A), kladin 3 (B) i ZO 1 (C).

2D organoidi koji su bili izloženi aktivnom aktinidinu pokazuju narušenu strukturu proteina čvrstih veza koja se uočava kao isprekidane i nedefinisane linije oko ćelija. Za sva tri analizirana proteina je dobijen sličan obrazac koji se kod inaktiviranog aktinidina ne pojavljuje. Ovim je još jednom dokazano da aktinidin proteolitički raskida proteine čvrstih veza. Sličan obrazac je uočen za ZO 1 protein nakon tretmana Caco-2 ćelija aktivnim aktinidinom (**slika 31**).



Slika 31. Imunofluorescentno bojenje Caco-2 ćelija antitelima specifičnim za ZO 1

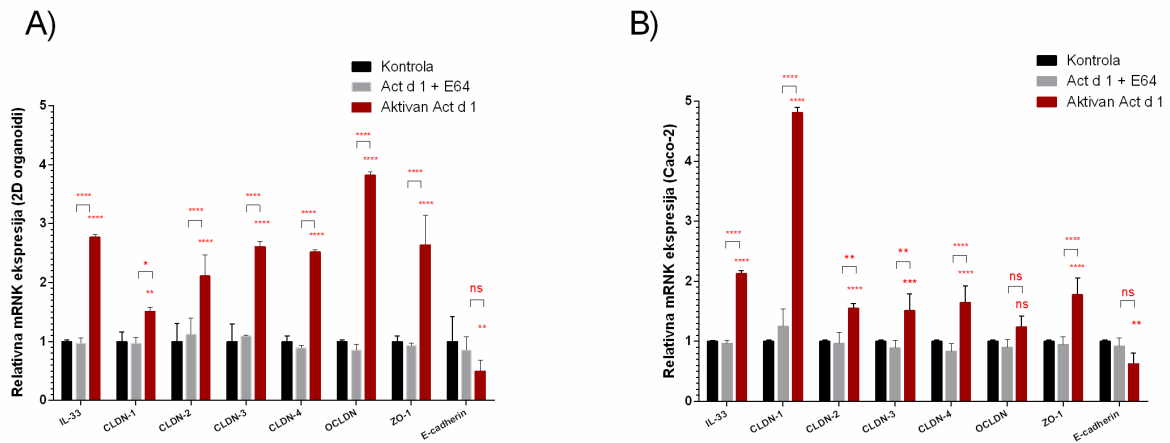
U cilju utvrđivanja efekta aktinidina na protein okludin, Caco-2 ćelije su tretirane aktiviranim aktinidinom. Po završetku tretmana, ćelije su lizirane i dobijeni lizati su analizirani specifičnim antitelima za humani okludin. Rezultati su pokazali da aktivna forma aktinidina proteolitički razgrađuje okludin, što je detektovano imunoblotom kao dve trake koje odgovaraju molekulskim masama od oko 45 kDa i 53 kDa. U ćelijama koje nisu tretirane aktinidinom se okludin detektuje kao proteinska traka molekulske mase od oko 66 kDa. Primećeno je da se intenzitet ove trake znatno smanjuje u tretiranim ćelijama (**slika 32**).



Slika 32. Efekat aktinidina na protein okludin u Caco-2 ćelijama. Detekcija je urađena imunoblotom. Ćelije tretirane aktiviranim aktinidinom 0.1 mg/mL 1a) 1 h 1b) 4 h; ćelije tretirane aktiviranim aktinidinom 1 mg/mL 2a) 1 h 2b) 4 h; C) kontrolni monosloj ćelija.

Potencijal aktinidina da učestvuje u modulaciji urođenog imunog odgovora aktiviranjem eptelnih ćelija je ispitivan i upoređivan korišćenjem dva model sistema. Caco-2 ćelije se uveliko koriste za ispitivanje različitih mehanizama alergije na hranu. Takođe, u ovu svrhu se dosta koriste i životinjski modeli. Međutim, usled brojnih ograničenja i etičkih razloga, teži se ka tome da se upotreba životinjskih modela u istraživačke svrhe smanji. Pa se, tako, iznalaze novi modeli kao što je uzgajanje organoida (2D ili 3D). U ovom radu su korišćeni mišji organoidi dobijeni iz matične ćelije intestinalnog trakta miša. Ćelije su uzgajane do formiranja dobro definisanog monosloja. Cilj je bio da se ispita i upoređi aktivacioni potencijal aktinidina u intestinalnim 2D organoidima i Caco-2 ćelijama i da li utiče na ekspresiju iRNK proteina čvrstih veza.

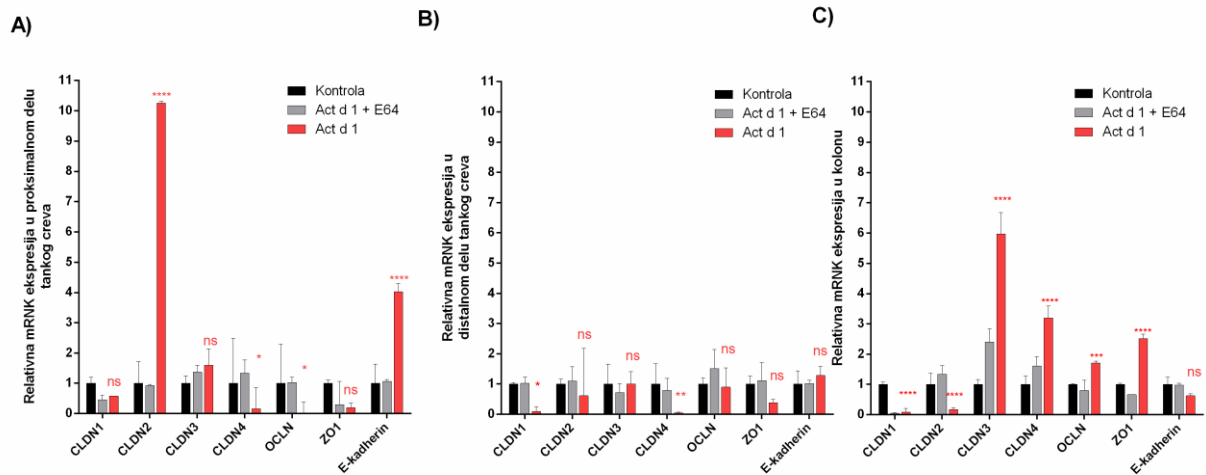
Ćelije su inkubirane 6 h u medijumu koji je sadržao aktivirani ili inaktivirani aktinidin. Kao kontrola su korišćene ćelije inkubirane u medijumu. Nakon toga je izolovana ukupna RNK i relativna genska ekspresija je analizirana RT-PCR-om, odnosno denzitometrijskom analizom dobijenih PCR proizvoda na agaroznom gelu. Efekat aktinidina na ekspresiju IL-33 i proteina čvrstih veza prikazan je na **slici 33**.



Slika 33. Efekat aktinidina na ekspresiju iRNK IL-33 i proteina čvrstih veza u A) intestinalnim 2D organoidima i B) Caco-2 ćelijama. ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.0001$ u poređenju sa kontrolom.

Efekat aktinidina na ekspresiju iRNK IL-33 i proteina čvrstih veza je sličnog profila u oba korišćena model sistema. Ekspresija iRNK je povećana za sve analizirane gene osim za E-kadherin, gde se zapaža snižena ekspresija iRNK.

Jedan od ciljeva ove disertacije bio je i da se ispita efekat aktinidina i njegove proteolitičke aktivnosti *in vivo*. U cilju utvrđivanja efekta Act d 1 na ekspresiju iRNK proteina čvrstih veza, miševima su oralno administrirani aktivirani i inaktivirani enzim, kao i PBS koji je predstavljao kontrolu. Analiziran je efekat aktinidina na ekspresiju iRNK sledećih gena: kladin 1 (CLDN1), kladin 2 (CLDN2), kladin 3 (CLDN3), kladin 4 (CLDN4), okludin (OCLN), zonula *occludens* 1 (ZO1) i E-kadherin u različitim delovima tankog (proksimalnom i distalnom) i debelog creva (kolon). Ekspresija iRNK CLDN2 i E-kadherina je bila povećana u proksimalnom delu tankog creva dok je ekspresija iRNK CLDN4 i OCLN bila snižena (**slika 34A**). U distalnom delu tankog creva je ekspresija iRNK CLDN1 i OCLN bila snižena (**slika 34B**).



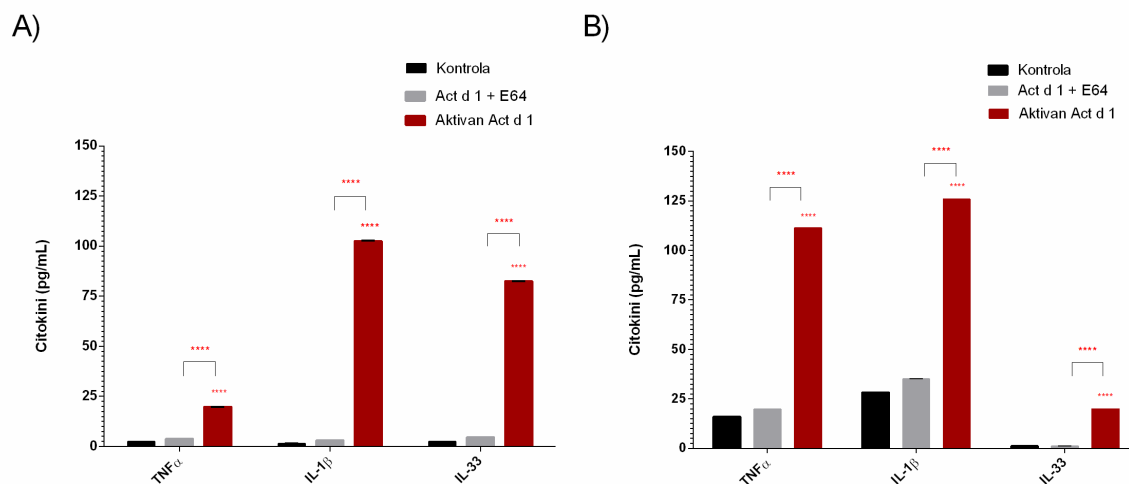
Slika 34. Efekat aktinidina na ekspresiju iRNK proteina čvrstih veza u različitim delovima tankog i debelog creva: proksimalni (A), distalni (B) i kolon (C). Miševima je oralno dat PBS (kontrola), E-64-inhibirani aktinidin i aktivirani aktinidin. Nakon 24 h od oralne administracije, izolovana je RNK iz intestinalnog tkiva i ekspresija je analizirana pomoću kvantitativnog PCR-a (qRT-PCR). Rezultati su prikazani kao standardna devijacija \pm SD relativne ekspresije iRNK; $n=5$ životinja/grupi. $*P \leq 0.05$; $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$, $****P \leq 0.0001$, u poređenju sa kontrolom.

Nivo ekspresije iRNK proteina čvrstih veza u kolonu je bio smanjen za CLDN2, dok je u slučaju CLDN3, CLDN4, OCLN i ZO1 bio povećan (**slika 34C**). Rezultati pokazuju da Act d 1 značajno i selektivno utiče na ekspresiju iRNK proteina čvrstih veza u različitim delovima intestinalnog trakta.

4.6. Uticaj aktinidina na gensku ekspresiju i sekreciju citokina *in vitro*

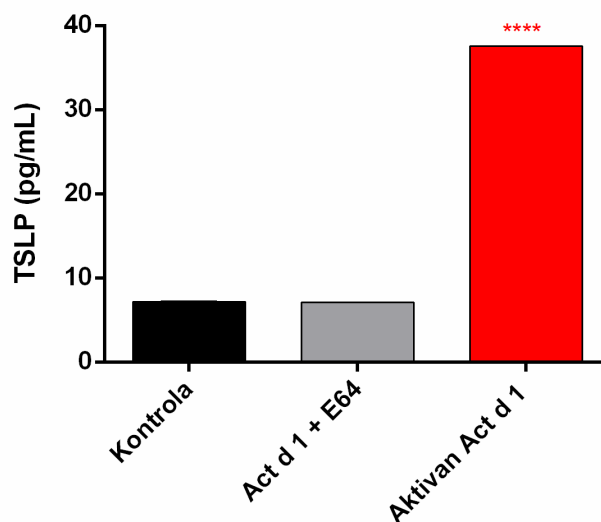
U cilju daljeg ispitivanja efekata protezane aktivnosti aktinidina i u svetlu mogućeg razumevanja mehanizma senzitivacije na ovaj alergen, analiziran je njegov efekat na aktivaciju epitelnih ćelija u smislu proizvodnje specifičnih proalergenih i proinflamatornih citokina. Biološki aktivni medijatori koje epitelne ćelije sekretuju prilikom iniciranja specifičnog Th2 imunog odgovora su tzv. proalergeni citokini: IL-33, IL-25 i TSLP.

Rezultati su pokazali da interakcija proteolitički aktivnog aktinidina sa epitelnim ćelijama rezultira njihovom aktivacijom i proizvodnjom specifičnih proinflamatornih i proalergenih epitelnih citokina. Tretman 2D organoida aktiviranim aktinidinom izaziva sekreciju TNF α , IL-1 β i IL-33, dok se u Caco-2 ćelijama zapaža sličan efekat. U slučaju inaktiviranog aktinidina nije zapažen značajan efekat u proizvodnji ovih citokina (**slika 35**).



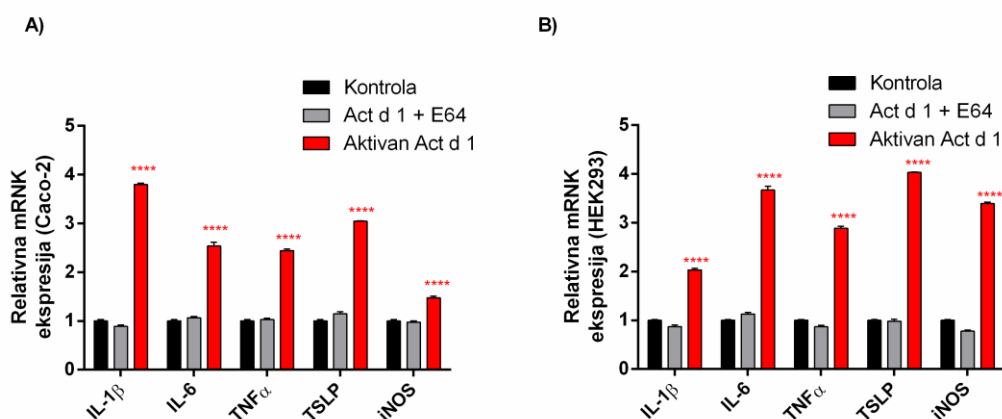
Slika 35. Aktinidin izaziva oslobađanje citokina iz A) mišjih intestinalnih 2D organoida i B) Caco-2 ćelija. Ćelije su tretirane aktivnim ili inhibiranim aktinidinom 6 h. U supernatantima je ELISA testom određivana koncentracija citokina. **** $P \leq 0.0001$ u poređenju sa kontrolom.

Takođe, Caco-2 ćelije sekretuju TSLP u medijum kao odgovor na tretman aktinidinom (**slika 36**).



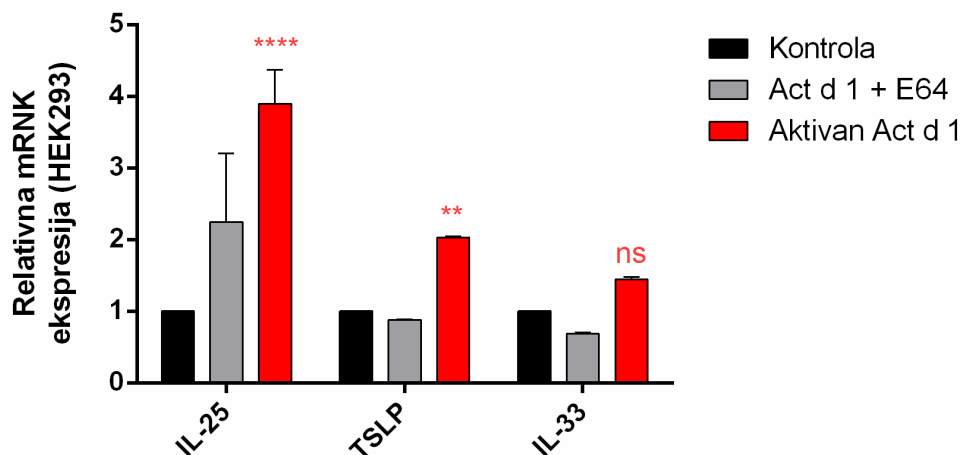
Slika 36. Efekat aktinidina na proizvodnju proalergenog citokina urođene imunosti. **** $P \leq 0.0001$.

Kako bi se detaljnije ispitaio uticaj aktinidina u ranoj fazi imunog odgovora, ispitivane su posledice njegove interakcije sa humanim epitelnim ćelijama (Caco-2 i HEK293) na nivo ekspresije iRNK proalergenih i proinflamatornih epitelnih citokina (**slika 37**).



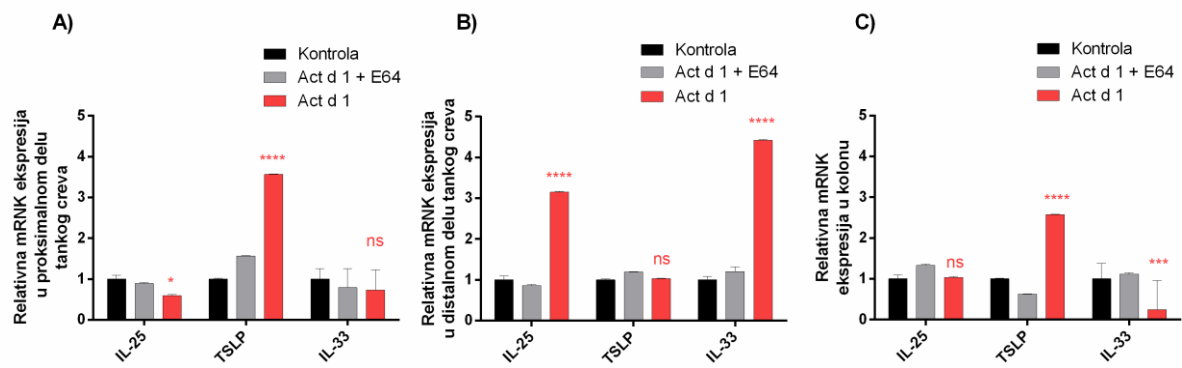
Slika 37. Aktinidin povećava ekspresiju iRNK za citokine urođene imunosti i iNOS u Caco-2 (A) i HEK293 (B) ćelijama. **** $P \leq 0.0001$ u poređenju sa kontrolom.

Rezultati su pokazali da aktinidin izaziva povećanu ekspresiju iRNK za IL1- β , TNF α , IL-6, TSLP i iNOS u oba korišćena model sistema. Takođe, ispitan je isti efekat u drugom *in vitro* model sistemu- HEK293 ćelijama. Dobijeni su slični rezultati, tj. povećanje ekspresije iRNK proinflamatornih citokina.



Slika 38. Efekat aktinidina na ekspresiju iRNK za proalergene citokine urođene imunosti. ** $P \leq 0.01$, **** $P \leq 0.0001$ u poređenju sa kontrolom.

U cilju ispitivanja sposobnosti aktinidina da izazove rani inflamatorni odgovor, ispitan je nivo ekspresije iRNK proalergeničkih epitelnih citokina: IL-33, IL-25 i TSLP u različitim delovima intestinalnog trakta miševa (**slika 39**). Pokazano je da je nivo ekspresije iRNK značajno povećan u proksimalnom delu tankog creva (**slika 39A**), dok je sličan obrazac zapažen u slučaju IL-25 i IL-33 ali u distalnom delu tankog creva (**slika 39B**).

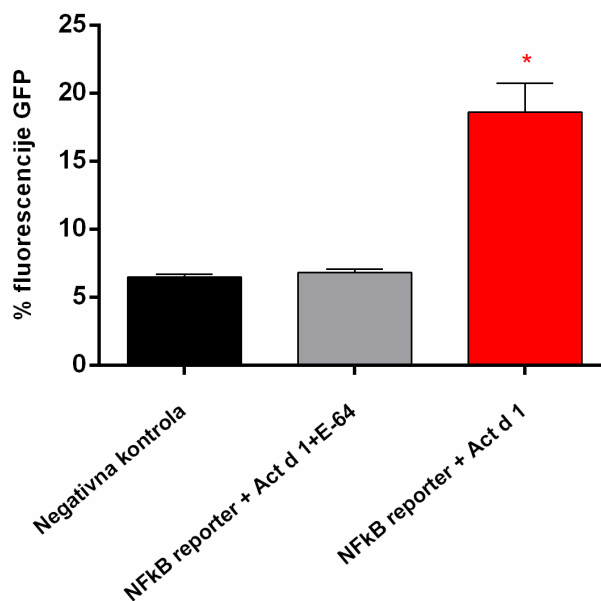


Slika 39. Efekat aktinidina na ekspresiju mRNA proalergenih citokina u različitim delovima tankog i debelog creva: A) proksimalni, B) distalni i C) kolonu. Miševima je oralno dat PBS (kontrola), E-64-inhibirani aktinidin i aktivirani aktinidin. Nakon 24 h od oralne administracije, izolovana je ukupna RNA iz intestinalnog tkiva i ekspresija proalergenih citokina je analizirana pomoću kvantitativnog PCR-a (qRT-PCR). Rezultati su prikazani kao standardna devijacija \pm SD relativne ekspresije mRNA; $n=5$ životinja/grupi. ns- nije statistički značajno; *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$, u poređenju sa kontrolom.

Ekspresija TSLP je u kolonu bila povišena, za razliku od IL-33, gde je zapaženo smanjenje nivoa ekspresije mRNA (slika 39C).

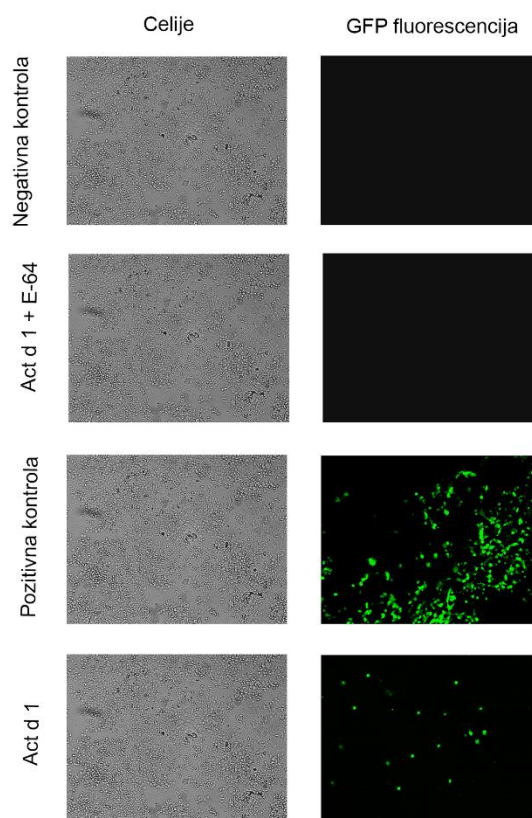
4.7. Aktinidin aktivira NF- κ B signalni put *in vitro*

Rasvetljavanje mehanizma senzitivacije kod alergije na hranu koja sadrži proteolitičke enzime moglo bi da unapredi pristupe u terapijskom tretmanu. Korišćenjem HEK293 ćelija u ovom radu je pokazano da proteolitički aktivan aktinidin može da aktivira NF- κ B signalni put. Aktivacija ovog signalnog puta je pokazana detekcijom fluorescencije koja potiče od zelenog fluorescentnog proteina (GFP) uz pomoć protočne citometrije i fluorescentne mikroskopije. Najpre su HEK293 ćelije transfektovane plazmidom koji nosi gen za NF- κ B-GFP. Nakon uspešne transfekcije, ćelije su tretirane aktiviranim i inhibiranim aktinidinom. Rezultati su pokazali da je proteolitički aktivna forma aktinidina izazvala aktivaciju NF- κ B, dok je inhibirani aktinidin dao sličan odgovor kao i negativna kontrola korišćena u ovom eksperimentu.



Slika 40. Detekcija fluorescencije koja potiče od GFP, kao posledica aktivacije NF- κ B signalnog puta u HEK293 ćelijama nakon tretmana aktiviranim aktinidinom. * $P \leq 0.05$ u poređenju sa kontrolom.

Aktivacija NF- κ B je detektovana i pomoću fluorescentnog mikroskopa. Caco-2 ćelije su uzgajane na staklima prečnika 100 mm. Nakon transfekcije, ćelije su tretirane na isti način i aktivacija NF- κ B je zabeležena praćenjem GFP fluorescencije na mikroskopu (**slika 41**).

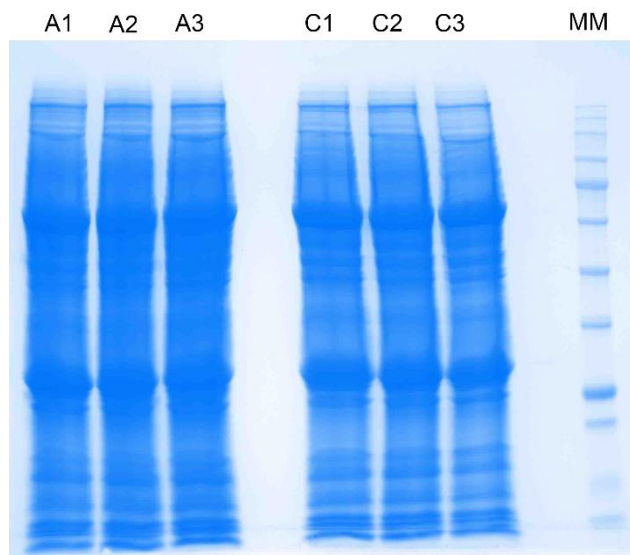


Slika 41. Vizualizacija aktivacije NF- κ B signalnog puta u HEK293 ćelijama kao posledica enzimske aktivnosti aktinidina. Fluorescencija koja potiče od GFP je detektovana fluorescentnim mikroskopom.

4.8. Identifikacija fizioloških supstrata aktinidina *in vitro*

U cilju razumevanja protezne specifičnosti aktinidina i identifikacije fizioloških supstrata na intestinalnim epitelnim ćelijama, ispitan je efekat protezane aktivnosti Act d 1 na Caco-2 ćelije primenom masene spektrometrije. Cilj je bio da se ispita koji su fiziološki supstrati podložni proteolitičkom dejstvu aktinidina i da se identifikuju proteini koje ova cistein proteaza može da razgradi.

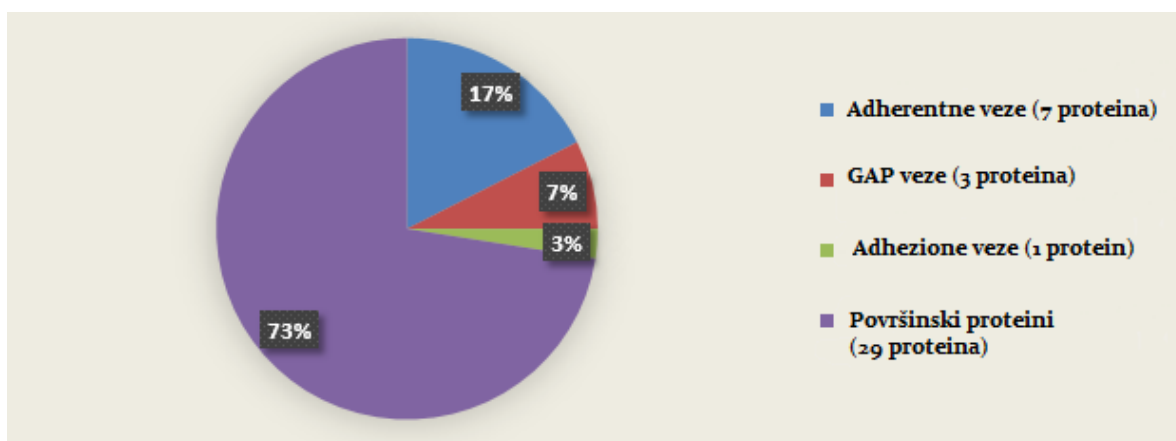
Konfluentan monosloj Caco-2 ćelija je tretiran aktinidinom u vremenskom trajanju od 1 h. Supernatanti su, nakon tretmana, sakupljeni, koncentrovani i sadržaj svake frakcije je analiziran na SDS-PAGE.



Slika 42. SDS-PAGE profil proteina nakon dejstva aktinidina na Caco-2 ćelije: A1-A3) ćelije tretirane aktinidinom, C1-C3) kontrola MM) molekularni marker.

Masenom spektrometrijom je identifikovano ukupno 1442 različita proteina, od toga 866 proteina u bar 4 od 6 analiziranih uzoraka. Od toga 166 proteina pokazuje statistički značajnu razliku između uzoraka tretiranih aktinidinom u poređenju sa kontrolnim ćelijama.

Najmanje 40 proteina je identifikovano kao proizvod proteolize aktinidina a sumiran prikaz identifikovanih proteina (klasifikovanih po međucelijskim vezama je prikazan na **slici 43**.



Slika 43. Fiziološki supstrati aktinidina na Caco-2 ćelijama identifikovani masenom analizom.

5. Diskusija

U ovom radu je ispitivan efekat alergena sa cistein-proteaznom aktivnošću iz ploda zelenog kivija na integritet epitelnih ćelija intestinalnog trakta. Ovaj efekat je praćen na različitim model sistemima, kao što su *in vitro* humane ćelijske linije (Caco-2, HEK293 ćelije), 2D organoidi dobijeni iz mišje pluripotentne matične ćelije i *in vivo* model sistem (C57BL/6 soj miševa).

5.1. Aktivacija aktinidina u medijumu za gajenje ćelija

Standardni protokoli za aktivaciju aktinidina podrazumevaju inkubaciju rastvora proteina sa rastvorom L-cisteina tokom 60 minuta na 37°C. U ovom radu smo ispitivali da li se aktinidin može aktivirati količinom L-cisteina koja je prisutna u medijumu za gajenje ćelija. Aktinidin je inkubiran u različitim medijumima za gajenje humanih ćelijskih linija tokom 60 minuta a nakon toga je ispitivana proteolitička aktivnost preparata pomoću kazeinolitičkog esejja. Rezultati pokazuju da aktinidin inkubiran u *Minimum Essential Medium* pokazuje 98.1 % aktivnosti u poređenju sa aktinidinom koji je aktiviran L-cisteinom i označen je kao preparat sa 100 % aktivnosti. U nultoj tački inkubacije, preparat aktinidina je pokazao oko 50 % proteolitičke aktivnosti, što je u skladu sa literaturnim podacima da su u ekstraktu kivija prisutne aktivna i neaktivna forma enzima. Ostali ispitivani medijumi su pokazali umerenu aktivaciju aktinidina u praćenom vremenskom intervalu. Razlog za uočene razlike su, verovatno, različite količine L-cisteina prisutne u testiranim medijumima (0,84 mM u *Minimum Essential Medium*; 0.69 mM u *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; 0.26 u *DMEM Ham's F12*; 0.15 u mM *MEM Eagle with Earle's BSS*).

5.2. Aktinidin narušava integritet intestinalne barijere

Epitelne ćelije gastrointestinalnog trakta predstavljaju senzore na signale iz spoljašnje sredine i uključene se u modulaciji urođene i stečene imunosti kroz proizvodnju i sekreciju različitih citokina, hemokina i drugih signala (187). Shodno tome, svaki događaj koji ima za posledicu narušavanje integriteta epitelne barijere predstavlja inicijalan događaj inflamatornog procesa. Narušavanje intestinalne barijere je povezano sa nastankom alergija na hranu

(22). Kada je reč o proteazama iz hrane koje su sposobne da indukuju određene morfološke promene u epitelnoj barijeri, taj efekat je naročito izražen jer izaziva povećanu intestinalnu propustljivost (188,189). Prisustvo različitih signalnih molekula i citokina diktira da li će se proces završiti hroničnom inflamacijom (123).

Aktinidin je glavni alergen kivijski koji može da očuva proteolitičku aktivnost u intestinalnom traktu (129). U ovoj tezi je pokazano da proteolitički aktivan aktinidin narušava integritet epitelne barijere razgradnjom proteina međućelijskih čvrstih veza- okludina, E-kadherina, ZO 1 i kladina 3 (128,129,184).

U cilju rasvetljavanja uloge aktinidina u aktivaciji epitelnih ćelija do kojih dolazi zbog proteolitičke aktivnosti ove cistein proteaze, u eksperimentalnom radu smo koristili dva model sistema. Najpre je bilo potrebno utvrditi uticaj aktinidina u otpočinjanju prve faze alergijske reakcije- senzitivizaciji, koja se bazira na njegovoj enzimskoj aktivnosti. Upotrebom široko rasprostranjenog *in vitro* modela- Caco-2 ćelija, testirali smo sposobnost aktinidina da učestvuje u aktivaciji epitelnih ćelija kao komponente urođene imunosti, a studiju smo proširili i na mišje intestinalne 2D organoide. Time smo otvorili mogućnost novom pristupu u testiranju alergena hrane, jer ovakav model sistem do sada nije bio korišćen u ove svrhe. Rezultati dobijeni testiranjem 2D mišjih organoida su upoređeni sa dobijenim rezultatima iz Caco-2 ćelija i može se zaključiti da u oba model sistema aktinidin izaziva sličan odgovor. Ovi rezultati mogu predstavljati platformu za buduća istraživanja bazirana na alergenima hrane. Postojeća metodologija za uzgajanje organoida nam je omogućila dobijanje 2D modela koji sadrži različite tipove epitelnih ćelija koje su prisutni u intestinalnoj barijeri (intestinalni enterociti, enteroendokrine ćelije i mucin-produkujuće goblet ćelije) (190).

Najpre smo pokazali da aktivna forma aktinidina narušava integritet epitelne barijere kroz smanjenje vrednosti za transepitelni električni otpor (TEER), što je prvi pokazatelj za promene u proteinima međućelijskih čvrstih veza. Ove promene dovode do povećanja paracelularnog transporta molekula

kroz intestinalnu barijeru. Ovaj efekat smo potvrdili detekcijom BLG u bazolateralnom delu inserta na kome su uzgajane ćelije. Pokazano je da ovaj efekat biva izraženiji sa vremenom što je, sa druge strane, u korelaciji sa promenama zapaženim u TEER vrednostima.

Efekat aktivnog aktinidina je pokazan i na mišjem modelu C57BL/6, gde je zapažena povećana propustljivost intestinalnog trakta za BLG kod grupe životinja kojoj je prethodno oralno administriran aktivirani aktinidin.

5.3. Aktinidin utiče na ekspresiju iRNK za proteine čvrstih veza

Međućelijske čvrste veze omogućavaju formiranje stabilne intestinalne barijere kroz stabilizaciju susednih ćelija. Ćelije su međusobno povezane veoma kompleksnom mrežom proteina koji imaju ključnu ulogu u regulaciji intestinalne propustljivosti u različitim segmentima intestinalnog trakta (191,192). Postoje tri tipa transmembranskih proteina koji su zajednički za sve proteine čvrstih veza: kladini, proteini sa MARVEL domenima i transmembranski proteini koji uključuju okludin, tricelulin i MARVELD3 (51). JAM-A, -B i -C su adhezioni molekuli iz imunoglobulinske superfamilije koji se eksprimiraju u različitim tkivima a imaju osnovnu ulogu u razvoju i formiranju epitelne barijere (193). Okludin i kladini formiraju barijeru na apikalno-lateralnoj strani ćelija i, zajedno sa perifernim membranskim proteinima, kao što su ZO 1, obezbeđuju kontakt proteina čvrstih veza sa citoskeletom (194). Kladini su glavni proteini koji učestvuju u formiranju pora za paracelularni transport a, samim tim, su i ključni molekuli koji doprinose propustljivosti i integritetu epitelne barijere (39,195,196). Ekspresija kladina varira duž intestinalnog trakta pa je, tako, imunohistohemijskim bojenjem pokazano da su CLDN 1, 3 i 4 dominantno eksprimirani u kolonu, dok se CLDN 2 dominantno eksprimira u tankom crevu miša (22). Kladin 2 je glavni protein koji učestvuje u formiranju pora za paracelularni transport i pokazano je da je njegova ekspresija povećana u uzorcima biopsije tkiva pacijenata sa kliničkom slikom alergije na hranu (197–199).

Testirali smo sposobnost mišjih intestinalnih 2D organoida za procenu interakcija aktinidina sa epitelnim ćelijama, kao komponentama intestinalne barijere i urođene imunosti, i njihovu aktivaciju. U tom kontekstu smo analizirali efekat aktinidina na proteine međućelijskih čvrstih veza kao i oslobađanje proinflamatornih citokina. ZO proteini su proteini koji učestvuju u održavanju mreže čvrstih veza zahvaljujući svojim interakcijama sa citoskeletom (preko aktina) (38). Generalno gledano, proteini međućelijskih čvrstih veza obezbeđuju polarizaciju intestinalnih epitelih ćelija i učestvuju u regulaciji prolaska vode, jona i nutritijenata kroz samu barijeru. Kompromitovana epitelna barijera dovodi do povećane propustljivosti komponenti hrane i prolasku alergena što dovodi do nastanka alergije na hranu (22). Naši rezultati pokazuju da aktinidin direktno utiče na povećanu ekspresiju iRNK za proteine čvrstih veza (okludin, kladine 1-4 i ZO 1). Prilikom upoređivanja ova dva model sistema treba uzeti u obzir i određene razlike koje postoje između vrsta, mada postoje i zanimljive sličnosti u odgovoru ćelija na aktinidin. Ekspresija iRNK za proteine CLDN1-4, ZO 1 i OCLN se povećava nakon tretmana aktinidinom u oba korišćena model sistema. Povećana ekspresija iRNK može biti efekat kompenzacije usled degradacije proteina čvrstih veza izazvane aktinidinom. Međutim, trebalo bi detaljnije istražiti moguće molekulske mehanizme koji leže u osnovi ovih događaja. Zanimljivo je to što je u oba model sistema pokazana snižena ekspresija iRNK za E-kadherin. Kod pacijenata sa alergijskim rinitisom se zapaža snižena ekspresija E-kadherina (44,200). Aktivna forma aktinidina dovodi do značajnog efekta na sam E-kadherin što dalje može ukazati na povećanu intestinalnu permeabilnost (200–202). Postoje *in vitro* studije koje navode da cistein proteaza iz papaje narušava integritet intestinalne barijere kroz proteolitičku degradaciju proteina čvrstih veza, kao što su ZO 1, kladin 1-4 i okludin, dok E-64 inhibirana forma nema takav efekat (45,203). U slučaju aktinidina je, na osnovu dosadašnjih *in vitro* istraživanja, pokazano da dovodi do proteolitičke degradacije okludina (188). U ovom radu je pokazano da proteolitički aktivna forma aktinidina dovodi do narušavanja intestinalne barijere tako što narušava integritet mreže koju grade proteini čvrstih veza ZO 1, kladin 3 i E-kadherin.

Uticaj aktinidina na ekspresiju iRNK proteina čvrstih veza ispitan je i u *in vivo* model sistemu. Rezultati iz ove disertacije pokazuju da je ekspresija iRNK za kladin 2 u proksimalnom delu tankog creva značajno povećana kod miševa kojima je oralno administriran aktivan aktinidin. Ekspresija kladina 1 je snižena u distalnom delu creva kod pacijenata koji pate od alergija na hranu (192,204). Naši rezultati su u korelaciji sa navedenim i pokazali su da je ekspresija iRNK za kladin 2 snižena u distalnom delu tankog creva i kolonu nakon oralne ingestije aktinidina. Takođe, ekspresija iRNK za okludin, kladin 4 i ZO 1 je značajno snižena u proksimalnom delu tankog creva sa jedne, dok je ekspresija iRNK za kladin 1 i kladin 4 snižena u distalnom delu tankog creva. U kolonu je zapažena drugačija situacija, ekspresija iRNK za kladin 3, 4, okludin i ZO 1 je povećana a za kladin 2 snižena. Ove činjenice se mogu dovesti u vezu sa podacima o ekspresiji kladina duž intestinalnog trakta koja je različita u proksimalnom i distalnom delu, kao i u kolonu (192). Dobijeni rezultati doprinose rasvetljavanju mehanizma senzitivacije na aktinidin i, može se zaključiti da selektivna regulacija ekspresije iRNK proteina čvrstih veza od strane aktinidina verovatno doprinosi povećanoj propustljivosti barijere a, samim tim i razvoju alergije na kivi.

5.4. Aktinidin reguliše ekspresiju iRNK citokina

Alergeni interaguju sa komponentama urođene imunosti, kao što su epitelne ćelije, dovode do razvijanja specifičnog Th2 odgovora i time potkrepljuju tvrdnje da je ova interakcija neophodna za proces senzitivacije (205). Intestinalni sloj epitelnih ćelija je ključan za orkestriran imuni odgovor tokom senzitivacije na alergene. Ovaj odgovor podrazumeva aktivaciju ćelija od strane alergena i njihov odgovor u smislu povećane ekspresije i sekrecije određenih proalergenih i proinflamatornih citokina. U specifične epitelne alarmine spadaju IL-33, IL-25 i TSLP (206,207). Epitelne ćelije respiratornog trakta mogu da prepoznaju alergen preko specifičnih transmembranskih receptora (PAR, TLR ili CLR) i da, putem aktivacije NF- κ B, iniciraju sintezu specifičnih citokina (TSLP, IL-33, IL-25, IL-1 β), hemokinskih liganada (CCL2, CCL20) i tzv. "opasnih signala" (ATP, mokraćna kiselina) (123,205). IL-33 je proalergen citokin koji je deklarisan i kao unutrašnji signal tokom razvijanja specifičnog Th2 imunog odgovora. Aktivna forma aktinidina izaziva povećanje ekspresije iRNK za IL-33 i utiče na njegovo

oslobađanje u medijum u oba ispitivana model sistema. Ovaj efekat nije zapažen u slučaju tretmana ćelija inhibiranom formom aktinidina, što dovodi do zaključka da je ćelijski odgovor zavistan od proteolitičke aktivnosti aktinidina.

U ovom radu smo pokazali da aktinidin diferencijalno utiče na ekspresiju iRNK za IL-33, TSLP i IL-25 u zavisnosti od dela intestinalnog trakta miševa koji se ispituje. Ekspresija iRNK za navedene citokine je bila povišena nakon oralne administracije aktinidina miševima. Uloga proteaza iz hrane u razvoju Th2 specifičnog imunog odgovora je u korelaciji sa povećanom ekspresijom gena za IL-25 i TSLP (208). Tokom izrade ove disertacije, pokazano je i u različitim *in vitro* model sistemima da aktivirani aktinidin dovodi do povećane genske ekspresije IL-25 i TSLP. Takođe, pokazano je da aktinidin dovodi do aktivacije NF- κ B signalnog puta.

5.5. Aktinidin dovodi do sekrecije proinflamatornih i proalergenih citokina

Dodatno, u ovom radu je pokazano da aktinidin dovodi do proizvodnje proinflamatornih citokina (TNF α i IL1- β) u ispitivanim 2D mišjim organoidima i Caco-2 ćelijama. Alergeni hrane, kao što su Ara h 2 iz kikirikija, Pru p 3 iz breskve i Gal d 2 iz jajeta dovode do povećane ekspresije iRNK gena koji kodiraju proinflamatorne citokine (IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-25, IL-33 i TSLP) (136,209,210).

TSLP se sintetiše u epitelnim ćelijama pluća, kože i gastrointestinalnog trakta (211). Epitelne ćelije respiratornog trakta pokazuju povećanu ekspresiju TSLP i time promovišu njegovu ulogu u razvoju specifičnog Th2 odgovora tokom inflamacije (123,205). Rezultati dobijeni na dve ćelijske linije u ovoj disertaciji, Caco-2 i HEK293, su u korelaciji sa prethodno navedenim i pokazali su povećanu ekspresiju iRNK za TSLP nakon tretmana aktiviranim aktinidinom. Takođe, različiti alergeni (Der p 2 npr.) izazivaju povećanu ekspresiju iRNK za IL-1 β , TNF α i IL-6 u epitelnim ćelijama respiratornog trakta (212).

U ovoj doktorskoj disertaciji je uveden novi model sistem za procenu aktivacionog potencijala alergena hrane tokom faze senzitivacije u razvoju alergija na hranu. 2D organoidi, dobijeni iz mišjih intestinalnih ćelija se sastoje iz

enterocita, endokrinih i mucin-sekretujućih goblet ćelija i nakon tretmana aktinidinom oslobađaju specifične Th2 citokine. Organoidi mogu doprineti razumevanju mehanizama senzitivacije na alergene hrane i mogu biti koristan model za ispitivanje potencijala novih alergena. Rezultati iz ove disertacije mogu biti osnova za uspostavljanje novog modela koji može, ako ne da ukine, bar smanji upotrebu laboratorijskih životinja za testiranje alergena hrane.

6. Zaključak

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivani su efekti proteolitičke aktivnosti aktinidina, cistein proteaze iz ploda zelenog kivija, na integritet intestinalnih epitelnih ćelija. U svetlu toga, praćen je uticaj ovog alergena na epitelne ćelije u smislu njihove aktivacije i iniciranja urođene imunosti. Zaključci do kojih se došlo su sledeći:

- Aktivacija aktinidina se postiže inkubacijom u medijumu za gajenje ćelijskih kultura
- Aktinidin povećava propustljivost intestinalne epitelne barijere i u *in vivo* ispitivanjima na mišjem model sistemu i *in vitro*, korišćenjem Caco-2 ćelija
- Aktinidin diferencijalno reguliše ekspresiju proteina čvrstih veza u različitim segmentima tankog creva u *in vivo* ispitivanjima na mišjem model sistemu
- Aktinidin dovodi do povećanja ekspresije informacione RNK za IL-33, IL-25 i TSLP u intestinalnim epitelnim ćelijama miša
- Epitelne ćelije proizvode proinflamatorne i proalergene citokine u odgovoru na aktinidin
- Aktinidin dovodi do povećanja ekspresije informacione RNK za proinflamatorne i proalergene citokine u humanim intestinalnim epitelnim ćelijama *in vitro*
- Aktinidin raskida proteine čvrstih veza u ispitivanim 2D mišjim organoidima i Caco-2 ćelijama
- Aktinidin proteolitički degraduje protein okludin, jedan od proteina međućelijskih čvrstih veza *in vitro*
- Ekspresija informacione RNK za inducibilnu azot monoksid sintazu se povećava u epitelnim ćelijama usled dejstva proteolitički aktivnog aktinidina
- Aktinidin proteolitički dovodi do raskidanja preko 40 proteina na površini Caco-2 ćelija koji su integralni deo međućelijskih veza
- Aktinidin aktivira NF- κ B signalni put *in vitro*

7. Materijal i metode

7.1. Prečišćavanje aktinidina

Plodovi zelenog kivija (*Actinidia deliciosa*) kupljeni u lokalnoj radnji korišćeni su kao polazni materijal. U slučaju izolovanja Act d 1, za ekstrakciju je korišćen 100 mM natrijum citratni pufer pH 5,0 bez dodavanja inhibitora proteaza. Iseckani i oljušteni plodovi kivija su homogenizovani u blenderu u ekstrakcionom puferu (1:2 g/vol) 1 minut, a zatim je pH suspenzije podešena i ekstrakcija izvođena 2 sata, uz mešanje, na 4 °C. Nakon toga ekstrakt je centrifugiran 15 minuta na 7 000 rpm. Uzorak je, potom, dijalizovan (MWCO 6000–8000 Da, Serva) naspram 2 L ekstrakcionog pufera, uz mešanje i tri izmene pufera u toku 24 h. Zatim je pH ekstrakta podešen i određena je koncentracija proteina u njemu bicinhonskom metodom.

7.2. Analitičke tehnike

7.2.1. Određivanje koncentracije proteina bicinhoninskom metodom

Bicinhoninska metoda (*bicinchoninic acid*, BCA) je kolorimetrijska metoda, u kojoj dolazi do promene boje rastvora od zelene u ljubičastu u zavisnosti od koncentracije proteina (213). Osnova ove reakcije je redukcija Cu²⁺ jona iz bakar-sulfata do Cu⁺ pomoću peptidnih veza proteina na višim temperaturama. Molekuli bicinhoninske kiseline se vezuju za Cu⁺ jone i stvaraju ljubičaste komplekse koji apsorbuju svetlost na 562 nm. Bočni ostaci cisteina, tirozina i triptofana pospešuju stvaranje ovih kompleksa, a na višim temperaturama (37 °C do 60 °C) tu ulogu preuzimaju peptidne veze.

Reagensi:

A: BCA reagens (Na-bicinhonat 0,1 g, Na₂CO₃ × H₂O 2,0 g, Na-tartarat dihidrat 0,16 g). pH se podešava na 11,25 uz dodatak rastvora NaOH

B: Rastvor bakar-sulfata (CuSO₄ × 5H₂O 0,4 g)

C: Radni reagens: reagens A: reagens B=100 V:2 V

Postupak rada

Test je rađen u mikrotitar pločicama, a apsorbancu očitavana ELISA čitačem *Multiskan Ascent Photometric reader* (Thermo LabSystems), uz odgovarajući filter. U 100 μL uzorka dodato je 2 mL radnog reagensa i promućkano. Uzorak je inkubiran na 60 °C 30 minuta. Nakon toga uzorak je ohlađen do sobne temperature i izmjerena apsorbancu na 562 nm. Opseg standardne krive: 0,1–1 mg/mL.

7.2.2. Masena spektrometrija

Za potrebe masene analize proteinska traka je pažljivo isečena iz poliakrilamidnog gela. Protein je, zatim, digestovan tripsinom u gelu, pa su dobijeni peptidni fragmenti ekstrahovani iz gela i dalje analizirani pomoću MALDI TOF/TOF ili nanoHPLC-nanoESI-LTQ-Orbitrap metodom koje omogućavaju precizno određivanje peptida.

Postupak rada:

1. Proteinske trake su isečene iz gela i prebačene u tube
2. Dodato je 200 μL rastvora za obezbojavanje (100 mM NH_4HCO_3 /50% ACN) i mešano na šejkeru u trajanju od 30 min
3. Dodato je 100 μL ACN a acetonitril je uparen na *SpeedVac*-u
4. Dodato je 30 μL 10 mM DTT rastvora tako da su komadi gela bili pokriveni, i inkubirani 30 min na ST
5. DTT rastvor je zamenjen jednakom zapreminom 55 mM IAA rastvora i inkubiran u trajanju od 45 min na ST u mraku
6. IAA rastvor je uklonjen i komadići gela isprani sa 100 μL 25 mM NH_4HCO_3 u trajanju od 10 min uz vorteksovanje
7. Uklonjen je rastvor za ispiranje i dodato je 100 μL ACN
8. ACN je uklonjen u *SpeedVac*-u a komadi gela rehidratirani sa 15 μL 20 ng/ μL rastvora tripsina u trajanju od 2h na 4°C
9. Dodato 40 μL 40 mM NH_4HCO_3 /10% ACN

10. Gel je inkubiran preko noći na 37°C na šejkeru
11. Dodato je 150 µL dH₂O i peptidi su ekstrahovani iz gela u trajanju od 10 min uz mešanje
12. Rastvor ekstrahovanih peptida je prebačen u novu tubu
13. Komadi gela su tretirani sa 50 µL 50% ACN/5% TFA u trajanju od 30 min
14. Dobijeni uzorci upareni u *Speed Vac*-u
15. Dodato je 20 µL 0.1% TFA za rehidrataciju uzoraka
16. Pomoću *Zip-Tip* (C-18) nastavaka prečišćeni su peptidi
17. Uzorak je pomešan sa matriksom u odnosu 1:1, (v/v) i nanet na MALDI TOF pločicu (1 µL na svako polje pločice)

7.2.3. Kvantifikacija endotoksina u preparatu aktinidina

Koncentracija endotoksina u prečišćenom preparatu aktinidina je određivana korišćenjem komercijalnog kita za kvantifikaciju pomoću hromogenog supstrata (*Limulus ameobocyte lysate (LAL) chromogenic endotoxin quantification kit* (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Test je urađen po uputstvima proizvođača a određivanje u uzorcima aktinidina korišćenim u ovoj disertaciji (aktivni i inhibirani aktinidin, koncentracije 1 mg/mL i 0.1 mg/mL).

7.2.4. Protočna citometrija

Analiza ćelija upotrebom protočnog citometra je, najpre, zahtevala tripsinizaciju samih ćelija i dobijanje ćelijske suspenzije. Nakon toga su ćelije centrifugirane 5 minuta na 2000 rpm, supernatant odliven a ćelije rastvorene u PBS-u. Intenzitet fluorescencije zelenog fluorescentnog proteina (10^4 događaja) je meren korišćenjem *FACS Calibur* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Upotrebljen je laser na 488 nm za ekscitaciju a emisija je detektovana na 525 nm (FL1H). Pozitivne ćelije su selektovane podešavanjem SSC (*side scatter*) naspram FL1H kanala. Dobijene vrednosti su prikazane kao histogram poređenja intenziteta fluorescencije u transfektovanim HEK293 ćelijama tretiranim aktiviranim ili inhibiranim aktinidinom.

7.2.5. Denzitometrijska analiza agaroznih gelova

Proizvodi umnoženih gena su analizirani na agaroznim gelovima a relativna ekspresija iRNK pomoću denzitometrijske analize. U tu svrhu je korišćen *Image Studio Lite v5.2* softvera (LICOR Biosciences, Nebraska, US). Semi-kvantitativna analiza genske ekspresije je urađena normalizacijom vrednosti naspram kontrolnog gena a, zatim, urađeno je poređenje vrednosti za svaki korišćeni tretman (aktivirani i neaktivirani aktinidin) sa vrednostima kontrolnog monosloja (čije su vrednosti označene brojem 1). Grafici su pripremani upotrebom *GraphPad Prism v6.07* softvera (GraphPad Software, California, US).

7.3. Hromatografske tehnike

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

Aktinidin je prečišćen iz proteinskog ekstrakta kivija pripremljenog u 100 mM natrijum citratnom puferu, pH 5,0. Jonoizmenjivač SP-Sephadex (veličina čestica 40-120 μm , GE Healthcare) je pripremljen bubrenjem u radnom puferu (100 mM natrijum-citratnom puferu, pH 5,0) tokom 24h. Nabubrela matriks je naliven u kolonu dimenzija 100 mm \times 27 mm i ekvilibrisan propuštanjem 5 zapremina radnog pufera kroz kolonu. Na kolonu je nanesen kivi ekstrakt i pri protoku od 1 mL/min eluirani su nevezani proteini radnim puferom do negativnog spot testa. Dobijena frakcija nevezanih proteina (delimično prečišćen Act d 1) je dijalizovana naspram 20 mM TRIS-HCl pufera, pH 8,0 tokom 48 h, uz dve izmene pufera.

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

Uzorak dobijen prethodnom hromatografijom je nanesen na unapred pripremljen QAE-Sephadex matriks (veličina čestica 40-120 μm , GE Healthcare) koji je ekvilibrisan propuštanjem 5 zapremina radnog pufera kroz kolonu (20 mM TRIS-HCl, pH 8.0.). Dimenzije korišćene kolone su bile 100 mm \times 27 mm. Nakon što je radnim puferom eluirana frakcija nevezanih proteina do negativnog spot testa, vezani proteini su eluirani gradijentom soli u rasponu od 0,1 M NaCl do 0,5

M NaCl, pri brzini protoka od 0,8 mL/min. Frakcije u kojima je elektroforezom dokazano prisustvo aktinidina su spojene i dijalizovane naspram 20 mM NH_4HCO_3 pufera pH 8.8 tokom 48 h uz dve izmene pufera. Nakon dijalize uzorak je koncentrovan ultrafiltracijom do koncentracije 1 mg/mL, a zatim liofilizovan.

7.4. Kazeinolitički esej

Proteolitička aktivnost tretmana je kvantifikovana enzimskim esejom sa kazeinom (Sigma-Aldrich) kao supstratom a kako je opisano u prethodno publikovanim radovima (185,186). Pripremljen je 2 % rastvor supstrata u 0.1 M kalijum fosfatnom puferu pH 7.6, zatim se 400 μL ovog rastvora doda u smešu od 40 μL 250 mM L-cisteina, 120 μL 1 M KH_2PO_4 pH 7.0, 40 μL 250 mM EDTA, 40 μL 250 mM NaOH i 80 μL destilovane vode. Reakciona smeša je ekvilibrisana na 37 °C, nakon čega je dodato 80 μL ispitivanog uzorka tretmana i smeša je inkubirana 1 sat na 37 °C. Enzimska reakcija je prekinuta dodavanjem 1,2 mL 5 % trihlorsirćetne kiseline (TCA) i smeša inkubirana još sat vremena na 37 °C. Nakon centrifugiranja (13 000 \times g, 15 min) izmerena je A_{280} supernatanta, naspram slepe probe. Slepa proba je pripremljena mešanjem tretmana sa TCA i naknadnim dodavanjem rastvora kazeina u smešu. Jedna jedinica proteolitičke aktinosti (U) je definisana kao količina enzima koja daje 0,1 jedinicu A_{280} po minutu. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija iz tri nezavisna eksperimenta. Rezultati su prikazani kao relativna proteolitička aktivnost (%) u odnosu na kazeinolitičku aktivnost aktiviranog aktinidina (100 % aktivnosti). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija iz tri nezavisna eksperimenta. Rezultati su prikazani kao relativna proteolitička aktivnost (%) u odnosu na kazeinolitičku aktivnost aktiviranog aktinidina (100 % aktivnosti).

7.4.1. Aktivacija aktinidina

Za optimizaciju aktivacije aktinidina su korišćena dva pristupa: aktivacija pomoću DTT i aktivacija inkubacijom u medijumu za uzgajanje humanih ćelijskih linija. U oba slučaja je liofilizovani aktinidin rastvoren u odgovarajućem rastvoru i inkubiran 1 h na 37 °C. Aktivnost svakog preparata aktinidina je određivana

kazeinolitičkim testom. Inhibirani preparat aktinidina je pripremljen dodavanjem ireverzibilnog inhibitora cistein proteaza (E-64) u jednakom molskom odnosu (1:1). Za potrebe *in vivo* studija aktinidin je aktiviran u PBS-u u koji je dodat 2 mM L-cistein.

7.5. Elektroforetske tehnike

7.5.1. Agarozna gel elektroforeza

Sva elektroforetska razdvajanja su rađena na *Amersham Pharmacia* horizontalnom sistemu za elektroforezu prema uputstvu proizvođača. Za elektroforezu su korišćeni 6x *Orange Loading Dye* i 1 kb DNK markeri (*Thermo Scientific*) prema uputstvima proizvođača. Potrebni rastvori:

Reagensi:

- TAE pufer (50×), pH 8,0 (2 M TRIS, 50 mM EDTA)
- 1 % agarozna

Postupak:

Rastopljena agarozna koja sadrži boju za bojenje nukleinskih kiselina *SimplySafe* (EURx, Gdansk, Poland) je razlivena na ploču za elektroforezu, u koju su prethodno ubačeni češljevi za bunare i ostavljena je da očvrstne. Kada se formirao gel, izvađeni su češljevi. Ploča sa gelom je stavljena u kadu za elektroforezu i prelivena sa TAE puferom (1×). Uzorci DNK koji su analizirani se pomešani su sa 6× *Orange Loading Dye* u odnosu 5:1 (v:v) i naneti na gel. Elektroforeza je rađena na 80 V dok front boje nije stigao na oko 1 cm od donje ivice gela, oko 60 min. Nakon toga je gel analiziran na UV Sistemu za dokumentaciju gelova (*VWR*).

7.5.2. Natrijum dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS PAGE)

SDS PAGE se radi po originalnoj *Laemmli*-jevoj proceduri (214). Sva elektroforetska razdvajanja proteina su rađena na *Hoeffer SCI* aparaturi prema

instrukcijama proizvođača. U radu su korišćeni molekularni markeri masa od 14 do 116 kDa (*Fermentas*).

Reagensi:

- A Monomerni rastvor akrilamida (30 % T, 2,7 % C)
- B Pufer za razdvajajući gel (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)
- C. Pufer za koncentrujući gel (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)
- D. 10 %-tni rastvor SDS-a
- E. 10 %-tni rastvor APS-a
- F. Tetrametilendiamin (TEMED)
- G. Pufer za nadslojavanje polimerizujućeg gela (n-butanol zasićen vodom)
- H. Pufer za elektroforezu (0,25 M Tris, 0,192 M glicin, 0,1 % SDS, pH 8,3)
- I Pufer za pripremu uzoraka (5×PUZ) (60 mM TRIS, pH 6,8, 25 % glicerol, 10 % SDS, 14,4 mM 2-merkaptetanol, 0,1 % bromfenol plavo)
- J. Rastvor boje (0,1 % CBB, 50 %-tni metanol, 10 %-tna sirćetna kiselina)
- K. Rastvor za obezbojavanje (7 %-tna sirćetna kiselina)

Tabela 9. Uputstvo za pripremu 10 mL 12% poliakrilamidnog gela za razdvajanje:

Komponenta	12% gel za razdvajanje	4% gel za koncentrovanje
Rastvor akrilamida	4 mL	500 µL
1,5 M TRIS pufer pH 8,8	2,5 mL	/
0,5 M TRIS pufer pH 6,8	/	940 µL
Voda	2 mL	2,25 mL
10% SDS	100 µL	38 µL
TEMED	4 µL	2 µL
10% APS	75 µL	25 µL
Ukupna zapremina	10 mL	4 mL

Postupak:

Rastvor gela za razdvajanje je neposredno pred dodatak rastvora E i F dezaerisan na vakuum pumpi u trajanju od 5 minuta. Nakon dezaeracije dodati su rastvori E i F a pripremljen rastvor je naliven između staklenih ploča (dimenzije ploča su 10 × 8 cm, međusobno odvojene 1 mm), nadslojen rastvorom G i ostavljen da polimerizuje 20-30 min na s.t. Po polimerizaciji, vodom je

isperana površina ispolimerizovanog gela i naliven je rastvor gela za koncentrovanje. U gel je uronjen češalj ($d=1$ mm). Ploče su nakon polimerizacije gela za koncentrovanje isprane vodom i uronjene u kadu sa rastvorom H i elektroforetski sistem je priključen na napajanje. Korišćena je *Hoeffer SCI* aparatura.

Uzorci su pripremani zagrevanjem 5 minuta na ključalom vodenom kupatilu u rastvoru boje. Elektroforeza je urađena na 80 V do ulaska BFP u gel za razdvajanje (oko 45 minuta) i zatim na 250 V (dok BFP ne stigne na oko 1 cm od donje ivice gela) još 60-90 minuta. Nakon završene elektroforeze, gel je obojen rastvorom J dok je obezbojavanje rađeno u rastvoru K do pojave plavo obojenih proteinskih traka na gelu.

7.6. Imunohemijske tehnike

7.6.1. Detekcija proteina u imunoblotu (opšti protokl)

Transfer proteina nakon SDS PAGE na nitrocelulozu je urađen pod dejstvom električne struje jačine 2 mA/cm^2 gela u sendviču od 3 sloja filter papira odgovarajućih dimenzija (dimenzije filter papira moraju odgovarati dimenzijama gela koji se blotuje). Nitroceluloza (NC) je postavljena prema pozitivnoj elektrodi. *Semi-dry* uslovi podrazumevaju da sendvič mora dobro da bude očeđen od pufera za blot. Elektrotransfer je trajao 60 minuta. Proteini na membrani su uočeni bojenjem sa 0,5% *Ponceau-S* u 5% sirćetnoj kiselini.

Reagensi:

- Trisom puferisani fiziološki rastvor (TBS): 30 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.6
- tTBS: 0,2 % *Tween 20* u TBS
- Rastvor za blokiranje: 5% odmašćeno mleko u tTBS (proceđeno kroz nabrani filter papir)
- Rastvor za razblaživanje antitela: tTBS
- Pufer za AP: 100 mM TRIS, 50 mM MgCl_2 pH 9,6
- Radni rastvor NBT-a (0.6 mg/mL)

- Radni rastvor BCIP-a (0.3 mg/mL)

Postupak:

NC membrana je obezbojena u tTBS, 10 min, a nakon toga je membrana blokirana u 5% odmašćenom mleku (u tTBS-u), 1 h na ST uz mešanje. Nakon toga membrana je ispirana tTBS-om (3×10 min) i postavljena da se inkubira sa prethodno optimizovanom količinom primarnog antitela, 1-2 h na ST uz mešanje (ili preko noći na $+4^{\circ}\text{C}$). Nakon primarnog antitela ponovljeno je ispiranje (tTBS, 3×10 min) pa je membrana inkubirana u rastvoru sekundarnih antitela obeleženih alkalnom fosfatazom (*Sigma-Aldrich*), 1 h na ST uz mešanje. Pre dodatka supstrata membrana je ispirana tTBS-om (3×15 min) i TBS (1×15 min). Za detekciju su korišćeni supstrati: BCIP/NBT (precipitirajući supstrat alkalne fosfataze). Smeša supstrata se priprema neposredno pred upotrebu: $33 \mu\text{L}$ BCIP i $66 \mu\text{L}$ NBT u 9 mL pufera za alkalnu fosfatazu. Supstrat se naliva preko membrane i inkubira do pojave traka, a reakcija se zatim prekida dH_2O .

7.6.2. Imunofluorescentno bojenje ćelija

Reagensi:

- Triton X 100 u 0.1 % PBS-u (čuvati na st)
- Formaldehid 37 %
- Boja za bojenje nukleusa (opciono)

Postupak:

Tretiranom monosloju ćelija (nakon odlivanja tretmana) dodat je rastvor formaldehida do finalne koncentracije (4 %) a zatim inkubira na st. 10-15 minuta. Potom je rastvor aspiriran. Dodati rastvor Triton X-100 u PBS-u tako da su sve ćelije prekrivene (u zavisnosti od veličine bunara) i inkubirane 5 minuta. Nakon toga preparat ćelija je ispran $3 \times$ rastvorom PBS-a i dodat je rastvor prvog antitela u PBS-u koji sadrži 1 % BSA (goveđi serum albumin). Preparat je inkubiran 2 h na st. Zatim ispran $3 \times$ PBS-om i dodat rastvor sekundarnih antitela u PBS-u koji sadrži 1 % BSA, inkubiran 2 h na st u mraku. Aspiriran je rastvor i preparat ispran

3 × rastvorom PBS-a. Boja za bojenje nukleusa se može dodati zajedno sa rastvorom sekundarnih antitela. Ovako pripremljene ćelije se mogu čuvati u frižideru na +4 °C.

Za vizualizaciju je korišćen fluorescentni mikroskop OLYMPUS BX60 sa objektivom uveličanja 40x, a slike su dobijene upotrebom Leica LAS-AF softvera (Leica Microsystems, Wetlar, Germany). Finalne slike su obrađene pomoću Adobe Photoshop CS5 softvera (Adobe Systems Incorporated, CA, USA).

7.6.3. Imunosorbentni esej povezan sa enzimom

Imunosorbentni esej povezan sa enzimom-i (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA) je izveden pomoću specifičnih parova antitela kupljenih od firmi *Biolegend* i *eBioscience*. Svaki par antitela je sadržao monoklonsko antitelo za kuplovanje i antitelo obeleženo biotinom. U svim testovima korišćene su MaxiSorp ELISA pločice (NUNC) sa 96 bunara i ravnim dnom.

Reagensi:

- Pufer za kuplovanje: 50 mM karbonatno-bikarbonatni pufer pH 9,5
- Fosfatom puferisani fiziološki rastvor pH 7.4
- PBS/Tween: 0.5 mL Tween u 1 L PBS
- Rastvor za blokiranje: 1% BSA u PBS-u. Rastvor je filtriran pre korišćenja.

Postupak:

Kuplovanje:

1. Odgovarajuće antitelo za kuplovanje je razblaženo do finalne koncentracije 1 µg/ml u puferu za kuplovanje i naneto u svaki zid pločice (50 µL).
2. Pločica je zatvorena i inkubirana na 4 °C preko noći.

Blokiranje:

1. Rastvor iz svakog bunara je odliven i isprani su $4 \times$ sa PBS/Tween 20 i blokirani dodavanjem $200 \mu\text{L}$ rastvora za blokiranje.
2. Pločica je inkubirana na sobnoj temperaturi 2h.

Nakon toga je isprana 4×5 min. sa PBS/Tween 20.

Dodavanje standarda i uzoraka:

1. Odgovarajući standardi i analizirani uzorci dobijeni nakon tretmana ćelija/organoida/seruma miševa razblaženi su u rastvoru za blokiranje (razblaženja su pripremljena u propilenskim tubama) i dodati po $50 \mu\text{L}$ u svaki bunar pločice.
2. Pločica se inkubirala 4h na sobnoj temperaturi.
3. Isprati 4×5 min. sa PBS/Tween 20.

Dodavanje antitela za detekciju:

1. Biotinom-obeleženo antitelo razblaženo je do finalne koncentracije $1 \mu\text{g/ml}$ u rastvoru za blokiranje i dodato u svaki bunar ($100 \mu\text{L}$).
2. Pločica je inkubirana na sobnoj temperaturi 1h.
3. Potom isprana 4×5 min. sa PBS/Tween 20.

Dodavanje streptavidin-HRP

4. Streptavidin-AP razblažen je u rastvoru za blokiranje $2000 \times$ i dodat u svaki bunar ($50 \mu\text{L}$).
5. Pločica je inkubirana na sobnoj temperaturi 30 minuta.
6. Isprana $\geq 5 \times$ sa PBS/Tween

Dodavanje supstrata:

1. Štok ABTS supstrata temperiran je 20 min. pre korišćenja. Radni rastvor supstrata je pripreman dodavanjem $11 \mu\text{L}$ 30% H_2O_2 na 11mL supstrata.

Zatim je razliveno po 50 μ L u svaki bunar i pločica je inkubirana na sobnoj temperaturi 60 min.

2. Reakcija je prekinuta dodavanjem 25 μ L ABTS stop rastvora.
3. Apsorbanca je očitana na 405 nm

7.7. Molekularno-biološke metode

7.7.1. Kultura ćelija

U ovom radu korišćene su dve humane ćelijske linije epitela kolorektalnog adenokarcinoma Caco-2 i embrionske ćelije bubrega HEK293. Ove ćelijske linije se održavaju kao monosloj u hranljivoj podlozi uz dodatak 10 % termički inaktiviranog fetalnog goveđeg seruma, 1 % (v/v) 200 mM L-glutamina (*Gibco*, Invitrogen, Carlsbad, USA) i 1 % rastvora penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA). Podloge su čuvane u frižideru, a pre rada sa ćelijama, zagrevane su do 37 °C u vodenom kupatilu.

7.7.1.1. Odmrzavanje ćelija

Da bi maksimalni broj ćelija ostao neoštećen nakon odmrzavanja, prati se određeni protokol:

1. Ćelijski medijum je prethodno zagrejan na 37 °C
2. Tubica sa ćelijama se što pre ubaci u vodeno kupatilo, takođe na 37 °C, da bi se sprečila liza ćelija
3. Nakon što se poslednji kristal leda otopio, tubica je prebačena u sterilnu zonu za rad sa ćelijama (ćelijski laminar), gde je ćelijska suspenzija postepeno rastvarana u 5 mL kompletnog ćelijskog medijuma u flasku od 25 mL (T-25)
4. Ćelije u medijumu su nežno promešane
5. Sledećeg dana, nakon adheriranja ćelija za površinu suda, medijum je promenjen i proverena je vijabilnost ćelija pod mikroskopom

7.7.1.2. Održavanje ćelijske kulture

Kulture ćelija su gajene u inkubatoru na temperaturi 37 °C u atmosferi vazduha sa 5 % CO₂. Za gajenje ćelija korišćeni su polietilenska plastika, zapremine od 25-75 mL, kao i Petri šolje prečnika 15 cm (Nunc™, Reskilde, Denmark). Održavanje ćelija u monosloju postignuto je redovnom zamenom sveže podloge i pasažiranjem po potrebi, 7-10 dana, u odnosu 1:2 ili 1:4 (3×10^4 ćelija/cm²) i održavanjem rasta do visoke konfluencije pre pasaža. Pasažiranje ćelija je obavljano u sterilnoj komori, uz korišćenje sterilnih laboratorijskih sudova i uz nošenje zaštitne laboratorijske opreme. Pasažiranje je rađeno u trenutku postizanja konfluencije, odnosno onda kada ćelije potpuno prekriju dno suda, ili kada se istroše nutrijenti podloge, na šta ukazuje indikator promene pH podloge (215).

Ćelijski medijum se priprema u sterilnim uslovima, u laminaru. Fetalni goveđi serum pospešuje rast ćelija tako što neutrališe toksične metabolite vezujući ih, neutrališe tripsin i ostale proteolitičke enzime i sadrži peptidne hormone i faktore rasta koji omogućavaju normalan rast ćelija. Antibiotici nisu neophodni, ali se koriste da bi se izbegle potencijalne kontaminacije mikroorganizmima.

7.7.1.3. Pasažiranje ćelija

Kada je dno suda potpuno prekriveno monoslojem ćelija ili kada su nutritivne materije iz podloge potpuno potrošene, podloga je odlivena iz flaska. Dno flaska na kome su zalepljene ćelije je ispran 0,25 % rastvorom tripsina zagrejanog do 37 °C u vodenom kupatilu. Zatim su ćelije inkubirane na 37 °C, 1-5 minuta. Promena morfologije ćelija se prati pod svetlosnim mikroskopom. Kada su ćelije počele da se zaokrugljuju, sadržaj je prenet u epruvetu u kojoj se nalazilo 2 mL hranljive podloge. Antitripsin prisutan u podlozi neutrališe dalje dejstvo tripsina na prenete ćelije. Nakon centrifugiranja (800 rpm, 7 minuta) i resuspendovanja taloga u svežoj podlozi, jedna zapremina suspenzije ćelija je vraćena u sud za gajenje ćelija, dopunjena svežom podlogom i stavljena u inkubator na 37 °C.

7.7.1.4. Zamrzavanje ćelija

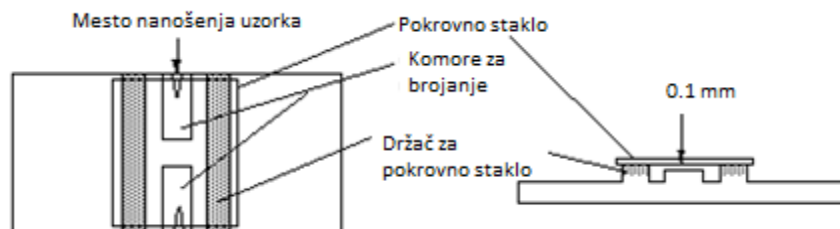
Nakon rasta, pasažiranja i brojanja ćelija, deo njih koji nije potreban za ekperimentalni rad je ponovo zamrznut na -80°C . U ćelijski medijum je pre zamrzavanja dodat krioprotektivni agens (DMSO ili glicerol) koji smanjuje tačku mržnjenja i povećava permeabilnost ćelijske membrane za vodu. Ovim se smanjuje štetni efekat koji zamrzavanje može da ima na vijabilnost ćelija.

Protokol za zamrzavanje ćelija je sledeći:

1. Medijum za zamrzavanje (10% v/v FBS, 10% v/v glicerol/DMSO u ćelijskom medijumu) i tubice za zamrzavanje su prethodno rashlađene
2. Ćelijska suspenzija koja je dobijena nakon tripsinizacije je centrifugirana na 1500 rpm 5 minuta nakon što se odredi broj ćelija po 1 mL medijuma
3. Supernatant je odvojen od taloga i talog je resuspendovan u medijumu za zamrzavanje u koncentraciji od oko $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ ćelija/mL.
4. Alikvoti od po 1 mL su zatim zasebno zamrznuti na temperaturi od -80°C

7.7.1.5. Brojanje ćelija

Za određivanje tačnog broja ćelija u jedinici zapremine u ćelijskoj suspenziji korišćena je komora za brojanje, odnosno hemocitometar.

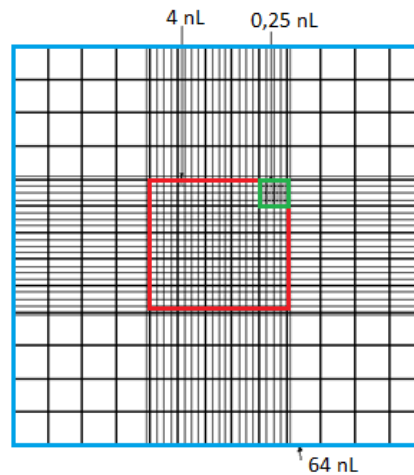


Slika 44. Hemocitometar.

Da bi se pripremila za brojanje, površine ploče i pokrovnog stakla su pažljivo očišćene apsolutnim etanolom i dejonizovanom vodom, nakon čega su ostavljeni na vazduhu da se osuše. Pokrovno staklo se postavlja na ploču pre nanošenja uzorka. Ćelijska suspenzija je pipetom nanesa na komoru. Ovako

pripremljena komora za brojanje je zatim postavljena na stalak mikroskopa, fokusirana i ćelije su izbrojane u odgovarajućim kvadratima.

Potrebno je obratiti pažnju da li je ćelijska suspenzija dovoljno razblažena, tako da ne dođe do preklapanja ćelija prilikom brojanja.



Slika 45. Kvadrati za brojanje na hemocitometru i njihova zapremina.

7.7.1.6. Postupak određivanja vijabilnosti ćelija

Vijabilnost ćelija u ovom radu je određivana metodom bojenja sa tripan-plavim i zasniva se na osobini živih ćelija da izbacuju boju tripan-plavo i ostaju bezbojne, dok mrtve ćelije akumuliraju boju i postaju plavo obojene.

1. 10 μL ćelijske suspenzije je pomešano sa 90 μL boje *Trypan blue* (0,4%)
2. Rastvor je lepo promešan i ostavljen da stoji na sobnoj temperaturi 5 minuta
3. Prethodno očišćeno pokrovno staklo je postavljeno na hemocitometar i u komore je pipetom dodato po 20 μL rastvora boje i ćelijske suspenzije
4. Vijabilne, nebojene ćelije su pojedinačno brojane u svakoj od komora u odgovarajućim kvadratima
5. Nakon rada, pločica i hemocitometar su ponovo očišćene etanolom i dejonizovanom vodom

(N) je dobijen po formuli: $N = N_s \times R \times 10^4$, gde je N_s = prosečan broj ćelija po polju komore, a R = faktor razblaženja ćelija u rastvoru za bojenje (u ovom slučaju iznosi 10).

7.7.1.7. Merenje transepitelnog električnog otpora

Ćelije su zasejane (0.3×10^5 ćelija/insertu) na polikarbonatne inserte za ćelijsku kulturu (10 mm veličina membrane, 0,4 μ m dijametar pora (NUNC) u pločama sa 24 bunara (NUNC) na 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5 % CO₂ do konfluencije. Transepitelni električni otpor monosloja je meren pomoću para elektroda povezanih na volt/om metar (Iskra). Pod ovim uslovima TEER u vrednosti >1000 d/cm² su dobijani posle 5 dana od sađenja ćelija. Tretmani su dodavani (350 μ L 1 mg/mL i 0.1 mg/mL aktiviranog ili inhibiranog aktinidina) apikalno i promene TEER merene posle 1 i 4 sata. Dobijene vrednosti TEER su prikazane kao procenat TEER pre tretmana, korigovani za vrednosti TEER dobijenih za bunare bez zasađenih ćelija. Rezultati predstavljaju srednju vrednost \pm standardna devijacija iz tri nezavisna eksperimenta, a srednje vrednosti tretiranih uzoraka su upoređene sa odgovarajućim netretiranim kontrolama.

7.7.1.8. Transfekcija ćelija

Za potrebe tranzitne ekspresije, HEK293 ćelije su gajene u T-75 flaskovima (Nunc™ EasYFlask™, *Thermo Fisher Scientific*, MA, USA) i odgovarajućem medijumu. Pre transfekcije su ćelije pasažirane i zasejane u pločice sa 96 bunara u gustini 4×10^4 ćelija u 150 μ L kompletnog medijuma po bunaru. Ćelije su, zatim, gajene u inkubatoru pod standardnim uslovima dok nisu dostigle konfluenciju od ~80 %. Na dan transfekcije, 0.2 ng odgovarajućeg plazmida (*Signal NFkB Pathway Reporter Assay Kit (GFP)*, *Qiagen*, Hilden, Germany) je razblaženo u medijumu bez FBS-a i antibiotika (Opti-MEM I Reduced Serum Media, *Thermo Fisher Scientific*, MA, USA) u ukupnoj zapremini 50 μ L. Nakon toga je dodato po 0.75 μ L agensa za transfekciju (*Attractene Transfection Reagent* (*Qiagen*, Hilden, Germany)). Kompleks DNK/*Attractene* je inkubiran 20 minuta na sobnoj temperaturi radi formiranja stabilnog kompleksa. Zatim je ćelijama dodat medijum (100 μ L) i 50 μ L kompleksa DNK/*Attractene*. Ćelije su inkubirane 48 h. Nakon toga je ćelijama dodat aktiviran i inhibiran aktinidin i tretman je

inkubiran 24 h u inkubatoru za gajenje ćelija pod standardnim uslovima. Aktivacija NF- κ B je analizirana protočnom citometrijom i fluorescentnom mikroskopijom, zasnovanoj na detekciji fluorescencije zelenog fluorescentnog proteina.

Aktivacija NF- κ B signalnog puta je pokazana upotrebom fluorescentnog mikroskopa. Ćelije su, u tu svrhu, uzgajane na staklenim slajdovima (u pločama sa 24 bunara) za gajenje ćelija i formiranje stabilnog monosloja. Količine korišćene plazmidne DNK u ovom eksperimentu su bile: 0.4 μ g/bunaru i 1.5 μ L reagensa za transfekciju po bunaru. Protokol za transfekciju je opisan u **odjeljku 7.7.3.**

7.7.1.9. Određivanje citotoksičnosti aktinidina

U cilju određivanja vijabilnosti ćelija nakon tretmana aktinidinom, upotrebljen je kolorimetrijski test sa hromogenim supstratom. Test se bazira na sposobnosti živih ćelija da konvertuju tetrazolijum so (3-(4,5-dimetil(tiazol-2-il)-3,5-difenil)-tetrazolijum-bromid (MTT)) do formazanskog taloga a time se boja soli prevodi iz žute u tamno crvenu. Sposobnost ovog konvertovanja poseduju samo metabolički aktivne ćelije, tj. žive ćelije, jer enzim ciklusa limunske kiseline (sukcinat dehidrogenaza) vrši oksido-redukzione reakcije u kojima MTT, zapravo, ima ulogu koenzima (216).

7.8. Molekularno-genetičke metode

7.8.1. Izolovanje ukupne RNK

Za izolovanje ukupne RNK iz monosloja ćelija, organoida i ćelija intestinalnog trakta miševa korišćen je TRI reagens (*Sigma-Aldrich*). Na $5\text{--}10 \times 10^6$ ćelija dodaje se 1 mL reagensa. Pojednačni bunari sa ćelijama su zasebno tretirani na sledeći način:

1. Priprema uzorka

- Ćelije su uzastopnim pipetiranjem odvojene od bunara i ćelijska suspenzija je prebačena u ependorf i centrifugirana na $12000 \times g$ 15 minuta
- Supernatant je odbačen, dok je u talog dodato 200 μ L TRI reagensa

- Ponovnim pipetiranjem formiran je homogeni lizat ćelija
2. Razdvajanje faza
 - Da bi se postigla potpuna disocijacija nukleoproteinskih kompleksa, uzorci su ostavljeni 5 minuta na sobnoj temperaturi
 - Dodato je 40 μL hloroforma, uzorci su promešani 15 sekundi, a zatim ostavljeni na sobnoj temperaturi 2-15 minuta
 - Smeša je centrifugirana na 12000 $\times g$ 15 minuta na 4°C, nakon čega su dobijene tri faze (crvena organska faza sa proteinima, međufaza sa DNK i bezbojna vodena faza koja sadrži RNK)
 3. RNK precipitacija
 - Vodena faza je odvojena i dodato joj je 100 μL izopropanola
 - Uzorci su inkubirani 5-10 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirani na 12000 $\times g$ 10 minuta na 4°C (RNK talog je formiran na dnu ili na strani ependorfice)
 4. Ispiranje RNK
 - Supernatant je odbačen i talog RNK ispiran dodatkom 200 μL 75% etanola
 - Uzorci su, zatim, vorteksovani i centrifugirani na 7500 $\times g$ 5 minuta na 4°C
 5. Rastvaranje RNK
 - Supernatant je ponovo odbačen i talog RNK osušen 5-10 minuta na vazduhu
 - Talog RNK je, zatim, rastvoren u 50 μL destilovane vode

Koncentracija ukupne RNK i njena čistoća je određena na NanoDrop uređaju merenjem apsorbance na 260 nm i 280 nm. Izolovana RNK je čuvana na -80°C.

7.8.1.1. Reverzna transkripcija

RT-PCR metoda se koristi da bi se ukupna izolovana informaciona RNK prevela u odgovarajuću smešu cDNK pomoću enzima reverzne transkriptaze (RT). Tokom pripremanja smeše uzorci i reagensi se drže na ledu osim ako nije drugačije naznačeno. Postupak je rađen kako je naznačeno u protokolu kita *Thermo Scientific (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit)*. Sinteza cDNK

(*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR) iz totalne RNK (2 µg) je izvedena na ledu korišćenjem nasumičnih prajmera MultiScribe™ reverzne transkriptaze (50 U/µL) iz kita *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) prema uputstvima proizvođača. Reakcione smeše su inkubirane u PCR aparatu pod programom 25 °C 10 min, 37 °C 120 min, 85 °C 5 min, 4 °C ∞. Uspešnost sinteze cDNK i čistoća je proverena na 2 % agaroznom gelu sa etidijum bromidom.

7.8.2. Reakcija lančanog umnožavanja (*Polymerase chain reaction – PCR*)

PCR je urađen korišćenjem 800 ng cDNK i *PCR Master Mix 2×* (*Thermo Scientific*), 10 pmol prajmera je korišćeno za reakciju. Svi prajmeri su dobijeni od firme Invitrogen. Negativna kontrola (*NTC- Non Template Control*) nije sadržala templat cDNK. Proizvodi PCR reakcije su analizirani agaroznom gel elektroforezom. Ciklusi PCR-a su bili: inicijalna denaturacija na 95 °C 5 minuta, zatim 40 ciklusa: denaturacija na 95 °C 1 minut, vezivanje prajmera na T_m optimalnoj za svaki prajmer 1 minut, elongacija na 72 °C 30 sekundi i finalna elongacija na 72 °C 7 minuta.

7.8.3. Kvantitativni PCR u realnom vremenu (qRT-PCR)

Za ispitivanje efekta aktinidina na ekspresiju iRNK u različitim delovima intestinalnog trakta miševa korišćen je qRT-PCR. PCR je izvođen na uređaju ABI Prism 7500 Sequence Detection System (*Applied Biosystems*, CA, USA). Reakciona smeša je sadržavala 1 µL nerazblažene cDNA (800 ng), 5 µL Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (*Thermo Fisher Scientific*, MA, USA), uzvodni i nizvodni (*forward*, *reverse*) prajmer (300 nM) i sterilnu dejonizovanu vodu, po instrukciji proizvođača. Parametri za PCR ciklus su bili: inicijalna denaturacija na 95 °C 3 minuta, zatim 40 ciklusa: denaturacija na 95 °C 20 sekundi, vezivanje prajmera na T_m optimalnoj za svaki prajmer 30 sekundi, elongacija na 72 °C 30 sekundi. Gen specifični prajmeri su poručeni od firme Invitrogen (Paisley, UK) a sekvence preuzete iz baze podataka Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (NCBI, Bethesda, MD, USA). Analiza

rezultata ekspresije iRNK je urađena pomoću delta/delta Ct metode, normalizacijom vrednosti na osnovu *house keeping gena* (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH) za humane ćelije i β -aktina za mišje). Sekvence svih korišćenih prajmera su navedene u **Tabelama 10. i 11.**

Tabela 10. Sekvence prajmera za humane gene korišćene u radu

Gen (pristupni broj)	Sekvenca (5'-3')	Tm (°C)*
IL1- β (NM_000576.2)	For: AACCTCTTCGAGGCACAAGG Rev: GGCGAGCTCAGGTACTTCTG	49
IL-6 (NM_000600.3)	For: ACCCCAATAAATATAGGACTGGA Rev: GAGAAGGCAACTGGACCGAA	49
TNF α (NM_000594.3)	For: GACAAGCCTGTAGCCCATGT Rev: CTCTGATGGCACCACCAACT	49
TSLP (NM_033035.4)	For: TATGAGTGGGACCAAAAGTACCG Rev: GGGATTGAAGGTTAGGCTCTGG	51
IL-33 (NM_001164724.1)	For: GGTGTGGATGGGAAGAAGCTG Rev: GAGGACTTTTTGTGAAGGACG	61
IL-25 (NM_022789.3)	F: CCAGGTGGTTGCATTCTTGG R: TGGCTGTAGGTGTGGGTTC	49
iNOS (NM_000625.4)	For: ACCAGTACGTTTGGCAATGG Rev: TCAGCATGAAGAGCGATTTCT	49
GAPDH (NM_009386.2)	CGAGGCATCATCCCAAATAAGAAC TCCAGAAGTCTGCCCCGATCAC	58.7
CLDN1 (NM_021101)	For: AGCTGGCTGAGACACTGAAGA Rev: GAGAGGAAGGCACTGAACCA	63
CLDN2 (NM_020384.3)	For: GCCTCTGGATGGAATGTGCC Rev: GCTACCGCCACTCTGTCTTTG	63
CLDN3 (NM_001306)	For: CTGCTCTGCTGCTCGTGTC Rev: CGTAGTCCTTGC GGTCGTAG	62.5
CLDN4 (NM_001305)	For: GTCTGCCTGCATCTCCTCTGT Rev: CCTCTAAACCCGTCCATCCA	62.5
ZO 1 (NM_002538)	For: TTGGATAAAGAATTGGATGACT Rev: ACTGCTTGCAATGATTCTTCT	55.8
OCLN (NT_010194.17)	For: GAATGATGGTTGGTATGGTGCG Rev: TCAGAAGTGTGTCTACTGTCCG	57
E-kadherin (NM_004360.5)	For: CTGAGAACGAGGCTAACG Rev: GGAGCAGCAGGATCAGAATC	64.3

Tabela 11. Sekvence prajmera za mišje gene korišćene u radu

Gen (pristupni broj)	Sekvenca (5'-3')	Tm (°C)
CLDN1 (NM_016674.4)	F: TCTACGAGGGACTGTGGATG R: TCAGATTCAGCTAGGAGTCG	57
CLDN2 (NM_016675.4)	F: GGCTGTTAGGCTCATCCAT R: TGGCACCAACATAGGAACTC	55
CLDN3 (NM_009902.4)	F: AAGCCGAATGGACAAAGAA R: CTGGCAAGTAGCTGCAGTG	58.7
CLDN4 (NM_009903.2)	F: CGCTACTCTTGCCATTACG R: CTGGCAAGTAGCTGCAGTG	55
OCLN (NM_008756.2)	F: ATGTCCGGCCGATGCTCTC R: TTTGGCTGCTCTTGGGTCTGTAT	61.2
ZO1 (NM_009386.2)	F: CGAGGCATCATCCCAAATAAGAAC R: TCCAGAAGTCTGCCCGATCAC	58.7
E-kadherin (NM_009864.2)	F: ACTGTGAAGGGACGGTCAAC R: GGAGCAGCAGGATCAGAATC	64.3
IL-33 (NM_001164724.1)	F: GGTGTGGATGGGAAGAAGCTG R: GAGGACTTTTTGTGAAGGACG	61
TSLP (NM_021367.2)	F: CGGATGGGGCTAACTTACA R: TCCTCGATTTGCTCGAACTT	61
IL-25 (NM_080729.3)	F: CAGCAAAGAGCAAGAACC R: CCCTGTCCAACACTCATAGC	61
ACTB (NM_007393.3)	F: ATGCTCCCCGGGCTGTAT R: CATAGGAGTCCTTCTGACCCATTC	61

7.9. Rad sa životinjskim model sistemom

U radu je korišćen soj miševa C57BL/6 starosti 5-8 nedelja (Charls River, France). Miševi su uzgajani u specifičnim uslovima propisanim za uzgoj životinja. Temperatura za uzgoj životinja je bila 23 °C sa relativnom vlažnošću vazduha od 50-55 % i ciklusu dan/noć od 12 h. Pijaća voda i standardna laboratorijska hrana su obezbeđivana *ad libitum*. Životinje su gajene u ustanovi za negu životinja Univerziteta u Utrehtu. Eksperimenti su urađeni pod rukovodstvom stručnog i licenciranog lica za rad sa laboratorijskim životinjama a odobreni su od strane Komiteta za eksperimente na životinjama Univerziteta u Utrehtu Kraljevine Holandije (dozvola za rad na životinjskim eksperimentalnim modelima je izdata 15. marta 2016. godine sa rokom važenja do 1. marta 2021. godine, pod brojem AVD108002016394).

U ovoj disertaciji su korišćene po tri grupe životinja (6 životinja po grupi) za dva tipa različitih eksperimenata: efekta aktinidina na integritet epitelne barijere i na ekspresiju iRNK za proteine čvrstih veza i proalergene citokine.

Kontrolna grupa miševa je oralnom administracijom primila PBS, dok je jedna grupa primila aktiviranu formu aktinidina a druga inhibiranu sa inhibitorom cistein proteaza.

7.9.1. Ispitivanje permeabilnosti intestinalnog trakta

Kontrolna grupa (n= 6) životinja je oralnom administracijom primila 350 µL PBS sa 0.2 mM L-cisteinom. Druga grupa (n= 6) je primila aktivirani aktinidin 350 µL (5 mg/mL u PBS-u) a treća (n= 6) inaktivirani aktinidin 350 µL (5 mg/mL u PBS-u). Nakon 24 h sve grupe životinja su oralnom administracijom primile BLG. 30 minuta nakon toga je svakoj životinji uzeta krv (~150 µL) iz vene sa obraza koja je, potom, centrifugirana (3000 g x 10 minuta) i serum sačuvan za ELISA analizu BLG.

7.9.2. *In vivo* ekspresija iRNK proteina čvrstih veza

Za anaizu ekspresije gena za proteine čvrstih veza i proalergenog citokina IL-33, najpre je mišji intestinum ispran PBS-om. Nakon toga je podeljen u različite segmente: proksimalni (prvi centimetar proksimalnog dela jejunuma, 2 cm nakon želuca), distalni deo (poslednji centimetar pre ileum-cekum-kolon veze) i kolon. Uzorci intestinalnog tkiva su zamrznuti u tečnom azotu i čuvani na -80 °C do izolovanja RNK. Pre samog izolovanja, najpre je uzeto po 50 mg od svakog tkiva i dodat je TRI reagens. Tkiva su, zatim, homogenizovana uređajem za homogenizaciju tkiva (*Qiagen*, Hilden, Germany) u trajanju od 1 minuta na 25 Hz. Nakon toga je RNK izolovana po protokolu opisanom u delu za izolovanje RNK iz humanih ćelija.

7.9.3. Uzgajanje 2D organoida iz intestinalnih ćelija miša

Material i reagensi:

-mišji ileum

- Rat tail collagen I: IBIDI 50203 5 mg/mL. Pufer za kolagen se dodaje nesposredno pre upotrebe

- pufer za kolagen
- ploče sa 24 bunara za uzgoj organoida
- specifičan 2D medijum

Za pripremu medijuma za uzgajanje organoida koristi se sledeća receptura:

Najpre se priprema osnovni medijum:

- 500 mL DMEM F12 + glutamax, Gibco 31331
- 5 mL PenStrep, Gibco 15070
- 5 mL Na-piruvata, Gibco 11360
- 5 mL HEPES, Gibco 15630
- 5 mL MEM NEA, Gibco 11140

A zatim i medijum za organoide (200 mL):

- 130 mL osnovnog medijuma
- 20 mL FBS
- 24 mL R-spondin-1
- 24 mL WNT

2D medijum: 200 mL Organoid medijum + dodatni sastojci

Postupak:

Najpre je u bunare dodat kolagen: 360 μ L i 240 μ L pufera za kolagen (finalna koncentracija kolagena 3 mg/mL). Tokom ovog koraka je važno voditi računa da pipetiranje ne stvori mehuriće. Zatim se prati sledeća procedura:

- Tubu od 15 mL za kulturu organoida stavljena je na led
- Medijum je aspiriran iz bunara u kojima su organoidi gajeni i organoidi su, zatim, prebačeni u tubu
- Bunari u kojima su organoidi gajeni isprani su kako bi se sakupili i eventualni ostaci Matrigel-a.
- Centrifugirani su 5 minuta na 1200 rpm

- Po sakupljanju organoida aspirirano je što više medijuma bez uzurpiranja organoida

Zasejavanje organoida:

- Željena količina organoida pažljivo je resuspendovana u medijumu za uzgajanje
- Zasejano je 1.5 mL po bunaru (za pločice sa 24 bunara) ili 1 mL (za pločice sa 48 bunara)
- Organoidi su gajeni u inkubatoru na 37°C 3-4 dana do dobijanja monosloja

7.10. Statistička obrada podataka

Svi rezultati su dobijeni izvođenjem najmanje tri nezavisna eksperimenta, a srednje vrednosti sa standardnom devijacijom izračunate pomoću programa Microsoft Office Excel 2007. Sve slike su reprezentativni primeri su dobijeni izvođenjem tri nezavisna eksperimenta, obrađene su i pripremane na isti način pomoću programa Adobe Photoshop V9.0. Program GraphPad Prism verzija 5.0 (*GraphPad*, La Jolla, CA, USA) je korišćen za poređenje srednjih vrednosti pomoću analize varijanse (ANOVA). U slučaju pronađene statistički značajne razlike među poređenim vrednostima, po potrebi je dodatno primenjivana Bonferonijeva metoda da bi se omogućilo određivanje tačnih vrednosti za višestruka poređenja. Razlika u rezultatima je smatrana statistički značajnom ukoliko je $p < 0.05$. *P*-vrednosti za svaku analizu su navedene ispod slika.

8. Literatura

1. J. Savage CBJ. Food allergy: epidemiology and natural history. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2015;35:45–59.
2. Chen C, Sun N, Li Y, Jia X. A BALB/c mouse model for assessing the potential allergenicity of proteins: Comparison of allergen dose, sensitization frequency, timepoint and sex. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2013;62:41–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.004>
3. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy : A review and update on epidemiology , pathogenesis , diagnosis , prevention , and management. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2018;141(1):41–58. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.11.003>
4. Knippels LMJ, Penninks AH. Assessment of the allergic potential of food protein extracts and proteins on oral application using the Brown Norway rat model. *Environ Health Perspect.* 2003;111(2):233–8.
5. Divekar R, Kita H. Recent advances in epithelium-derived cytokines (IL-33, IL-25, and thymic stromal lymphopoietin) and allergic inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2015;15(1):98–103.
6. Yu W, Freeland DMH, Nadeau KC. Food allergy: Immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(12):751–65.
7. Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2017;11(9):821–34. Available from: <https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1343143>
8. Renz H, Allen KJ, Sicherer SH, Sampson HA, Lack G, Beyer K, et al. Food allergy. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2018 Jan 4;4:17098. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.98>
9. Perrier C, Corthésy B. Gut permeability and food allergies. *Clin Exp Allergy.* 2011;41(1):20–8.
10. Popović M, Grozdanović M, Gavrović-Jankulović M. Kiwifruit as a food allergen source. *J Serbian Chem Soc.* 2013;78(3):333–52.
11. Uberti F, Peñas E, Manzoni Y, di Lorenzo C, Ballabio C, Fiocchi A, et al. Molecular characterization of allergens in raw and processed kiwifruit. *Pediatr Allergy Immunol.* 2015;26(2):139–44.
12. Boland M. Kiwifruit Proteins and Enzymes. Actinidin and Other Significant Proteins. [Internet]. 1st ed. Vol. 68, *Advances in Food and Nutrition Research.* Elsevier Inc.; 2013. 59–80 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394294-4.00004-3>
13. Le TM, Bublin M, Breiteneder H, Fernández-Rivas M, Asero R, Ballmer-Weber B, et al. Kiwifruit allergy across Europe: Clinical manifestation and IgE

- recognition patterns to kiwifruit allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(1):164–71.
14. Moreno Álvarez A, Sexto L, Bardina L, Grishina G, Sampson H. Kiwifruit Allergy in Children: Characterization of Main Allergens and Patterns of Recognition. *Children*. 2015;2(4):424–38.
 15. Chalabi M, Khademi F, Yarani R, Mostafaie A. Proteolytic activities of kiwifruit actinidin (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) on different fibrous and globular proteins: a comparative study of actinidin with papain. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014 Apr;172(8):4025–37.
 16. Grozdanovic M, Ostojic S, Aleksic I, Andjelkovic U, Petersen A, Gavrovic-Jankulovic M. Active actinidin retains function upon gastro-intestinal digestion and is more thermostable than the E-64-inhibited counterpart. *J Sci Food Agric*. 2014;94(14):3046–52.
 17. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2009;9(11):799–809. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2653>
 18. Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier : a fundamental role in health and disease. *Eur PMC Funders Author Manuscripts*. 2018;11(9):821–34.
 19. Berin MC, Shreffler WG. Mechanisms Underlying Induction of Tolerance to Foods. *Immunol Allergy Clin North Am* [Internet]. 2016;36(1):87–102. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.iac.2015.08.002>
 20. Nagler-Anderson C. Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. *Nat Rev Immunol*. 2001 Oct;1(1):59–67.
 21. Johansson ME V, Ambort D, Pelaseyed T, Schütte A, Gustafsson JK, Ermund A, et al. Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(22):3635–41.
 22. Samadi N, Klems M, Untersmayr E. The role of gastrointestinal permeability in food allergy. *Ann Allergy, Asthma Immunol* [Internet]. 2018;121(2):168–73. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.anai.2018.05.010>
 23. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2014 Feb 25;14:141. Available from: <https://doi.org/10.1038/nri3608>
 24. Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2011;9(5):356–68. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2546>
 25. Schimmack S, Svejda B, Lawrence B, Kidd M, Modlin IM. The diversity and commonalities of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Langenbeck's Arch Surg*. 2011;396(3):273–98.
 26. Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2010;10(2):131–44. Available from: <https://doi.org/10.1038/nri2707>

27. Broquet AH, Hirata Y, McAllister CS, Kagnoff MF. RIG-I/MDA5/MAVS Are Required To Signal a Protective IFN Response in Rotavirus-Infected Intestinal Epithelium. *J Immunol* [Internet]. 2011 Feb 1;186(3):1618 LP – 1626. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/186/3/1618.abstract>
28. Chen GY, Núñez G. Inflammasomes in Intestinal Inflammation and Cancer. *Gastroenterology* [Internet]. 2011 Dec 1 [cited 2019 Oct 1];141(6):1986–99. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016508511013795>
29. Vaishnava S, Yamamoto M, Severson KM, Ruhn KA, Yu X, Koren O, et al. The Antibacterial Lectin RegIII α Promotes the Spatial Segregation of Microbiota and Host in the Intestine. *Science* (80-) [Internet]. 2011 Oct 14;334(6053):255 LP – 258. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/334/6053/255.abstract>
30. Tomasello E, Bedoui S. Intestinal innate immune cells in gut homeostasis and immunosurveillance. *Immunol Cell Biol* [Internet]. 2013 Mar 1;91(3):201–3. Available from: <https://doi.org/10.1038/icb.2012.85>
31. Persson EK, Scott CL, Mowat AM, Agace WW. Dendritic cell subsets in the intestinal lamina propria: ontogeny and function. *Eur J Immunol*. 2013 Dec;43(12):3098–107.
32. Pabst O, Mowat AM. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2012;5(3):232–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/mi.2012.4>
33. Ruth MR, Field CJ. The immune modifying effects of amino acids on gut-associated lymphoid tissue. *J Anim Sci Biotechnol*. 2013;4(1):1.
34. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*. 2003 Apr;3(4):331–41.
35. Vivier E, Spits H, Cupedo T. Interleukin-22-producing innate immune cells: new players in mucosal immunity and tissue repair? *Nat Rev Immunol*. 2009 Apr;9(4):229–34.
36. Liu Z, Li N, Neu J. Tight junctions, leaky intestines, and pediatric diseases. *Acta Paediatr Int J Paediatr*. 2005;94(4):386–93.
37. Turner JR. Molecular basis of epithelial barrier regulation: From basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol* [Internet]. 2006;169(6):1901–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2006.060681>
38. Lee SH. Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases. *Intest Res*. 2015;13(1):11.
39. Van Itallie CM, Anderson JM. Claudins and Epithelial Paracellular Transport. *Annu Rev Physiol*. 2005;68(1):403–29.
40. Choi W, Yeruva S, Turner JR. Contributions of intestinal epithelial barriers to health and disease. *Exp Cell Res* [Internet]. 2017;358(1):71–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.036>

41. Van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(23):3756–88.
42. Leckband D, Prakasam A. Mechanism and dynamics of cadherin adhesion. *Annu Rev Biomed Eng*. 2006;8:259–87.
43. Pokutta S, Weis WI. Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:237–61.
44. van Oosterhout AJM, Nawijn MC, Heijink IH, Hackett TL, Postma DS. E-cadherin: gatekeeper of airway mucosa and allergic sensitization. *Trends Immunol*. 2011;32(6):248–55.
45. Furuse M, Fujimoto K, Sato N, Hirase T, Tsukita S. Overexpression of occludin, a tight junction-associated integral membrane protein, induces the formation of intracellular multilamellar bodies bearing tight junction-like structures. *J Cell Sci* [Internet]. 1996;109:429–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8838666>
46. Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. Vol. 70, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2013. p. 631–59.
47. Barmeyer C, Schulzke JD, Fromm M. Claudin-related intestinal diseases. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2015;42:30–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.05.006>
48. Krause G, Winkler L, Piehl C, Blasig I, Piontek J, Muller SL. Structure and function of extracellular claudin domains. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 May;1165:34–43.
49. González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol*. 2003;81(1):1–44.
50. Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H, Williams IR, Mahajan A. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2013;6(4):666–77. Available from: <https://doi.org/10.1038/mi.2013.30>
51. Zihni C, Mills C, Matter K, Balda MS. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2016 Jun 29;17:564. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.80>
52. Castro-Sánchez P, Martín-Villa JM. Gut immune system and oral tolerance. *Br J Nutr*. 2013;109(SUPPL. 2):3–11.
53. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2009;124(1):3–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2009.05.038>
54. Yamamoto T, Kojima T, Murata M, Takano K, Go M, Chiba H, et al. IL-1 β regulates expression of Cx32, occludin, and claudin-2 of rat hepatocytes via distinct signal transduction pathways. *Exp Cell Res* [Internet]. 2004 Oct 1 [cited 2019 Oct 4];299(2):427–41. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014482704003362>

55. Suzuki T, Yoshinaga N, Tanabe S. Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. *J Biol Chem.* 2011;286(36):31263–71.
56. König J, Wells J, Cani PD, García-Ródenas CL, MacDonald T, Mercenier A, et al. Human intestinal barrier function in health and disease. *Clin Transl Gastroenterol.* 2016;7(10).
57. Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70:631–59.
58. Al-Sadi RM, Ma TY. IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol.* 2007 Apr;178(7):4641–9.
59. Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, Akotia V, Pedram A, Boivin MA, et al. TNF- α -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF- κ B activation TNF- α -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF- κ B activation. *Am J Physiol.* 2011;0001:367–76.
60. Mankertz J, Amasheh M, Krug SM, Fromm A, Amasheh S, Hillenbrand B, et al. TNF α up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Cell Tissue Res.* 2009;336(1):67–77.
61. Reinecker HC, Steffen M, Witthoef T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP, et al. Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol.* 1993 Oct;94(1):174–81.
62. Al-Sadi R, Ye D, Said HM, Ma TY. IL-1 β -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by MEKK-1 activation of canonical NF- κ B pathway. *Am J Pathol* [Internet]. 2010;177(5):2310–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2010.100371>
63. Kusugami K, Fukatsu A, Tanimoto M, Shinoda M, Haruta JI, Kuroiwa A, et al. Elevation of interleukin-6 in inflammatory bowel disease is macrophage- and epithelial cell-dependent. *Dig Dis Sci.* 1995;40(5):949–59.
64. Weber CR, Nalle SC, Tretiakova M, Rubin DT, Turner JR. Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. *Lab Invest.* 2008 Oct;88(10):1110–20.
65. Wells HG, Osborne TB. The Biological Reactions of the Vegetable Proteins. *J Infect Dis* [Internet]. 1911;8(1):66–124. Available from: <http://www.jstor.org/stable/30073318>
66. Nowak-Wegrzyn A, Szajewska H, Lack G. Food allergy and the gut. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14(4):241–57.
67. Mazzini E, Massimiliano L, Penna G, Rescigno M. Oral tolerance can be established via gap junction transfer of fed antigens from CX3CR1(+) macrophages to CD103(+) dendritic cells. *Immunity.* 2014 Feb;40(2):248–61.
68. Schulz O, Jaensson E, Persson EK, Liu X, Worbs T, Agace WW, et al. Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve

- classical dendritic cell functions. *J Exp Med*. 2009 Dec;206(13):3101–14.
69. Coombes JL, Siddiqui KRR, Arancibia-Carcamo C V, Hall J, Sun C-M, Belkaid Y, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med*. 2007 Aug;204(8):1757–64.
 70. Sun C-M, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, et al. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med*. 2007 Aug;204(8):1775–85.
 71. Cassani B, Villablanca EJ, Quintana FJ, Love PE, Lacy-Hulbert A, Blaner WS, et al. Gut-Tropic T Cells That Express Integrin $\alpha 4\beta 7$ and CCR9 Are Required for Induction of Oral Immune Tolerance in Mice. *Gastroenterology* [Internet]. 2011 Dec 1;141(6):2109–18. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.09.015>
 72. Hansmann L, Schmidl C, Kett J, Steger L, Andreesen R, Hoffmann P, et al. Dominant Th2 Differentiation of Human Regulatory T Cells upon Loss of FOXP3 Expression. *J Immunol* [Internet]. 2012 Feb 1;188(3):1275 LP – 1282. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/188/3/1275.abstract>
 73. Johnston LK, Chien KB, Bryce PJ. The Immunology of Food Allergy. *J Immunol*. 2014;192(6):2529–34.
 74. Toit G Du, Sampson HA, Plaut M, Burks AW, Akdis CA, Lack G. Food allergy : Update on prevention and tolerance. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2017;141(1):30–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.11.010>
 75. Hussain M, Borcard L, Walsh KP, Pena Rodriguez M, Mueller C, Kim BS, et al. Basophil-derived IL-4 promotes epicutaneous antigen sensitization concomitant with the development of food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(1):223-234.e5.
 76. Galand C, Leyva-Castillo JM, Yoon J, Han A, Lee MS, McKenzie ANJ, et al. IL-33 promotes food anaphylaxis in epicutaneously sensitized mice by targeting mast cells. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2016;138(5):1356–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.03.056>
 77. Oyoshi MK, Oettgen HC, Chatila TA, Geha RS, Bryce PJ. Food allergy: Insights into etiology, prevention, and treatment provided by murine models. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2014 Feb 1 [cited 2019 Sep 30];133(2):309–17. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674913029655>
 78. Galipeau HJ, Verdu EF. The complex task of measuring intestinal permeability in basic and clinical science. *Neurogastroenterol Motil*. 2016 Jul;28(7):957–65.
 79. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke J-D, Serino M, et al. Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol* [Internet]. 2014 Nov 18;14:189. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25407511>
 80. Grootjans J, Thuijls G, Verdam F, Derikx JP, Lenaerts K, Buurman WA. Non-

- invasive assessment of barrier integrity and function of the human gut. *World J Gastrointest Surg* [Internet]. 2010 Mar 27;2(3):61–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21160852>
81. Wells JM, Brummer RJ, Derrien M, MacDonald TT, Troost F, Cani PD, et al. Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2017 Mar;312(3):G171–93.
 82. Menard S, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunol*. 2010 May;3(3):247–59.
 83. Steelant B, Farré R, Wawrzyniak P, Belmans J, Dekimpe E, Vanheel H, et al. Impaired barrier function in patients with house dust mite-induced allergic rhinitis is accompanied by decreased occludin and zonula occludens-1 expression. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(4):1043-1053.e5.
 84. Farre R, Vicario M. Abnormal Barrier Function in Gastrointestinal Disorders. *Handb Exp Pharmacol*. 2017;239:193–217.
 85. Stappaerts J, Brouwers J, Annaert P, Augustijns P. In situ perfusion in rodents to explore intestinal drug absorption: challenges and opportunities. *Int J Pharm*. 2015 Jan;478(2):665–81.
 86. USSING HH, ZERAHN K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand*. 1951 Aug;23(2–3):110–27.
 87. Moreno FJ, Rubio LA, Olano A, Clemente A. Uptake of 2S albumin allergens, Ber e 1 and Ses i 1, across human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *J Agric Food Chem*. 2006;54(22):8631–9.
 88. Bodinier M, Legoux M-A, Pineau F, Triballeau S, Segain J-P, Brossard C, et al. Intestinal Translocation Capabilities of Wheat Allergens Using the Caco-2 Cell Line. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2007 May 1;55(11):4576–83. Available from: <https://doi.org/10.1021/jf070187e>
 89. Gavrovic-Jankulovic M, Willemsen LEM. Epithelial models to study food allergen-induced barrier disruption and immune activation. *Drug Discov Today Dis Model* [Internet]. 2015;17–18:29–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ddmod.2016.09.002>
 90. Huch M, Koo B-K. Modeling mouse and human development using organoid cultures. *Development* [Internet]. 2015 Sep 15;142(18):3113 LP – 3125. Available from: <http://dev.biologists.org/content/142/18/3113.abstract>
 91. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. 2009;459(7244):262–5.
 92. Sala FG, Matthews JA, Speer AL, Torashima Y, Barthel ER, Grikscheit TC. A multicellular approach forms a significant amount of tissue-engineered small intestine in the mouse. *Tissue Eng - Part A*. 2011;17(13–14):1841–50.

93. Sanderson IR. The physicochemical environment of the neonatal intestine. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 1999 May 1;69(5):1028s-1034s. Available from: <https://doi.org/10.1093/ajcn/69.5.1028s>
94. Qian Y, Fu L, Xie M, Wang Y, Wang C, Huang J, et al. Application of in vitro and in vivo models in the study of food allergy. *Food Sci Hum Wellness* [Internet]. 2018;7(4):235–43. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2018.10.002>
95. Kool M, Willart MAM, van Nimwegen M, Bergen I, Pouliot P, Virchow JC, et al. An unexpected role for uric acid as an inducer of T helper 2 cell immunity to inhaled antigens and inflammatory mediator of allergic asthma. *Immunity*. 2011 Apr;34(4):527–40.
96. Sampson HA. Anaphylaxis and emergency treatment. *Pediatrics*. 2003;111(6 III):1601–8.
97. Boye JI. Food allergies in developing and emerging economies: need for comprehensive data on prevalence rates. *Clin Transl Allergy* [Internet]. 2012 Dec 20;2(1):25. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23256652>
98. Hofmann A, Burks AW. Pollen food syndrome: update on the allergens. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2008 Sep;8(5):413–7.
99. Asero R. Effects of birch pollen-specific immunotherapy on apple allergy in birch pollen-hypersensitive patients. *Clin Exp Allergy*. 1998 Nov;28(11):1368–73.
100. Rothenberg ME. Eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID). *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Jan;113(1):11–28; quiz 29.
101. Kumar S, Verma AK, Das M, Dwivedi PD. Molecular mechanisms of IgE mediated food allergy. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2012 Aug 1 [cited 2019 Sep 30];13(4):432–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576912001567?via%3Dihub>
102. Blázquez AB, Berin MC. Gastrointestinal Dendritic Cells Promote Th2 Skewing via OX40L. *J Immunol* [Internet]. 2008 Apr 1;180(7):4441 LP – 4450. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/180/7/4441.abstract>
103. Yu LC, Yang PC, Berin MC, Di Leo V, Conrad DH, McKay DM, et al. Enhanced transepithelial antigen transport in intestine of allergic mice is mediated by IgE/CD23 and regulated by interleukin-4. *Gastroenterology*. 2001 Aug;121(2):370–81.
104. Yu LC-H. Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction in Food Hypersensitivity. *J Allergy*. 2011;2012:1–11.
105. Hussain M, Epstein MM, Noti M. Experimental food allergy models to study the role of innate immune cells as initiators of allergen-specific Th2 immune responses. *Drug Discov Today Dis Model* [Internet]. 2015;17–18:55–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ddmod.2016.08.001>
106. Wambre E, Bajzik V, DeLong JH, O'Brien K, Nguyen QA, Speake C, et al. A phenotypically and functionally distinct human TH2 cell subpopulation is

- associated with allergic disorders. *Sci Transl Med*. 2017;9(401).
107. Broide DH. Molecular and cellular mechanisms of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Aug;108(2 Suppl):S65-71.
 108. Gilfillan AM, Rivera J. The tyrosine kinase network regulating mast cell activation. *Immunol Rev* [Internet]. 2009 Mar;228(1):149–69. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19290926>
 109. Sampson HA, O'Mahony L, Burks AW, Plaut M, Lack G, Akdis CA. Mechanisms of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2018;141(1):11–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.11.005>
 110. Sampson HA. Food allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103(5):717–28.
 111. Sicherer SH, Sampson HA, York N. Food allergy Abbreviations used OFC: Oral food challenge OIT: Oral immunotherapy SPT: Skin prick test S116. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 125(2):S116–25. Available from: [https://www.jacionline.org/article/S0091-6749\(09\)01270-6/pdf](https://www.jacionline.org/article/S0091-6749(09)01270-6/pdf)
 112. Renz H, Allen KJ, Sicherer SH, Sampson HA, Lack G, Beyer K, et al. Food allergy. Vol. 4, *Nature Reviews Disease Primers*. 2018.
 113. Schiavi E, Smolinska S, O'mahony L. Intestinal dendritic cells. *Curr Opin Gastroenterol*. 2015;31(2):98–103.
 114. Muehling LM, Lawrence MG, Woodfolk JA. Pathogenic CD4+ T cells in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2019 Sep 30];140(6):1523–40. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674917304220>
 115. Noval Rivas M, Burton OT, Oettgen HC, Chatila T. IL-4 production by group 2 innate lymphoid cells promotes food allergy by blocking regulatory T-cell function. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2019 Sep 30];138(3):801-811.e9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674916300835>
 116. Sampson HA, O'Mahony L, Burks AW, Plaut M, Lack G, Akdis CA. Mechanisms of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2018;141(1):11–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.11.005>
 117. Jarvinen KM, Konstantinou GN, Pilapil M, Arrieta M-C, Noone S, Sampson HA, et al. Intestinal permeability in children with food allergy on specific elimination diets. *Pediatr Allergy Immunol*. 2013 Sep;24(6):589–95.
 118. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*. 2001 Apr;2(4):361–7.
 119. Rubas W, Grass GM. Gastrointestinal lymphatic absorption of peptides and proteins. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 1991;7(1):15–69. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0169409X9190047G>

120. Bevilacqua C, Montagnac G, Benmerah A, Candalh C, Brousse N, Cerf-Bensussan N, et al. Food allergens are protected from degradation during CD23-mediated transepithelial transport. *Int Arch Allergy Immunol.* 2004 Oct;135(2):108–16.
121. Shimizu M. Food-derived peptides and intestinal functions. *Biofactors.* 2004;21(1–4):43–7.
122. Shimizu M, Son DO. Food-derived peptides and intestinal functions. *Curr Pharm Des.* 2007;13(9):885–95.
123. Van Bilsen JHM, Sienkiewicz-Szłapka E, Lozano-Ojalvo D, Willemsen LEM, Antunes CM, Molina E, et al. Application of the adverse outcome pathway (AOP) concept to structure the available in vivo and in vitro mechanistic data for allergic sensitization to food proteins. *Clin Transl Allergy.* 2017;7(1):1–18.
124. Heyman M. Gut barrier dysfunction in food allergy. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2005 Dec;17(12):1279–85.
125. Hong JH, Lee S-I, Kim K-E, Yong T-S, Seo JT, Sohn MH, et al. German cockroach extract activates protease-activated receptor 2 in human airway epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 Feb;113(2):315–9.
126. Song C-H, Liu Z-Q, Huang S, Zheng P-Y, Yang P-C. Probiotics promote endocytic allergen degradation in gut epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Sep;426(1):135–40.
127. Tulic MK, Vivinus-Nébot M, Rekima A, Rabelo Medeiros S, Bonnart C, Shi H, et al. Presence of commensal house dust mite allergen in human gastrointestinal tract: a potential contributor to intestinal barrier dysfunction. *Gut [Internet].* 2016 May 1;65(5):757 LP – 766. Available from: <http://gut.bmj.com/content/65/5/757.abstract>
128. Grozdanovic M, Čavić M, Nešić A, Andjelković U, Akbari P, Smit JJ, et al. Kiwifruit cysteine protease actinidin compromises the intestinal barrier by disrupting tight junctions. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2016;1860(3):516–26.
129. Cavic M, Grozdanovic MM, Bajic A, Jankovic R, Andjus PR, Gavrovic-Jankulovic M. The effect of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) cysteine protease actinidin on the occludin tight junction network in T84 intestinal epithelial cells. *Food Chem Toxicol.* 2014;72:61–8.
130. Lorkowski G. Gastrointestinal absorption and biological activities of serine and cysteine proteases of animal and plant origin: review on absorption of serine and cysteine proteases. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2012;4(1):10–27.
131. Runswick S, Mitchell T, Davies P, Robinson C, Garrod DR. Pollen proteolytic enzymes degrade tight junctions. *Respirology.* 2007;12(6):834–42.
132. Brandt EB, Mingler MK, Stevenson MD, Wang N, Khurana Hershey GK, Whitsett JA, et al. Surfactant protein D alters allergic lung responses in mice and human subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 May;121(5):1140–1147.e2.
133. Gregory LG, Lloyd CM. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the

- lung. *Trends Immunol.* 2011 Sep;32(9):402–11.
134. Ather JL, Hodgkins SR, Janssen-Heininger YMW, Poynter ME. Airway epithelial NF-kB activation promotes allergic sensitization to an innocuous inhaled antigen. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;44(5):631–8.
 135. Hartwig C, Tschernig T, Mazzega M, Braun A, Neumann D. Endogenous IL-18 in experimentally induced asthma affects cytokine serum levels but is irrelevant for clinical symptoms. *Cytokine.* 2008 Jun;42(3):298–305.
 136. Tordesillas L, Gómez-Casado C, Garrido-Arandia M, Murua-García A, Palacín A, Varela J, et al. Transport of Prp 3 across gastrointestinal epithelium - an essential step towards the induction of food allergy? *Clin Exp Allergy.* 2013;43(12):1374–83.
 137. Saluja R, Khan M, Church MK, Maurer M. The role of IL-33 and mast cells in allergy and inflammation. *Clin Transl Allergy.* 2015;5:33.
 138. Cheng D, Han W, Chen SM, Sherrill TP, Chont M, Park G-Y, et al. Airway epithelium controls lung inflammation and injury through the NF-kappa B pathway. *J Immunol.* 2007 May;178(10):6504–13.
 139. Pantano C, Ather JL, Alcorn JF, Poynter ME, Brown AL, Guala AS, et al. Nuclear factor-kappaB activation in airway epithelium induces inflammation and hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008 May;177(9):959–69.
 140. Solanas G, Porta-de-la-Riva M, Agusti C, Casagolda D, Sanchez-Aguilera F, Larriba MJ, et al. E-cadherin controls beta-catenin and NF-kappaB transcriptional activity in mesenchymal gene expression. *J Cell Sci.* 2008 Jul;121(Pt 13):2224–34.
 141. Lucas JSA, Lewis SA, Trewin JB, Grimshaw KEC, Warner JO, Hourihane JOB. Comparison of the allergenicity of *Actinidia deliciosa* (kiwi fruit) and *Actinidia chinensis* (gold kiwi). *Pediatr Allergy Immunol.* 2005;16(8):647–54.
 142. Bublin M, Mari A, Ebner C, Knulst A, Scheiner O, Hoffmann-Sommergruber K, et al. IgE sensitization profiles toward green and gold kiwifruits differ among patients allergic to kiwifruit from 3 European countries. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114(5):1169–75.
 143. Fine AJ. Hypersensitivity reaction to kiwi fruit (Chinese gooseberry, *Actinidia chinensis*). *J Allergy Clin Immunol.* 1981;68(3):235–7.
 144. Cassano A, Figoli A, Tagarelli A, Sindona G, Drioli E. Integrated membrane process for the production of highly nutritional kiwifruit juice. *Desalination* [Internet]. 2006 Mar 1 [cited 2019 Oct 7];189(1–3):21–30. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0011916406000701>
 145. Bayer SB, Gearry RB, Drummond LN. Putative mechanisms of kiwifruit on maintenance of normal gastrointestinal function. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2018;58(14):2432–52. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1327841>
 146. Wang J, Vanga SK, McCusker C, Raghavan V. A Comprehensive Review on

- Kiwifruit Allergy: Pathogenesis, Diagnosis, Management, and Potential Modification of Allergens Through Processing. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2019;18(2):500–13.
147. Ballmer-Weber BK, Hoffmann-Sommergruber K. Molecular diagnosis of fruit and vegetable allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2011;11(3):229–35.
 148. Alemán A, Sastre J, Quirce S, De Las Heras M, Carnés J, Fernández-Caldas E, et al. Allergy to kiwi: A double-blind, placebo-controlled food challenge study in patients from a birch-free area. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(3):543–50.
 149. Lucas JSA, Grimshaw KEC, Collins K, Warner JO, Hourihane JOB. Kiwi fruit is a significant allergen and is associated with differing patterns of reactivity in children and adults. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(7):1115–21.
 150. Bublin M, Pfister M, Radauer C, Oberhuber C, Bulley S, Dewitt AM, et al. Component-resolved diagnosis of kiwifruit allergy with purified natural and recombinant kiwifruit allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Mar;125(3):687–94, 694.e1.
 151. Voitenko V, Poulsen LK, Nielsen L, Norgaard A, Bindslev-Jensen C, Skov PS. Allergenic properties of kiwi-fruit extract: cross-reactivity between kiwi-fruit and birch-pollen allergens. *Allergy*. 1997 Feb;52(2):136–43.
 152. Mills ENC, Mackie AR, Burney P, Beyer K, Frewer L, Madsen C, et al. The prevalence, cost and basis of food allergy across Europe. *Allergy*. 2007 Jul;62(7):717–22.
 153. Pastorello EA, Pravettoni V, Ispano M, Farioli L, Ansaloni R, Rotondo F, et al. Identification of the allergenic components of kiwi fruit and evaluation of their crossreactivity with timothy and birch pollens. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;98(3):601–10.
 154. Wang J, Vanga SK, Raghavan V. Effect of pre-harvest and post-harvest conditions on the fruit allergenicity: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017;59(7):1027–43.
 155. Lin J, Sampson HA. The role of immunoglobulin E-binding epitopes in the characterization of food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2009 Aug;9(4):357–63.
 156. Lee J-M, Jeon S-A, Lee S-Y. Clinical characteristics and diagnostic value of specific immunoglobulin E antibodies in children with kiwi fruit allergy. *Allergy Asthma Respir Dis* [Internet]. 2013 Mar;1(1):73–8. Available from: <http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.4168%2Faard.2013.1.1.73>
 157. Sakai Y, Ishihata K, Nakano S, Yamada T, Yano T, Uchida K, et al. Specific detection of banana residue in processed foods using polymerase chain reaction. *J Agric Food Chem*. 2010 Jul;58(14):8145–51.
 158. Sirvent S, Canto B, Gomez F, Blanca N, Cuesta-Herranz J, Canto G, et al. Detailed characterization of Act d 12 and Act d 13 from kiwi seeds: implication in IgE cross-reactivity with peanut and tree nuts. *Allergy*. 2014 Nov;69(11):1481–8.

159. Oberhuber C, Bulley SM, Ballmer-Weber BK, Bublin M, Gaier S, DeWitt AM, et al. Characterization of Bet v 1-related allergens from kiwifruit relevant for patients with combined kiwifruit and birch pollen allergy. *Mol Nutr Food Res*. 2008 Nov;52 Suppl 2:S230-40.
160. Pastorello EA, Conti A, Pravettoni V, Farioli L, Rivolta F, Ansaloni R, et al. Identification of actinidin as the major allergen of kiwi fruit. *J Allergy Clin Immunol*. 1998 Apr;101(4 Pt 1):531-7.
161. Gavrovic-Jankulovic M, Cirkovic T, Burazer L, Vuckovic O, Jankov RM. IgE cross-reactivity between meadow fescue pollen and kiwi fruit in patients' sera with sensitivity to both extracts. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2002;12(4):279-86.
162. Breiteneder H, Radauer C. A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 May;113(5):821-30; quiz 831.
163. Salcedo G, Sanchez-Monge R, Barber D, Diaz-Perales A. Plant non-specific lipid transfer proteins: an interface between plant defence and human allergy. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Jun;1771(6):781-91.
164. Bron IU, Jacomino AP. Ripening and quality of "Golden" papaya fruit harvested at different maturity stages . Vol. 18, *Brazilian Journal of Plant Physiology* . scielo ; 2006. p. 389-96.
165. Ciardiello MA, Giangrieco I, Tuppo L, Tamburrini M, Buccheri M, Palazzo P, et al. Influence of the natural ripening stage, cold storage, and ethylene treatment on the protein and IgE-binding profiles of green and gold kiwi fruit extracts. *J Agric Food Chem*. 2009 Feb;57(4):1565-71.
166. Brenna O V, Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Pompei C. Presence of allergenic proteins in different peach (*Prunus persica*) cultivars and dependence of their content on fruit ripening. *J Agric Food Chem*. 2004 Dec;52(26):7997-8000.
167. Schmitz-Eiberger M, Matthes A. Effect of harvest maturity, duration of storage and shelf life of apples on the allergen Mal d 1, polyphenoloxidase activity and polyphenol content. *Food Chem [Internet]*. 2011 Aug 15 [cited 2019 Oct 12];127(4):1459-64. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611002081>
168. Arcus AC. Proteolytic enzyme of *Actinidia chinensis*. *Biochim Biophys Acta [Internet]*. 1959 May 1 [cited 2019 Oct 8];33(1):242-4. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006300259905220>
169. McDowall MA. Anionic proteinase from *Actinidia chinensis*. Preparation and properties of the crystalline enzyme. *Eur J Biochem*. 1970 Jun;14(2):214-21.
170. Carne A, Moore CH. The amino acid sequence of the tryptic peptides from actinidin, a proteolytic enzyme from the fruit of *Actinidia chinensis*. *Biochem J [Internet]*. 1978 Jul 1;173(1):73-83. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/687380>
171. Baker EN. The structure of actinidin at 5.5 Å resolution. *J Mol Biol [Internet]*.

- 1976 Feb 25 [cited 2019 Oct 8];101(2):185–96. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283676903715>
172. Baker EN. Structure of actinidin: details of the polypeptide chain conformation and active site from an electron density map at 2-8 Å resolution. *J Mol Biol.* 1977 Sep;115(3):263–77.
 173. Baker EN. Structure of actinidin, after refinement at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol.* 1980 Aug;141(4):441–84.
 174. Baker EN, Dodson EJ. Crystallographic refinement of the structure of actinidin at 1.7 Å resolution by fast Fourier least-squares methods. *Acta Crystallogr Sect A* [Internet]. 1980 Jul 1;36(4):559–72. Available from:
<https://doi.org/10.1107/S0567739480001210>
 175. Baker EN, Boland MJ, Calder PC, Hardman MJ. The specificity of actinidin and its relationship to the structure of the enzyme. *Biochim Biophys Acta - Enzymol* [Internet]. 1980 Nov 6 [cited 2019 Oct 8];616(1):30–4. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0005274480902600>
 176. Nieuwenhuizen NJ, Maddumage R, Tsang GK, Fraser LG, Cooney JM, De Silva HN, et al. Mapping, Complementation, and Targets of the Cysteine Protease Actinidin in Kiwifruit. *Plant Physiol* [Internet]. 2012 Jan 1;158(1):376 LP – 388. Available from: <http://www.plantphysiol.org/content/158/1/376.abstract>
 177. Nishiyama I, Oota T. Varietal Difference in Actinidin Concentration and Protease Activity in the Kiwi fruit Juice. *Nippon SHOKUHIN KAGAKU KOGAKU KAISHI.* 2002;49(6):401–8.
 178. Podivinsky E, Forster RL, Gardner RC. Nucleotide sequence of actinidin, a kiwi fruit protease. *Nucleic Acids Res.* 1989 Oct;17(20):8363.
 179. Nieuwenhuizen NJ, Maddumage R, Tsang GK, Fraser LG, Cooney JM, Nihal de Silva H, et al. Mapping, complementation, and targets of the cysteine protease actinidin in kiwifruit. *Plant Physiol.* 2012;158(1):376–88.
 180. Aleman A, Sastre J, Quirce S, de las Heras M, Carnes J, Fernandez-Caldas E, et al. Allergy to kiwi: a double-blind, placebo-controlled food challenge study in patients from a birch-free area. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 Mar;113(3):543–50.
 181. Grozdanovic M, Popovic M, Polovic N, Burazer L, Vuckovic O, Atanaskovic-Markovic M, et al. Evaluation of IgE reactivity of active and thermally inactivated actinidin, a biomarker of kiwifruit allergy. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2012;50(3–4):1013–8. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.12.030>
 182. Kaur L, Rutherford SM, Moughan PJ, Drummond L, Boland MJ. Actinidin enhances gastric protein digestion as assessed using an in vitro gastric digestion model. *J Agric Food Chem.* 2010 Apr;58(8):5068–73.
 183. Rutherford Shane M, Montoya CA, Zou ML, Moughan PJ, Drummond LN, Boland MJ, Rutherford SM. Effect of actinidin from kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) on the digestion of food proteins determined in the growing rat.

- Food Chem. 2011;v. 129(4):1681-1689–2011 v.129 no.4.
184. Cavic M, Grozdanović M, Bajić A, Srđić-Rajić T, Anjus PR, Gavrović-Jankulović M. Actinidin, a protease from kiwifruit, induces changes in morphology and adhesion of T84 intestinal epithelial cells. *Phytochemistry*. 2012;77:46–52.
 185. Drapeau GR. [38] Protease from *Staphylococcus aureus*. *Methods Enzymol*. 1976;45(C):469–75.
 186. Grozdanovic MM, Čavić M, Nešić A, Andjelković U, Akbari P, Smit JJ, et al. Kiwifruit cysteine protease actinidin compromises the intestinal barrier by disrupting tight junctions. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2016;1860(3).
 187. Rescigno M. Dendritic cell-epithelial cell crosstalk in the gut. *Immunol Rev*. 2014;260(1):118–28.
 188. Grozdanovic MM, Milena Č, Ne A, Akbari P, Smit JJ, Gavrovi M. *Biochimica et Biophysica Acta* Kiwifruit cysteine protease actinidin compromises the intestinal barrier by disrupting tight junctions. 2016;1860:516–26.
 189. Stremnitzer C, Manzano-Szalai K, Willensdorfer A, Starkl P, Pieper M, König P, et al. Papain degrades tight junction proteins of human keratinocytes in vitro and sensitizes C57BL/6 mice via the skin independent of its enzymatic activity or TLR4 activation. *J Invest Dermatol*. 2015;135(7):1790–800.
 190. van der Wielen N, ten Klooster JP, Muckenschnabl S, Pieters R, Hendriks HF, Witkamp RF, et al. The Noncaloric Sweetener Rebaudioside A Stimulates Glucagon-Like Peptide 1 Release and Increases Enteroendocrine Cell Numbers in 2-Dimensional Mouse Organoids Derived from Different Locations of the Intestine. *J Nutr*. 2016;146(12):2429–35.
 191. Lu Z, Ding L, Lu Q, Chen Y-H. Claudins in intestines. *Tissue Barriers*. 2013;1(3):e24978.
 192. Lu Z, Chen Y-H. Claudin Distributions and Functions in Intestines. *Tissue Barriers*. 2013;13(1):1–14.
 193. Ebnet K. Junctional adhesion molecules (JAMs): Cell adhesion receptors with pleiotropic functions in cell physiology and development. *Physiol Rev*. 2017;97(4):1529–54.
 194. Shigetomi K, Ikenouchi J. Regulation of the epithelial barrier by post-translational modifications of tight junction membrane proteins. *J Biochem*. 2018;163(4):265–72.
 195. Tsukita S, Tanaka H, Tamura A. The Claudins: From Tight Junctions to Biological Systems. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2019;44(2):141–52. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.09.008>
 196. Tsukita S, Furuse M. Pores in the wall: Claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol*. 2000;149(1):13–6.
 197. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects

- epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* [Internet]. 2005;129(2):550–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16083712>
198. Liu X, Yang G, Geng XR, Cao Y, Li N, Ma L, et al. Microbial Products Induce Claudin-2 to Compromise Gut Epithelial Barrier Function. *PLoS One*. 2013;8(8).
 199. Turner JR. Molecular basis of epithelial barrier regulation: From basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol*. 2006;169(6):1901–9.
 200. Lee HJ, Kim B, Im NR, Lee DY, Kim HK, Lee SH, et al. Decreased expression of E-cadherin and ZO-1 in the nasal mucosa of patients with allergic rhinitis: Altered regulation of E-cadherin by IL-4, IL-5, and TNF-alpha. *Am J Rhinol Allergy*. 2016;30(3):173–8.
 201. Kauffman HF, Vellenga E, Heijink IH, Postma DS, Kies PM, van Oosterhout AJM. Down-Regulation of E-Cadherin in Human Bronchial Epithelial Cells Leads to Epidermal Growth Factor Receptor-Dependent Th2 Cell-Promoting Activity. *J Immunol*. 2014;178(12):7678–85.
 202. Tunggal JA, Helfrich I, Schmitz A, Schwarz H, Günzel D, Fromm M, et al. E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. *EMBO J*. 2005;24(6):1146–56.
 203. Annaházi A, Ferrier L, Bézirard V, Lévêque M, Eutamène H, Ait-Belgnaoui A, et al. Luminal cysteine-proteases degrade colonic tight junction structure and are responsible for abdominal pain in constipation-predominant IBS. *Am J Gastroenterol*. 2013;108(8):1322–31.
 204. Pizzuti D, Senzolo M, Buda A, Chiarelli S, Giacomelli L, Mazzon E, et al. In vitro model for IgE mediated food allergy. *Scand J Gastroenterol*. 2011;46(2):177–87.
 205. Salazar F, Ghaemmaghami AM. Allergen recognition by innate immune cells: Critical role of dendritic and epithelial cells. *Front Immunol*. 2013;4(NOV):1–10.
 206. Lambrecht BN, Hammad H. Allergens and the airway epithelium response: Gateway to allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2014;134(3):499–507. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2014.06.036>
 207. Bol-Schoenmakers M, Braber S, Akbari P, De Graaff P, Van Roest M, Kruijssen L, et al. The mycotoxin deoxynivalenol facilitates allergic sensitization to whey in mice. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2016;9(6):1477–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2016.13>
 208. Yu HS, Angkasekwinai P, Chang SH, Chung Y, Dong C. Protease allergens induce the expression of IL-25 via Erk and p38 MAPK pathway. *J Korean Med Sci*. 2010;25(6):829–34.
 209. Nikolić J, Nešić A, Čavić M, Đorđević N, Anđelković U, Atanasković-Marković M, et al. Effect of malondialdehyde on the ovalbumin structure and its interactions with T84 epithelial cells. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2017;1861(2).
 210. Starkl P, Krishnamurthy D, Szalai K, Felix F, Oberthuer D, Sampson H a, et al.

- Heating Affects Structure, Enterocyte Adsorption and Signalling, As Well as Immunogenicity of the Peanut Allergen Ara h 2. *Open Allergy J.* 2012;4:24–34.
211. Reche PA, Soumelis V, Gorman DM, Clifford T, Liu M, Travis M, et al. Human Thymic Stromal Lymphopoietin Preferentially Stimulates Myeloid Cells. *J Immunol.* 2001;167(1):336–43.
 212. Rusznak C, Sapsford RJ, Devalia JL, Shah SS, Hewitt EL, Lamont AG, et al. Interaction of cigarette smoke and house dust mite allergens on inflammatory mediator release from primary cultures of human bronchial epithelial cells. *Clin Exp Allergy.* 2001;31(2):226–38.
 213. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985 Oct;150(1):76–85.
 214. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug;227(5259):680–5.
 215. Doyle A G. *Cell and tissue culture for medical research.* Wiley&Sons; 2000. 5–11 p.
 216. Supino R. MTT Assays BT - In Vitro Toxicity Testing Protocols. In: O’Hare S, Atterwill CK, editors. Totowa, NJ: Humana Press; 1995. p. 137–49. Available from: <https://doi.org/10.1385/0-89603-282-5:137>

Biografija

Andrijana Nešić rođena je 22.09.1988. godine. u Nišu, Srbija. Osnovnu školu „Bata Bulić“ završila je u Petrovcu na Mlavi 2002. godine kao nosilac Vukove diplome. Gimnaziju opšteg smera završila je 2006. godine u (istom gradu, takođe, kao nosilac Vukove diplome). Diplomirala je na Hemijskom fakultetu 11.07.2013. godine sa prosečnom ocenom 8.45 i ocenom 10 na završnom radu pod naslovom „Proizvodnja Mus a 5, glavnog alergena banane, u *E. coli*“. Master akademske studije na studijskom programu Biohemija upisala je školske 2013/2014. godine, a završila 10.10.2014. godine sa prosečnom ocenom 9,8 i ocenom 10,00 za master rad. Tema diplomskog rada bila je „Kloniranje, ekspresija i prečišćavanje rekombinantnog Mus a 5, alergena banane, u *E. coli*“. Doktorske akademske studije na studijskom programu Biohemija upisala je školske 2014/2015. godine pri Katedri za biohemiju, Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Kandidat je položio sve planom i programom predviđene ispite na doktorskim akademskim studijama sa prosečnom ocenom 10,00. Tema doktorske disertacije pod nazivom „Efekti proteazne aktivnosti aktinidina na integritet ćelija intestinalnog epitela“ je prihvaćena od strane Nastavno –naučnog veća Hemijskog fakulteta, a zatim i Veća naučnih oblasti prirodnih nauka (31.01.2019.).

U periodu od 2014-2018. godine, Andrijana Nešić je na Hemijskom fakultetu angažovana kao saradnik u nastavi na kursevima: Molekularna biotehnologija (452V1), Bioinformatika (451V1), Proteinski terapeutici sa osnovama Bioinformatike (433V1), Patobiohemija (422V1) i Imunohemija (421V1).

Kandidat Andrijana Nešić bavi se naučno-istraživačkim radom u oblasti molekulske alergologije pri Katedri za biohemiju Hemijskog fakulteta u Beogradu. U dosadašnjem radu kandidatkinja je radila na proizvodnji rekombinantnih IgE vezujućih proteina u cilju unapređivanja dijagnostičkih reagenasa alergija na bananu. Tokom 2018. godine, u okviru COST Akcije 1402, Andrijana je provela mesec dana na Univerzitetu u Utrehtu (*Institute for Risk Assessment Sciences, Utrecht University*), gde se bavila ispitivanjem

mehanizama senzitivacije na alergen iz kivija, upotrebom *in vivo*, *in vitro* i *ex vivo* model sistema.

Andrijana je na Univerzitetnoj klinici (AKH) u Beču pohađala školu za rad na životinjskim model sistemima. (*ImpARAS, Animal Models Training School*). Tokom 2016. godine, u okviru COST Akcije 1402, Andrijana je provela tri meseca usavršavajući se za primenu tehnika proteomike u laboratoriji profesora dr Đura Josića, na katedri za Biotehnologiju Univerziteta u Rijeci. Kandidatkinja se tokom tromesečnog usavršavanja bavila identifikacijom fizioloških supstrata aktinidina, proteaze iz kivija, korišćenjem Caco-2 ćelija kao model sistema.

Iz ove disertacije su proistekle dve publikacije M21 kategorije a Andrijana do sada ima objavljena 4 rada. Rezultati iz ove disertacije su prezentovani na dva naučna skupa od nacionalnog značaja a Andrijana ima ukupno 7 saopštenja sa nacionalnih i internacionalnih skupova. U dosadašnjem naučno-istraživačkom radu, Andrijana je koautor jednog nacionalnog patenta.

Dobitnik je dve nagrade za prezentovane postere na konferenciji od međunarodnog i nacionalnog značaja.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Андријана Н. Нешић

Број индекса ДБ10/2014

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Ефекти протеазне активности актинидина на интегритет ћелија интестиналног епитела

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

У Београду, 27.11.2019.

Потпис аутора

Андријана Нешић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Андријана Н. Нешић

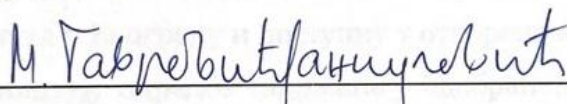
Број индекса ДБ10/2014

Студијски програм Доктор биохемијских наука

Наслов рада **Ефекти протеазне активности актинидина на
интегритет ћелија интестиналног епитела**

Ментор проф. Др Марија Гавровић-Јанкуловић

Потписани



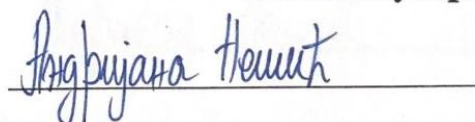
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.**

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.

Потпис аутора

У Београду, 27.11.2019.



Изјава о коришћењу

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

Ефекти протеазне активности актинидина на интегритет ћелија интестиналног епитела

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 27.11.2019.

Андријана Нешић

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

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

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