

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NATAŠA KRAMER

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NATAŠA KRAMER

**VREDNOTENJE PEPTIDNIH MIMOTOPOV GLAVNEGA
ALERGENA AMBROZIJE Amb a 1 IN GLAVNEGA
ALERGENA ČEBELJEGA STRUPA Api m 1**

**EVALUATION OF PEPTIDE MIMOTOPES OF MAJOR
RAGWEED ALLERGEN Amb a 1 AND MAJOR BEE
VENOM ALLERGEN Api m 1**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2017

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, pod mentorstvom izr. prof. dr. Mojce Lunder, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se izr. prof. dr. Mojci Lunder, mag. farm., za možnost izdelave diplomske naloge na Katedri za farmacevtsko biologijo. Zahvaljujem se ji za trud, usmerjanje in dobro voljo.

...

Iskrena hvala Abidi za potrpežljivost in pomoč v laboratoriju ter nasvete pri pisanju diplomske naloge.

...

Za vzpodbudo se zahvaljujem Aleni, Ani in sestri Sabini.

...

Posebno zahvalo namenjam svojim staršem, ki so mi študij finančno omogočili in mi tekom študija nudili vse, kar sem potrebovala.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno, pod vodstvom mentorice izr. prof. dr. Mojce Lunder, mag. farm.

Nataša Kramer

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Janez Mravljak, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Alenka Zvonar Pobirk, mag. farm.

KAZALO VSEBINE:

POVZETEK.....	IV
ABSTRACT.....	V
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VI
1 UVOD.....	1
1.1 Alergije.....	1
1.1.1 Alergija na ambrozijo.....	3
1.1.2 Alergija po piku žuželk.....	5
1.2 Zdravljenje alergijskih bolezni.....	7
1.3 Mimotopi.....	9
2 NAMEN DELA.....	11
3 MATERIALI IN METODE.....	12
3.1 MATERIALI.....	12
3.1.1 Reagenti.....	12
3.1.2 Pufri, raztopine in gojišča.....	12
3.1.3 Biološki material.....	14
3.1.4 Laboratorijska oprema.....	14
3.2 METODE.....	15
3.2.1 Pomnoževanje posameznih bakteriofagnih klonov.....	15
3.2.2 Določanje koncentracije bakteriofagnih klonov.....	16
3.2.3 Primerjava vezave peptidov, izraženih na bakteriofagih, na tarčna protitelesa s testom ELISA.....	16
3.2.4 Kompetitivni test ELISA z alergenom.....	19
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	20

4.1 Določanje koncentracije pomnoženih bakteriofagov.....	20
4.2 Primerjava vezave peptidov, izraženih na bakteriofagih, na tarčna protitelesa.....	22
4.2.1 Primerjava vezave potencialnih mimotopov Amb a 1 na tarčna protitelesa in preverjanje nespecifične vezave na ozadje.....	22
4.2.2 Primerjava vezave potencialnih mimotopov Api m 1 na tarčna protitelesa in preverjanje nespecifične vezave na ozadje.....	24
4.3 Preverjanje nespecifične vezave peptidov, izraženih na bakteriofagih, na konstantno (Fc) regijo protiteles.....	26
4.3.1 Preverjanje nespecifične vezave potencialnih mimotopov Amb a 1 na konstantno (Fc) regijo protiteles.....	26
4.3.2 Preverjanje nespecifične vezave potencialnih mimotopov Api m 1 na konstantno (Fc) regijo protiteles.....	27
4.4 Kompetitivni test ELISA z alergenom.....	28
4.4.1 Kompetitivni test ELISA z Amb a 1.....	28
4.4.2 Kompetitivni test ELISA z Api m 1.....	30
5 SKLEP.....	33
6 LITERATURA.....	34

KAZALO SLIK:

Slika 1: Možni načini izpostavitve alergenom in povzročene alergijske bolezni.....	2
Slika 2: Shematski prikaz izvedene metode ELISA.....	10
Slika 3: Grafični prikaz rezultatov semikvantitativnega testa ELISA za Amb a 1.....	23
Slika 4: Grafični prikaz rezultatov semikvantitativnega testa ELISA za Api m 1.....	24
Slika 5: Mikrotitrna ploščica po izvedenem testu ELISA.....	25

Slika 6: Grafični prikaz rezultatov testa ELISA za preverjanje specifičnosti interakcije s paratopi tarčnih protiteles anti Amb a 1.....	27
Slika 7: Grafični prikaz rezultatov testa ELISA za preverjanje specifičnosti interakcije s paratopi tarčnih protiteles anti Api m 1.....	28
Slika 8: Grafični prikaz rezultatov kompetitivnega testa ELISA z Amb a 1.....	29
Slika 9: Grafični prikaz rezultatov kompetitivnega testa ELISA z Api m 1.....	32

KAZALO PREGLEDNIC:

Preglednica I: Alergeni v cvetnem prahu pelinolistne ambrozije.....	4
Preglednica II: Znani alergeni čebeljega strupa.....	7
Preglednica III: Spektrofotometrično izmerjene absorbance, izračunane koncentracije bakteriofagnih klonov Amb a 1 ter njihove redčitve za pripravo končne koncentracije 10^{11} fagov/mL oz. 10^{10} fagov/vdolbinico (100 μ L), ki smo jo uporabili pri semikvantitativnem testu ELISA.....	20
Preglednica IV: Spektrofotometrično izmerjene absorbance, izračunane koncentracije bakteriofagnih klonov Api m 1 ter njihove redčitve za pripravo končne koncentracije 2×10^{10} fagov/mL oz. 2×10^9 fagov/vdolbinico (100 μ L), ki smo jo uporabili pri semikvantitativnem testu ELISA.....	21

POVZETEK

Alergijske bolezni sodijo med najpogostejše zdravstvene probleme razvitega sveta. Omenjeno bolezensko stanje je posledica neustreznega odziva imunskega sistema na snovi, ki so v okolju običajne in jih večina ljudi normalno prenaša. Najpomembnejše pri preprečevanju alergije je izogibanje alergenu, sicer pa se v praksi za zdravljenje uporabljajo različni pristopi. Edino vzročno terapijo alergijskih bolezni predstavlja specifična imunoterapija. Novejše raziskave se osredotočajo na imunoterapijo z rekombinantnimi alergeni in hipoalergenimi derivati alergenov, tudi na imunoterapijo s peptidi. Peptidne molekule, ki posnemajo fizikalno-kemijske lastnosti aminokislin, iz katerih je zgrajen epitop naravnega alergena, se imenujejo peptidni mimetiki oz. mimotopi. Njihova prednost je, da imajo sposobnost vezave na IgE pri bolnikih, vendar niso alergogeni.

V okviru raziskovalnega dela smo ovrednotili vezavo osemnajstih morebitnih peptidnih mimetikov glavnega alergena ambrozije Amb a 1 in tridesetih morebitnih peptidnih mimetikov glavnega alergena čebeljega strupa Api m 1. Za nosilni sistem smo uporabili bakteriofage - mimotopi so bili izraženi kot fuzijske beljakovine s plaščno beljakovino bakteriofaga M13. Bakteriofagne klonove smo uspešno pomnožili, jih očistili in jim določili koncentracijo, nato pa za vrednotenje njihove vezave uporabili metodo encimsko imunskega testa na trdnem nosilcu. Primerjali smo vezavo bakteriofagnih klonov na tarčna protitelesa ter preverili specifičnost interakcije na paratope tarčnih protiteles.

Glede na dobljene rezultate lahko rečemo, da nam je uspelo določiti dva potencialna mimotopa glavnega alergena ambrozije Amb a 1. V nasprotju z Amb a 1, rezultati poskusov za Api m 1 kažejo, da specifičnost do tarčnih protiteles izraža večina vrednotenih klonov s površinsko izraženimi peptidnimi mimetiki. Z izvedenimi testi nam je torej v obeh primerih uspelo dokazati, da določeni bakteriofagni kloni na svoji površini izražajo mimotope alergenov Amb a 1 oz. Api m 1.

KLJUČNE BESEDE

Alergija, ambrozija, čebelji strup, Amb a 1, Api m 1, imunoterapija, bakteriofag, mimotop

ABSTRACT

Allergic diseases are one of the most common health problems in the developed world. This condition is caused by an inadequate response of the immune system to substances in the environment, which are normally tolerated by most people. The most important measure in preventing an allergy is to avoid an allergen. However, different approaches are used in treatment of allergy diseases. The only causal treatment of allergic diseases is specific immunotherapy. Recent studies focus on immunotherapy with recombinant allergens and hypoallergenic derivatives of allergens, including immunotherapy with peptides. Peptide molecules that mimic the physicochemical properties of the amino acids forming the epitope of a natural allergen are called peptide mimetics or mimotopes. Their main advantage is ability to bind patients' IgE, but do not possess an allergic activity.

We evaluated the binding of eighteen potential peptide mimetics of the major ragweed allergen Amb a 1 and thirty potential peptide mimetics of the major bee venom allergen Api m 1. Bacteriophages were used as peptide carriers. Mimotopes were expressed as fusion proteins with major coat protein of bacteriophage M13. The bacteriophage clones were successfully multiplied, purified and their concentration was spectrophotometrically evaluated. The enzyme-linked immunoassay method on the solid carrier was used to evaluate their binding. We compared the binding of bacteriophage clones to target antibodies and checked the specificity of interaction with paratopes.

Based on the results obtained, we can conclude that we managed to determine two potential mimotopes of the major ragweed allergen Amb a 1. The results of Api m 1 experiments show that majority of evaluated clones with surface expressed peptide mimetics specifically bind to target antibodies. With these tests we were able to prove that some bacteriophage clones express the peptide mimetics of allergen Amb a 1 and Api m 1 on their surface.

KEY WORDS

Allergy, ragweed, bee venom, Amb a 1, Api m 1, immunotherapy, phage, mimotope

SEZNAM OKRAJŠAV

Amb a 1	glavni alergen ambrozije
Api m 1	glavni alergen čebeljega strupa
Art v 1	glavni alergen navadnega pelina
BSA	goveji serumski albumin (angl. bovine serum albumin)
dH ₂ O	destilirana voda
ELISA	encimsko-imunski test (angl. enzyme-linked immunosorbent assay)
Fc regija	konstantni del protitelesa
Fab fragment	variabilni del protitelesa
Fel d 1	glavni mačji alergen
LB	tekoče gojišče Lennox L Broth Base
MTP	mikrotitrna ploščica
PBS	fosfatni pufer s soljo (angl. phosphate buffer saline)
PEG	polietilen glikol
SCIT	podkožna (subkutana) specifična imunoterapija
sIgE	specifični imunoglobulini razreda E
SIT	specifična imunoterapija
SLIT	podjezična (sublingvalna) specifična imunoterapija
T	temperatura
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
V	volumen

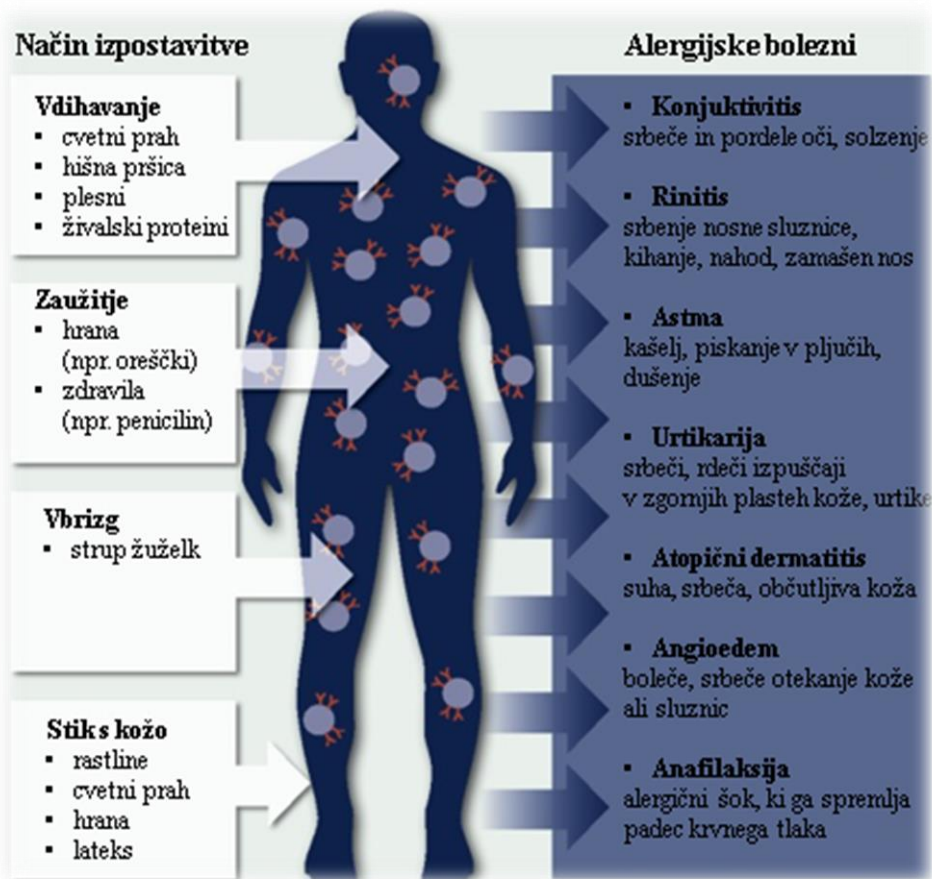
1 UVOD

1.1 ALERGIJE

Naš imunski sistem predstavlja kompleksen fiziološki sistem obrambe in vzdrževanja neokrnjenosti organizma. Gre za medsebojno funkcijsko povezan sistem celic, tkiv in organov, namenjen zaščiti pred patogeni in telesu tujimi snovmi. Njegovo nepravilno delovanje vodi v razvoj različnih bolezni, med drugim tudi alergij. Alergijske bolezni sodijo med najpogostejše zdravstvene probleme razvitega sveta [1]. Raziskovalci napovedujejo, da bo v naslednjih nekaj desetletjih za alergijo dovzetna več kot polovica evropskega prebivalstva [2].

Beseda alergija izhaja iz grškega jezika in pomeni reagirati drugače. Predstavlja bolezensko stanje, pri katerem telo ob stiku s sicer nenevarno snovjo pretirano reagira [3]. Gre torej za neustrezen odziv imunskega sistema na snovi, ki so v okolju običajne in same po sebi neškodljive [4]. Pretirana reakcija povzroči različne alergijske bolezni – konjunktivitis, rinitis, astmo, urtikarijo, atopični dermatitis, angioedem, v najhujšem primeru tudi anafilaksijo [2]. Snovi, ki povzročajo preobčutljivost, imenujemo alergeni [1]. Slednji ob vstopu v telo aktivirajo imunski sistem in povzročijo nastajanje specifičnih protiteles [3]. Respiratorne alergijske bolezni so posledica vdihovanja delcev v zraku, ki vsebujejo alergene. Delci pristanejo na navlaženi površini dihalnih poti, kjer se alergeni ekstrahirajo in predstavijo imuskemu sistemu. Preobčutljivost se lahko pojavi po izpostavitvi alergenu v dihalnih poteh pri vdihavanju, v gastrointestinalnem traktu z zaužitjem, v telesnih tekočinah pri piku žuželk ali v koži s fizičnim stikom [2, 5]. Med najpogostejše alergene, poleg pršic in peloda, umeščamo še živalsko dlako, plesni, strup žuželk in nekatera zdravila [5]. Krivec za alergijo je lahko torej snov naravnega izvora ali pa sintetizirana kemična spojina [3].

Kljub temu, da lahko pride organizem v stik z alergenom na različne načine, ostajajo osnovni imunološki mehanizmi enaki. Kot prikazuje *slika 1*, se lahko simptomi razlikujejo glede na način izpostavitve alergenu [2]. Prepoznavni znaki alergije so srbenje, kihanje, izcedek iz nosu, solzenje, koprivnica, oteklina in prebavne motnje. Simptomi alergij so lahko blagi in vplivajo predvsem na kakovost bolnikovega življenja, lahko pa so tudi smrtno nevarni npr. po piku čebele, kjer lahko pride do anafilaktičnega šoka [4].



Slika 1: Možni načini izpostavitve alergenom in alergijske bolezni. Prirejeno po [2].

V alergologiji poznamo dva temeljna mehanizma: senzibilizacijo in alergijsko reakcijo. Senzibilizacija je proces razvoja preobčutljivosti telesa na alergen, s katerim pride organizem v stik. Preobčutljivost se torej pojavi ob prvem kontaktu z alergenom, tvorijo se specifična protitelesa IgE, ki reagirajo pri ponovnem stiku z alergenom, kar predstavlja imunski spomin [3, 6]. Preobčutljivost za določeno snov se pri nekaterih ljudeh razvije v nekaj dneh, pri drugih pa v več letih. Ob drugem in vseh naslednjih ponovnih stikih z alergenom pride do preobčutljivostne alergijske reakcije. Ob tem se sprostijo kemične snovi, najpomembnejši med njimi je histamin, ki je glavni povzročitelj znakov alergij [3, 5]. Potek alergične reakcije je dvostopenjski - ločimo takojšnjo in zakasnelo fazo. Pri takojšnji reakciji pride do sprostitve mediatorjev vnetja iz mastocitov in bazofilcev, zaradi prečnega premreženja imunoglobulinov razreda E (IgE), vezanih na visokoafinitetne receptorje na površini omenjenih celic. Pozno ali zakasnelo reakcijo povzroči premik eozinofilcev, bazofilcev, nevtrofilcev in mononuklearnih celic v vnetišče [2].

1. 1. 1 ALERGIJA NA AMBROZIJO

Pelinolistna ambrozija (*Ambrosia artemisiifolia*) je enoletna vetrocvetka, ki so jo v Evropo prinesli iz Severne Amerike že sredi 19. stoletja in je sedaj ustaljena rastlinska vrsta v številnih državah. V Sloveniji je iz rodu *Ambrosia*, ki šteje več kot 40 različnih vrst, splošno razširjena le pelinolistna ambrozija. Gre za eno najbolj invazivnih tujerodnih rastlinskih vrst pri nas, ki velja predvsem za plevel zapuščenih, neobdelanih površin. V Sloveniji se stanje zaradi širjenja ambrozije iz sosednjih držav, kot tudi njenega širjenja znotraj države, iz leta v leto slabša. Še pred desetimi leti naj bi bilo v Sloveniji le okoli 10 % alergij povezanih z ambrozijo, medtem ko se je v zadnjih letih ta številka po oceni alergologov dvignila na 30 % [7-9].

Preobčutljivost alergikov na omenjeno rastlinsko vrsto predstavlja resen zdravstveni problem. Pelod ambrozije je eden najmočnejših znanih alergenov. Prag, ki izzove reakcijo, je namreč zelo nizek, saj znaša manj kot 20 pelodnih zrn/m³ zraka, po nekaterih podatkih pa že 10 zrn cvetnega prahu/m³ zraka pri občutljivih ljudeh povzroči alergijski rinitis. En gram cvetnega prahu ambrozije vsebuje od 30 do 35 milijonov zrn, posamezna odrasla rastlina pa lahko na leto proizvede več kot 45 g cvetnega prahu. Pelodna zrna merijo od 18 do 22 µm, poleg tega imajo odlične aerodinamične lastnosti, zato lahko s pomočjo vetra prepotujejo razdalje, večje od 100 km. Sezona cvetnega prahu ambrozije v povprečju traja približno en mesec, začne se v prvi polovici avgusta, zaključi pa v drugi polovici septembra, odvisno od danih vremenskih razmer [7-10].

Alergiki, občutljivi na cvetni prah ambrozije, najpogosteje obolevajo za alergijskim rinitisom in pelodno astmo, redkeje se pojavijo reakcije v obliki kontaktnega dermatitisa ali urtikarije. Zrnca cvetnega prahu lahko zaidejo v zgornje dihalne poti ter sprožijo alergične reakcije, kot je seneni nahod, vendar so prevelika, da bi prodrle v spodnje dihalne poti, zato je pelodna oz. sezonska astma redkejša. Število primerov bolnikov z alergijskim rinitisom ali astmo zaradi občutljivosti na pelod ambrozije trenutno strmo narašča v večjem delu Evrope [7, 9].

Viri navajajo, da je možen vzrok za razvoj alergijskega rinitisa pri občutljivih posameznikih visoka aktivnost nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaze, pa tudi aktivnost serinske in cisteinske proteaze v pelodu ambrozije. Do zdaj je dobro poznanih 22

alergenov ambrozije, od tega 6 izmed njih prištevamo med t. i. glavne, zaradi njihove prevladujoče vloge pri povzročanju alergij pri ljudeh (*preglednica I*). Glavni alergeni so tisti, na katere po definiciji reagira več kot 50 % bolnikov. Cvetni prah vsebuje tudi t. i. panalergene, kot so profilini, polkalcini, ki pripomorejo k navzkrižnim reakcijam med cvetnim prahom trav in plevelov (ambrozija, pelin) v 10 do 15 % primerov [7, 10-13].

Najpomembnejši alergen ambrozije, Amb a 1, spada med pektat liaze. Gre za 38 kDa velik neglikozilirani protein. Na omenjen alergen pri kožnih vbodnih testih reagira 95 % posameznikov, občutljivih na ambrozijo. Drugi najpomembnejši alergen cvetnega prahu ambrozije je Amb a 11, na katerega reagira 66 % bolnikov. Amb a 6, Amb a 8, Amb a 9 in Amb a 10 spadajo med panalergene, ki so prisotni tudi v navadnem pelinu. Alergije na ambrozijo in pelin so povezane zaradi podobnosti med alergeni Amb a 1 in Art v 6, med Amb a 4 in Art v 1, pa tudi zaradi zgoraj omenjenih panalergenov. Klinične in serološke študije so pokazale, da večina bolnikov, ki je občutljiva na pelod ambrozije, alergično reagira tudi na cvetni prah navadnega pelina [9-11].

Preglednica I: Alergeni v cvetnem prahu pelinolistne ambrozije; (/ni podatka). Povzeto po [9].

alergen	velikost (kDa)	IgE-reaktivnost (%)	biološka vloga
Amb a 1	38	> 90	pektat liaza
Amb a 2	38	/	pektat liaza
Amb a 3	9	30-50	plastocianin
Amb a 4	/	30	glikoprotein z defenzinu podobno domeno
Amb a 5	5	10-20	/
Amb a 6	10	20-35	nespecifični proteinski prenašalec lipidov
Amb a 7	12	20	plastocianin
Amb a 8	14	35	profilin, panalergen
Amb a 9	10	10-15	polkalcin, panalergen
Amb a 10	10	/	polkalcin, panalergen
Amb a 11	/	66	cisteinska proteaza

1. 1. 2 ALERGIJA PO PIKU ŽUŽELK

Problem preobčutljivostnih reakcij na alergene žuželk postaja zadnja leta čedalje aktualnejši. Za alergijsko reakcijo po piku žuželk trpi okrog 0,5 % ljudi, v Sloveniji zaradi tovrstne reakcije vsako leto umre ena oseba [6, 14].

Za naše zemljepisno območje so pomembne žuželke iz rodu kožekrilcev (*Hymenoptera*), med katere uvrščamo čebele, čmrlje, ose in sršene. Za nastanek preobčutljivosti in za sprožitev alergijske reakcije mora priti strup žuželke v človeško telo, kar omogoča želo, ki je značilno le za samice. Želo v vbodni rani pusti samo čebela. Na njem ostanejo še strupen mehurček, del mišice in žleze. Za nastanek preobčutljivosti so odločilni tako alergeni žuželkinega strupa kot tudi njenega telesa [6].

Pri nekaterih ljudeh beljakovine v strupu žuželk spodbudijo tvorbo sIgE, ki se vežejo na mastocite. Dovzetni posamezniki se takrat senzibilizirajo. Ob naslednjem piku se alergeni strupa vežejo na protitelesa, posledično pride do sproščanja histamina in drugih posrednikov vnetja iz mastocitov, kar povzroči alergijsko reakcijo. Mediatorji delujejo na kožo, gladko mišičje v žilah, bronhijih, prebavilih ter povzročajo simptome alergijske reakcije. Alergija torej ni posledica delovanja strupa žuželke, temveč nepotrebne in burnega odziva imunskega sistema na sestavine strupa [15, 20].

Strup žuželk vsebuje biogene amine in beljakovine, zato je ob piku vedno prisotna bolečina. Na mestu pika lahko nastane manjša vnetna reakcija, koža pordeči in oteče. O alergiji govorimo samo takrat, ko pride pri senzibilizirani osebi do simptomov, ki so posledica vezave strupa na specifična protitelesa. Pri alergiku lahko že samo en pik povzroči oteklino grla in zadušitev. Zaradi toksičnosti strupa lahko pride po piku večjega števila žuželk do zastrupitve. Količina strupa, ki se sprosti med pikom čebele, je odvisna od vrste, veljajo pa tudi razlike med primerki iste vrste. Povprečna količina strupa, ki ga ob piku vbrižga čebela, znaša od 50 do 140 µg [6, 15, 16].

V čebeljem strupu je bilo dokazanih 12 alergenov (*preglednica II*), od katerih sta najpomembnejša fosfolipaza A2 (Api m 1) in hialuronidaza (Api m 2). V telesu čebele so našli 13 alergenov, vendar je njihova sposobnost senzibilizacije dvajsetkrat slabša kot pri fosfolipazi A2 [6, 17].

Čebelji strup ali apitoksin je kompleksna mešanica različnih bioaktivnih snovi. Nehlapen del čebeljega strupa sestavljajo encimi (fosfolipaza A2, hialuronidaza), drugi proteini in peptidi (melitin, apamin, adolapin, mastocite-degranulirajoči peptid) ter biološko aktivni amini (histamin, epinefrin). V strupu najdemo tudi nebeljakovinske sestavine, kot so lipidi, ogljikovi hidrati (glukoza, fruktoza), mravljična, klorovodikova in fosforna kislina, acetilholin ter ioni magnezija [18-20]. Poleg nehlapnega dela vsebuje čebelji strup v strupnem mešičku 88 % vode in od 4 do 8 % hlapnih sestavin (feromonov). Sestava strupa je pri različnih podvrstah medonosne čebele enaka. Glede vsebnosti fosfolipaze A2 in histamina pa so ugotovili sezonske in s starostjo čebele povezane razlike [18].

Pekoča bolečina po piku je posledica delovanja melitina (Api m 4). Gre za prevladujočo sestavino čebeljega strupa, saj predstavlja 50 % suhe teže celotnega strupa. 4 molekule melitina tvorijo poro v celični membrani, kar povzroči spremembe membranske organiziranosti in prepustnosti ter porušenje ionske homeostaze celice. Čeprav ga ne uvrščamo med glavne alergene čebeljega strupa, je zanj značilna 22,9 - 29 % prevalenca senzibilizacije [18, 19].

K alergijski reakciji najbolj prispevata fosfolipaza A2 in hialuronidaza, ki veljata za glavna dokazana alergena čebeljega strupa. Čebelja fosfolipaza A2 deluje sinergistično z melitinom, tako da katalizira hidrolizo fosfolipidov v celični membrani. Hialuronidaza depolimerizira molekule hialuronske kisline v tkivu ter poveča prepustnost kapilar. Omenjena encima s svojim delovanjem torej omogočata pospešeno širjenje strupa po tkivu [18, 19].

Sestava strupov in glavni alergeni različnih vrst čebel po svetu so zelo podobni, struktura glavnega alergena fosfolipaze A2 pa skoraj identična. Encim hialuronidaza v čebeljem in osjem strupu ima približno 50 % sekvence enake, zato je to glavna sestavina, odgovorna za navzkrižne reakcije. Nekateri bolniki izkazujejo hkratno preobčutljivost na čebele in ose (59 %) ali na različne vrste os (50 %). V takih primerih je bistvena potrditev, ali gre res za hkratno preobčutljivost ali morda za navzkrižno reaktivnost, saj je potrebno v primeru dvojne senzibilizacije izvajati imunoterapijo z obema trupoma. Navzkrižno reaktivna protitelesa IgE prepoznajo podobne glikozilirane dele epitopov alergenov v različnih trupih [16, 17].

Preglednica II: Znani alergeni čebeljega strupa; (/ -ni podatka). Povzeto po [17, 21].

alergen	biološka vloga	molekulska masa (kDa)	suha frakcija strupa (%)	pozitivni sIgE (%)
Api m 1	Fosfolipaza A2	16	7-15	95
Api m 2	Hialuronidaza	43	1-3	50
Api m 3	Kisla fosfataza	45	1	37
Api m 4	Melitin	2.8	35-50	29/56
Api m 5	Dipeptidil peptidaza IV	102	1	60
Api m 6	Proteazni inhibitor	8	1-2	42
Api m 7	Proteaza	39	<1	80
Api m 8	Karboksilesteraza	70	<1	/
Api m 9	Karboksilpeptidaza	60	/	/
Api m 10	Ikarapin	50-55	/	50
Api m 11	Poglavitni protein matičnega mlečka	50-60	/	15/34
Api m 12	Vitelogenin	200	/	40

1. 2 ZDRAVLJENJE ALERGIJSKIH BOLEZNI

Osnova zdravljenja vseh alergijskih bolezni je izogibanje alergenu [1]. Za uspešno zdravljenje klinične smernice priporočajo kombinacijo izobraževanja bolnika, izogibanja alergenu, farmakološkega zdravljenja ter specifične imunoterapije (SIT) [2]. Pri farmakološkem zdravljenju se uporabljata dve vrsti zdravil, in sicer t. i. olajševalci, ki blažijo težave, ter t. i. preprečevalci. Med olajševalce sodijo antihistaminiki, ki so učinkoviti pri zdravljenju alergijskega rinitisa, ne vplivajo pa na simptome astme, zato slednje zdravimo z bronhodilatatorji, ki širijo dihalne poti. Med preprečevalce, ki zavirajo alergijsko vnetje, umeščamo glukokortikoide, ki jih nanašamo lokalno, ter antilevkotriene, ki se lahko jemljejo v obliki tablet. [1, 4].

V primeru alergije po piku žuželk se prav tako uporabljajo antihistaminiki, ki zmanjšajo občutek srbenja, ter kortikosteroidi, ki zmanjšajo vnetje in otekanje na mestu pika [22]. Omenjena zdravila so dokazano učinkovita pri lajšanju simptomov, vendar ne dosežejo

samega mehanizma alergijske reakcije in ne preprečujejo nadaljnji razvoj bolezni, zato simptomatsko zdravljenje v večini primerov ne zadošča [2].

Kadar se predhodni postopki zdravljenja izkažejo za neučinkovite, se uvede specifična imunoterapija (SIT) [1]. Slednja se uporablja pri zdravljenju težjih oblik alergijskega rinitisa in pri bolnikih, ki so po piku kožekrilca utrpeli anafilaktični šok. SIT je biološka vzročna terapija specifičnih alergij [7]. Gre za desenzibilizacijo imunskega sistema z vzročnim alergenom [23]. Pri tem postopku poskušamo z vnosom postopno naraščajočih odmerkov čistega alergena doseči toleranco bolnika na dotični alergen [7]. Zdravljenje se običajno prične z zelo nizkim odmerkom raztopine alergena, katerega postopno dvigujemo do vzdrževalnega odmerka [24]. SIT je edina vzročna terapija alergije, kjer je v središču reakcija med IgE in vnesenim alergenom [23]. Z omenjeno metodo vplivamo torej na osnovne imunološke mehanizme, kar rezultira v umiritvi procesov preobčutljivosti na specifičen alergen v organizmu [2, 7]. Na ta način zmanjšamo ali ustavimo simptome alergije, preprečimo poslabšanje alergijskega rinitisa in prehod v astmo ter preprečimo nastanek novih senzibilizacij [2, 23].

SIT se izvaja s specifičnimi alergeni pršic, mešanico drevesnih in travnih pelodov, v Sloveniji pa najpogosteje z alergeni strupa ose in čebele [23]. Znani sta dve praksi, podkožna (subkutana) oblika z injekcijami (SCIT) in podjezična (sublingvalna) z nanašanjem alergena (kapljice/tabletka/tekočina-razpršilnik) na ustno sluznico pod jezik (SLIT). Vsaka SIT poteka v dveh stopnjah; v uvodni stopnji se začne v telo vnašati najmanjšo količino alergena, ki jo nato v dnevni in tedenski intervalih povečujemo do vzdrževalnega odmerka (vzdrževalna stopnja), katerega bolnik prejema enkrat mesečno vsaj 3-5 let [7, 23, 24]. Med izvajanjem SIT so možne lokalne reakcije na mestu aplikacije alergena ali sistemske reakcije vseh stopenj, zato se omenjen postopek zdravljenja izvaja le v bolnišnicah ali specializiranih alergoloških ambulantah [22, 23]. 10 – 15 % pacientov, ki se zdravi s SIT s strupom žuželk, doživi lažjo sistemsko reakcijo v začetnih tednih izvajanja zdravljenja, večjo lokalno reakcijo na mestu injiciranja alergena pa doživi do 50 % pacientov. Po zaključeni SIT je verjetnost sistemske alergijske reakcije okrog 10 %, običajno pa so reakcije blage in lokalne. Učinek SIT naj bi trajal vsaj 6 do 12 let po zaključenem zdravljenju [22, 24].

V primeru alergije je imunski odgovor usmerjen v odziv Th2. Z imunoterapijo ga skušamo spremeniti v običajen odziv Th1, kjer Th1 celice proizvajajo interferon gama

(IFN- γ), ki stimulira B-celice, da začnejo namesto IgE proizvajati zaščitna protitelesa razreda IgG. IgG se vežejo na molekule alergena in na ta način preprečijo vezavo protiteles IgE oz. njihovo prečno premreženje. Posledično je na ta način preprečena sprostitvev posrednikov vnetja iz mastocitov, kar vodi v zmanjšano klinično odzivnost bolnika ob stiku z alergenom [2].

Raziskovalci za zdravljenje alergij proučujejo tudi nove pristope in odkrivajo nove tarčne strukture, ki bi lahko bile vključene v postopek zdravljenja. Izboljšave v podkožni SIT vidijo v dodatku adjuvansov in uporabi monoklonskega protitelesa omalizumaba, ki blokira vezavo IgE na visoko afinitetne receptorje Fc ϵ RI na mastocitih in bazofilcih. Popolnoma nov imunomodulatorni pristop predstavljajo tudi agonisti Toll-u podobnega receptorja 9, ki usmerijo imunski odziv v Th1. V primeru alergije na cvetni prah raziskujejo metodo fototerapije in enostavnih nosnih filtrov [16].

1. 3 MIMOTOPI

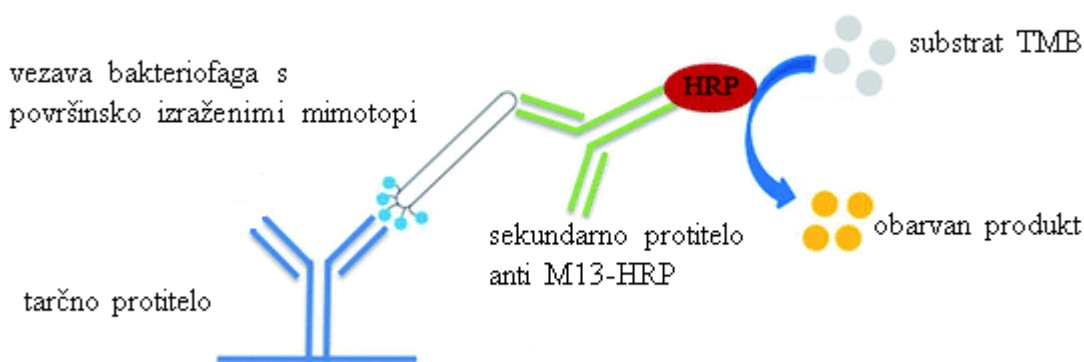
Novejše raziskave se osredotočajo na imunoterapijo z rekombinantnimi alergeni in hipoalergenimi derivati alergenov, tudi na imunoterapijo s peptidi [25, 26]. Rekombinantni alergeni povečajo varnost imunoterapije in izboljšajo natančnost diagnoze, še posebej so v pomoč pri proučevanju navzkrižne reaktivnosti med alergeni [16]. S hipoalergenimi pripravki zmanjšamo alergeno aktivnost terapevtske molekule in pojav neželenih učinkov. Pri pripravi hipoalergenih derivatov alergena je izredno pomembna ohranitev epitopov, saj preko njih poteka vezava na IgE in so tako bistveni pri procesu desenzibilizacije [27]. Za obetajoče so se izkazali mimotopi - peptidne molekule, ki same niso alergogene, so pa zmožne posnemati epitop alergena in se vezati na IgE [28].

Peptidni mimetiki oz. mimotopi posnemajo fizikalno-kemijske lastnosti aminokislin, ki gradijo epitop naravnega alergena. Mimotopi lahko posnemajo linearne, konformacijske, pa tudi neproteinske epitope. S pomočjo mimotopov poteka raziskovanje interakcij alergen-protitelo in razvoj novih cepiv, hkrati pa predstavljajo obetavno sredstvo za uporabo v specifični imunoterapiji [28-30].

Mimotope lahko pridobivamo s selekcijo iz bakteriofagnih knjižnic naključnih peptidov. Ustrezne peptide poiščemo z izvedbo selekcije iz bakteriofagne predstavitvene knjižnice in kot rezultat dobimo bakteriofage z izraženimi peptidi, ki imajo avidnost do tarčnih

protiteles [28, 30]. Z rešetanjem bakteriofagnih peptidno-predstavitvenih knjižnic so na Katedri za farmacevtsko biologijo odkrili nekaj peptidov, ki bi lahko posnemali epitop glavnega alergena čebeljega strupa, Api m 1, in nekaj peptidov, ki bi lahko posnemali epitop glavnega alergena ambrozije, Amb a 1.

Po selekciji je potrebno izbrane bakteriofagne klone z izraženimi peptidi ovrednotiti, pri čemer se lahko poslužujemo različnih metod, npr. prenosa western, površinske plazmonske resonance, encimsko-immunskega testa (ELISA) idr. ELISA je posebna tehnika, s pomočjo katere dokazujemo antigene ali protitelesa v vzorcu oz. določamo njihovo koncentracijo. Kadar v testnem vzorcu določamo specifična protitelesa, govorimo o indirektnem oz. posrednem testu ELISA, kadar pa določamo prisotnost antigena, govorimo o sendvič testu ELISA [30]. Slednjega smo uporabili pri izvedbi praktičnega dela diplomske naloge. *Slika 2* predstavlja prikaz postopka testa ELISA.



Slika 2: Shematska predstavitev principa metode ELISA. Iskani analit - vezane bakteriofage smo detektirali s sekundarnimi protitelesi proti glavni plaščni beljakovini bakteriofaga M13, označenimi z encimom hrenova peroksidaza, ki katalizira pretvorbo substrata TMB do modro obarvanega produkta. Reakcijo smo prekinili z dodatkom H_2SO_4 , pri čemer je modra barva nemudoma prešla v rumeno. Na shemi je vidno tudi, da vsak bakteriofagni klon na svoji površini izraža pet enakih kopij istega peptidnega mimetika. Prirejeno po [31].

2 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je ovrednotiti posamezne bakteriofagne klone s površinsko izraženimi peptidi, ki so kandidati za mimotope glavnega alergena ambrozije Amb a 1 oz. glavnega alergena čebeljega strupa Api m 1.

V okviru diplomskega dela bomo vrednotili vezavo osemnajstih potencialnih mimotopov glavnega alergena ambrozije in tridesetih potencialnih mimotopov glavnega alergena čebeljega strupa, ki bodo izraženi kot fuzijske beljakovine s plaščno beljakovino bakteriofaga M13. Najprej bomo bakteriofagne klone pomnožili, jih očistili in določili njihovo koncentracijo. Za vrednotenje vezave bomo uporabili metodo encimsko imunskega testa na trdnem nosilcu (ELISA). Primerjali bomo vezavo bakteriofagnih klonov na tarčna protitelesa in testirali morebitno nespecifično vezavo na konstantno (Fc) regijo protiteles ter preverili specifičnost interakcije s paratopi tarčnih protiteles.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 REAGENTI

REAGENT	PROIZVAJALEC
KCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
KH ₂ PO ₄	Merck, ZDA
Glicerol	Fluka Chemie, Buchs, Švica
LB agar	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
H ₂ SO ₄	Merck, ZDA
LB Broth	Sigma, ZDA
NaCl	Sigma, ZDA
PEG-8000	Sigma, ZDA
posneto mleko v prahu	Pomurske mlekarne, Slovenija
Tetraciklin, liofilizat	Sigma, ZDA
TMB ELISA peroxidase substrate	Rockland, ZDA; Sigma, ZDA
Tween®20	Sigma, ZDA

3.1.2 PUFRI, RAZTOPINE IN GOJIŠČA

PUFER, RAZTOPINA OZ. GOJIŠČE	SESTAVA	PRIPRAVA
Tekoče gojišče LB	LB Broth 8 g dH ₂ O 400 mL	LB Broth raztopimo v destilirani vodi, premešamo na magnetnem mešalniku in po avtoklaviranju shranimo na sobni T.
Tetraciklin (20 mg/mL)	glicerol 40 mL ddH ₂ O 40 mL tetraciklin 1,6 g	Tetraciklin raztopimo v ddH ₂ O. Filtriramo skozi membranski filter z velikostjo por 0,2 µm.

		Dodamo predhodno avtoklaviran glicerol in hranimo na -20 °C.
Trdno agarno gojišče LB	LB agar 14 g dH ₂ O 400 mL	LB agar raztopimo v destilirani vodi, avtoklaviramo in aseptično vlijemo v sterilne petrijevke. Počakamo, da se strdi. Hranimo v hladilniku pri 4 °C.
PEG/NaCl (20 % w/v PEG-8000 / 2,5 M NaCl)	PEG-8000 8 g NaCl 5,85 g dH ₂ O do 40 mL	Natehtan PEG-8000 in NaCl raztopimo v destilirani vodi, avtoklaviramo in shranimo na sobni T.
PBS	NaCl 3,2 g KCl 0,08 g Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O 0,722 g KH ₂ PO ₄ 0,096 g dH ₂ O 400 mL	Natehtane komponente dodamo destilirani vodi in mešamo na magnetnem mešalniku do zbitritve raztopine. S pH metrom uravnamo pH na 7,4, nato pa pufer avtoklaviramo in shranimo na sobni T.
Blokirni pufer (5 % mleko/PBS)	Posneto mleko v prahu 250 mg PBS do 5 mL	Natehtanemu posnetemu mleku v prahu dodamo PBS in premešamo, da se raztopi.
Pufer za spiranje (0,1 % PBST)	PBS 50 mL Tween® 20 50 µL	V PBS dodamo Tween® 20, počasi premešamo (penjenje) ter shranimo na sobni T.
Pufer za redčenje sekundarnih protiteles (1% BSA/PBS)	Goveji serumski albumin (BSA) 100 mg PBS 10 mL	BSA dodamo fosfatnemu pufru in premešamo.

Sterilizacija pufov, raztopin in gojišč je potekala 20 min pri 121 °C in nadtlaku 1 bar.

3.1.3 BIOLOŠKI MATERIAL

BIOLOŠKI MATERIAL	PROIZVAJALEC
Bakteriofagni kloni, izolirani iz bakteriofagnih predstavitev knjižnic Ph.D.-12™, Ph.D.-7™ in Ph.D.-C7C™	New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA
Gostiteljski bakterijski sev Escherichia coli K12 ER 2738	New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA
Monoklonsko protitelo proti bakteriofagu M13, konjugirano s hrenovo peroksidazo (Anti-M13-mAb-HRP)	GE Healthcare, Little Chalfont, Anglija
Goveji serumski albumin (BSA)	Sigma, ZDA
Poliklonska zajčja protitelesa proti Fel d 1	INDOOR Biotechnologies, Charlottesville, Virginia, ZDA
Poliklonska zajčja protitelesa proti Amb a 1	INDOOR Biotechnologies, Charlottesville, Virginia, ZDA
Poliklonska zajčja protitelesa proti Api m 1	MyBioSources, San Diego, California, ZDA
Zajčja protitelesa proti prokatepsinu X	Biogenes, Berlin, Nemčija

3.1.4 LABORATORIJSKA OPREMA

LABORATORIJSKA OPREMA	PROIZVAJALEC
Analitska tehtnica Exacta 610 EB	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Analitska tehtnica AB104	Mettler Toledo, Küssnacht, Švica
Avtoklava A-21 in A63 CV	Kambič, Semič, Slovenija
Aseptična komora z laminarnim pretokom zraka LFVP12 in MC 12-2	Iskra PIO, Slovenija
Centrifugi 5804 R in 5418 R	Eppendorf, Nemčija
Centrifuga mini G	IKA, Nemčija
Čitalec mikrotitrskih plošč Infinite® M1000 PRO	Tecan Group Ltd., Švica
Centrifugirke	TPP, Švica
Hladilnik	Gorenje, Velenje, Slovenija

Inkubator WTB, Binder	Tuttlingen, Nemčija
Magnetna mešalnica Rotamix 606 MMH in 550 MMH	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Mikrotitrne ploščice Nunc-Immuno module	Nunc, Roskilde, Danska
Multikanalna pipeta	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
pH meter 691	Metrohm, Herisan, Švica
Pipetor accu-jet® pro	BrandTech® Scientific, ZDA
Pipete Research (10-100, 20-200 in 100-1000 µL)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Pipetni nastavki	Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
Spektrofotometer Nanodrop ND-1000	NanoDrop Technologies, Delaware, ZDA
Vibracijski mešalnik Vibromix 314 EVT in Vibromix 10	Tehtnica, Železniki, Slovenija; Domel, Železniki, Slovenija
Sušilnik WTB, Binder	Tuttlingen, Nemčija
Zamrzovalnik	Gorenje, Velenje, Slovenija; SANYO Beusenville, IL, ZDA

3.2 METODE DELA

3.2.1 Pomnoževanje posameznih bakteriofagnih klonov

Bakteriofage M13 smo pomnožili v bakteriji *Escherichia coli* K12 ER 2738. Trajno kulturo bakterij smo ob ognju nacepili na trdno gojišče LB z dodanim tetraciklinom (izhodna koncentracija 20 mg/mL). Petrijevko smo inkubirali 16-20 ur pri 37 °C. Posamezne kolonije smo uporabili za pripravo tekoče prekonočne kulture. Eno kolonijo s plošče smo aseptično prenesli s sterilnim pipetnim nastavkom v 10 mL tekočega LB medija, ki smo mu predhodno dodali 10 µL tetraciklina (izhodna koncentracija 20 mg/mL). Ob stresanju smo inkubirali preko noči na 37 °C. Tako pripravljene bakterije smo uporabili za pomnoževanje bakteriofagov.

1. V erlenmajerice odpipetiramo 20 mL medija LB, 20 µL tetraciklina (končna koncentracija znaša torej 20 µg/mL), 200 µL prekonočne kulture bakterij in 10 µL bakteriofagov z znanimi sekvencami.

2. Erlenmajerice inkubiramo na stresalniku 4,5 ur na 37 °C, s hitrostjo 250 vrt./min.
3. Po inkubaciji prenesemo bakterijsko kulturo v centrifugirke in centrifugiramo 10 min na 4 °C s hitrostjo 11 000 vrt./min.
4. Supernatant, v katerem so pomnoženi bakteriofagi, prenesemo v nove centrifugirke, pelet bakterij pa zavržemo. Ponovno centrifugiramo 10 min na 4 °C s hitrostjo 10 000 vrt./min, da se posedejo še preostale morebitne bakterije.
5. Nato prenesemo supernatant v centrifugirke s 4 mL PEG/NaCl in močno premešamo na vibracijskem mešalniku.
6. Pustimo čez noč v hladilniku na 4 °C, da se bakteriofagi obarjajo.
7. Naslednji dan centrifugiramo oborjene fage 15 min na 4 °C s hitrostjo 10 000 vrt./min.
8. Zavržemo supernatant.
9. Ponovimo kratko centrifugiranje (15 s, 1-6000 vrt./min) in s pipeto odstranimo preostanek supernatanta.
10. Oborino bakteriofagov raztopimo v 1 mL PBS-a.
11. S pipeto prenesemo v 1,5-mililitrske mikrocentrifugirke in centrifugiramo 5 min na 4 °C s hitrostjo 10 000 vrt./min, da se posedejo preostale bakterije.
12. Supernatant prenesemo v sveže mikrocentrifugirke z 200 µL PEG/NaCl.
13. Inkubiramo 60 min na ledu, da se bakteriofagi oborijo.
14. Centrifugiramo 10 min na 4 °C s hitrostjo 12 000 vrt./min.
15. Supernatant zavržemo, kratko centrifugiramo (15-60 s) in s pipeto odstranimo preostanek supernatanta.
16. Oborino bakteriofagov raztopimo v 200 µL PBS, kratko centrifugiramo (1 min), da se posedejo preostale netopne beljakovine.
17. Supernatant prenesemo v sveže mikrocentrifugirke.
18. Pomerimo absorbanco (glej poglavje 3.2.2).

3.2.2 Določanje koncentracije pomnoženih bakteriofagov

Pomnoženim bakteriofagnim klonom smo pomerili absorbanco. Meritve smo izvedli s spektrofotometrom Nanodrop ND-1000 pri dveh valovnih dolžinah, in sicer pri 269 nm, kjer absorbirajo beljakovine, ter pri 320 nm, kjer absorbirajo nečistote, zato je potrebno to vrednost odšteti. Kot ozadje je služil PBS. Na podlagi dobljenih vrednosti absorbanc smo

nato s pomočjo *enačbe 1* izračunali koncentracijo bakteriofagnih klonov [32]. Preračunati smo morali še redčitve posameznih bakteriofagov, saj je za izvedbo testa ELISA potrebno pripraviti enako koncentracijo vsakega klona.

$$\text{število bakteriofagov/mL} = \frac{(A_{269} - A_{320}) \times 6 \times 10^{16}}{\text{število baz (ssDNA) bakteriofaga}}$$

$$\text{število baz (ssDNA) bakteriofaga} = 7222$$

Enačba 1: Izračun koncentracije bakteriofagnih klonov

3.2.3 Primerjava vezave peptidov, izraženih na bakteriofagih, na tarčna protitelesa s testom ELISA

Za oceno vezave bakteriofagov z izraženimi peptidi na tarčne molekule - anti-Amb a 1 oz. anti-Api m 1 smo izvedli semikvantitativni test ELISA.

1. Korak: Prekrivanje mikrotitrne plošče s tarčo

Primarna protitelesa anti-Amb a 1 oz. anti-Api m 1 ustrezno redčimo v PBS (1:1000) in z multikanalno pipeto naneseemo v vdolbinice mikrotitrne ploščice (MTP). Izhodna koncentracija primarnih protiteles je znašala 2 mg/mL, ker pa v vsako vdolbinico odpipetiramo 100 μ L, znaša končna koncentracija primarnih protiteles 0,2 mg/vdolbinico. MTP prelepimo z lepilnim trakom, pokrijemo s plastičnim pokrovom in aluminijasto folijo ter čez noč inkubiramo v hladilniku na 4 °C.

Za preverjanje nespecifične vezave na Fc regijo protiteles smo izvedli test ELISA, pri katerem smo kot tarči uporabili dva tipa kontrolnih protiteles, in sicer poliklonska zajčja protitelesa proti glavnemu mačjemu alergenu - anti-Fel d 1 in zajčja protitelesa proti prokatepsinu X. Nadaljnji koraki testa ELISA so bili nespremenjeni.

2. Korak: Blokada

Da bi prekrili nezasedeno površino v vdolbinicah, pripravimo blokirni pufer – 5 % posneto mleko v prahu/PBS. Z multikanalno pipeto v vsako vdolbinico odpipetiramo 200 μ L pufera za blokado. Z 2-krat večjim volumnom blokiramo zato, da zagotovimo prekritje celotne

površine vdolbinic. MTP pokrijemo s plastičnim pokrovom in aluminijasto folijo ter inkubiramo uro in pol na sobni T ob rahlem stresanju – 50 vrt./min.

Za kontrolo vezave na ozadje so služile vdolbinice MTP, prekrte le s 5 % mlekom oz. s 5 % BSA. Izvedli smo torej tudi testa ELISA, pri katerih na MTP nismo imobilizirali primarnih protiteles, pač pa smo vdolbinice prekrili zgolj s 5 % posnetim mlekom v prahu/PBS oz. 5 % BSA/PBS. Nadaljnji koraki testa ELISA so bili nespremenjeni.

3. Korak: Spiranje po blokadi

Pripravimo pufer za spiranje – 0,1 % PBST. Iz vdolbinic odstranimo blokirni pufer ter speremo z 250 μ L 0,1 % PBST. Med vsakim spiranjem previdno trkamo ob MTP, vendar moramo biti pozorni, da nam tekočina iz ene vdolbinice ne zaide v drugo. Pufer za spiranje nato odlijemo in z MTP previdno udarjamo ob papirnato brisačo, da odstranimo preostalo tekočino. Postopek spiranja trikrat ponovimo.

4. Korak: Nanos bakteriofagnih klonov

Suspenzije bakteriofagov, ki jih hranimo v hladilniku, predhodno segrejemo na sobno T, jih premešamo na vibracijskem mešalniku in kratko centrifugiramo. V vsako vdolbinico dodamo 100 μ L suspenzije. Za vsak klon naredimo tri ponovitve. Med nanašanjem bakteriofagnih klonov na MTP moramo biti pozorni, da za nanos vsakega klona zamenjamo pipetni nastavek. Pri nanosu je potrebno pohiteti, da vsem klonom omogočimo istočasen začetek vezave. MTP pokrijemo s plastičnim pokrovom in aluminijasto folijo ter inkubiramo 60 min na sobni T z rahlim stresanjem – 50 vrt./min.

5. Korak: Spiranje po vezavi klonov

Nevezane bakteriofage petkrat speremo z 250 μ L 0,1 % PBST. Po vsakem spiranju z MTP previdno udarjamo ob papirnato brisačo, da odstranimo preostalo tekočino.

6. Korak: Dodatek sekundarnih protiteles anti-M13-HRP

Monoklonska protitelesa proti glavni plaščni beljakovini bakteriofaga M13, konjugirana s hrenovo peroksidazo, hranimo v zamrzovalniku. Pred uporabo jih kratko premešamo na vibracijskem mešalniku in centrifugiramo ter ustrezno redčimo z 1 % BSA/PBS v razmerju 1:5000. V vsako vdolbinico z multikanalno pipeto odmerimo po 100 μ L pripravljene

suspenzije. MTP pokrijemo s plastičnim pokrovom in aluminijasto folijo ter inkubiramo 60 min na sobni T z rahlim stresanjem –50 vrt./min.

7. Korak: Spiranje po vezavi sekundarnih protiteles

Suspenzijo sekundarnih protiteles odlijemo ter vdolbinice MTP petkrat speremo z 250 μ L 0,1 % PBST, s čimer odstranimo nevezana sekundarna protitelesa. Pufer za spiranje vsakič odlijemo in preostalo tekočino previdno odstranimo z udarjanjem ob papirnato brisačo.

8. Korak: Dodatek substrata

Substrat TMB hranimo v hladilniku, zato ga je potrebno pred uporabo segreti na sobno T. Z multikanalno pipeto ga v vsako vdolbinico nanese 200 μ L, MTP pokrijemo s plastičnim pokrovom in aluminijasto folijo, ter počakamo nekaj minut, da se prozorna tekočina postopoma obarva v modro. Do obarvanja pride v tistih vdolbinicah, kjer so prisotna sekundarna protitelesa, konjugirana z encimom hrenovo peroksidazo (anti-M13-HRP), ki katalizira pretvorbo substrata TMB do modro obarvanega produkta.

9. Korak: Prekinitev reakcije

V vsako vdolbinico po točno določenem času inkubacije z multikanalno pipeto dodamo 50 μ L H_2SO_4 , da ustavimo reakcijo. Vsebina vdolbinic se pri tem nemudoma obarva rumeno.

10. Korak: Merjenje absorbance

Absorbanco produkta v vsaki vdolbinici MTP izmerimo pri 450 nm s čitalcem MTP Tecan.

3.2.4 Kompetitivni test ELISA z alergenom

Za potrditev izpodrivanja bakteriofagov smo izvedli kompetitivni test ELISA s tremi različnimi koncentracijami naravnega alergena. Postopek je enak kot pri običajnem testu ELISA, le da smo bakteriofagnim klonom dodali prosti alergen tik pred nanosom v vdolbinice MTP in pustili tekmovati za vezavno mesto na tarčnih protitelesih.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Določanje koncentracije pomnoženih bakteriofagov

Spektrofotometrično meritev absorbance smo izvedli pri dveh valovnih dolžinah – 269 nm in 320 nm. Pri slednji absorbirajo nečistote, zato je potrebno to vrednost odšteti. Beljakovine absorbirajo pri 269 nm, pri dotični valovni dolžini so absorbirali tudi naši bakteriofagni kloni. Kot ozadje je služil PBS. Dobljeni odzivi so prikazani v *preglednicah III* in *IV*. Nizki signali pri 320 nm kažejo, da nam je uspelo odstraniti večino bakterij, netopnih proteinov in ostalih morebitnih nečistot, kar pomeni, da je bil postopek čiščenja dobro izveden.

Na podlagi izmerjenih absorbanc smo po *enačbi 1* izračunali koncentracije bakteriofagnih delcev. Nato smo morali za izvedbo testa ELISA pripraviti enako koncentracijo vsakega klona, zato je bilo potrebno preračunati njihove redčitve. Na ta način smo na podlagi odzivov oz. izmerjenih vrednosti absorbanc lažje primerjali jakost vezave posameznih bakteriofagnih klonov na tarčna protitelesa.

Preglednica III: Spektrofotometrično izmerjene absorbance, izračunane koncentracije bakteriofagnih klonov Amb a 1 ter njihove redčitve za pripravo končne koncentracije 10^{11} fagov/mL oz. 10^{10} fagov/vdolbinico (100 μ L), ki smo jo uporabili pri semikvantitativnem testu ELISA.

Oznaka klona	A269	A320	konc. (bakteriofagov/mL)	V klona (μ L)	V PBS (μ L)
Am12N21	0.31	0.01	2.51E+13	3.99	996.01
Am12N17	0.53	0.008	4.34E+13	2.31	997.69
Am12N14	0.92	0.011	7.54E+13	1.33	998.67
Am12N12	0.27	0.007	2.21E+13	4.53	995.47
Am12S24	0.92	0.013	7.54E+13	1.33	998.67
Am12S11	0.52	0.002	4.29E+13	2.33	997.67
Am12S10	0.47	0.003	3.91E+13	2.56	997.44
Am12S8	0.03	0.001	2.24E+12	49.33	950.67
Am7S3	0.39	0.018	3.05E+13	3.28	996.72
Am7S4	0.37	0.011	2.30E+13	3.33	996.67
Am7N19	0.04	-0.004	3.49E+12	16.13	983.87
AmC7N4	0.16	0.003	1.30E+13	7.72	992.28
AmC7N6	0.23	0.003	1.86E+13	5.37	994.63
AmC7S6	0.06	0.002	4.65E+12	23.93	976.07
AmC7S12	0.18	0.015	1.38E+13	7.25	992.75

AmC7S14	0.16	0	1.32E+13	7.57	992.43
AmC7S23	0.29	0.007	2.33E+13	4.30	995.70
K	0.08	0.001	6.23E+12	13.42	986.58

Preglednica IV: Spektrofotometrično izmerjene absorbance, izračunane koncentracije bakteriofagnih klonov Api m 1 ter njihove redčitve za pripravo končne koncentracije 2×10^{10} fagov/mL oz. 2×10^9 fagov/vdolbinico (100 μ L), ki smo jo uporabili pri semikvantitativnem testu ELISA.

Oznaka klona	A269	A320	konc. (bakteriofagov/mL)	V klona (μL)	V PBS (μL)
A12S6	0,50	0,02	4,00E+13	2,50	997,50
A12S7	0,41	0,01	3,37E+13	2,96	997,04
A12S24	0,43	0,01	3,50E+13	2,86	997,14
A12S13	0,44	0,01	3,51E+13	2,85	997,15
A12N7	0,58	0,01	4,76E+13	2,10	997,90
A12S19	0,46	0,02	3,70E+13	2,70	997,30
A12N12	0,58	0,01	4,68E+13	2,14	997,86
A12S18	0,63	0,02	5,08E+13	1,97	998,03
A12S5	0,56	0,02	4,47E+13	2,24	997,76
A12S11	0,47	0,01	3,76E+13	2,66	997,34
A12S21	0,40	0,01	3,14E+13	3,18	996,82
A12N22	0,93	0,02	7,53E+13	1,33	998,67
A12N4	0,93	0,03	7,45E+13	1,34	998,66
A12N3	0,59	0,01	4,82E+13	2,08	997,92
A7S12	0,71	0,04	5,57E+13	1,80	998,20
A7S15	0,68	0,02	5,54E+13	1,80	998,20
A7N5	0,75	0,02	6,06E+13	1,65	998,35
A7S4	0,91	0,03	7,26E+13	1,38	998,62
A7S21	0,78	0,02	6,34E+13	1,58	998,42
A7N1	0,83	0,08	6,31E+13	1,59	998,41
A7N14	0,97	0,01	7,92E+13	1,26	998,74
A7N18	0,61	0,01	5,02E+13	1,99	998,00
A7S8	1,56	0,03	1,28E+14	0,78	999,22
A7N3	0,95	0,03	7,66E+13	1,31	998,69
A7S2	0,93	0,02	7,59E+13	1,32	998,68
A7S7	0,79	0,01	6,45E+13	1,55	998,45
A7S22	1,28	0,001	1,06E+14	0,94	999,06
A7N7	0,39	0,02	3,02E+13	3,31	996,69
A7S9	1,15	0,02	9,35E+13	1,07	998,93
K	0,22	0,002	1,79E+13	5,60	994,40

4.2 Primerjava vezave peptidov, izraženih na bakteriofagih, na tarčna protitelesa

4.2.1 Primerjava vezave potencialnih mimotopov Amb a 1 na tarčna protitelesa in preverjanje nespecifične vezave na ozadje

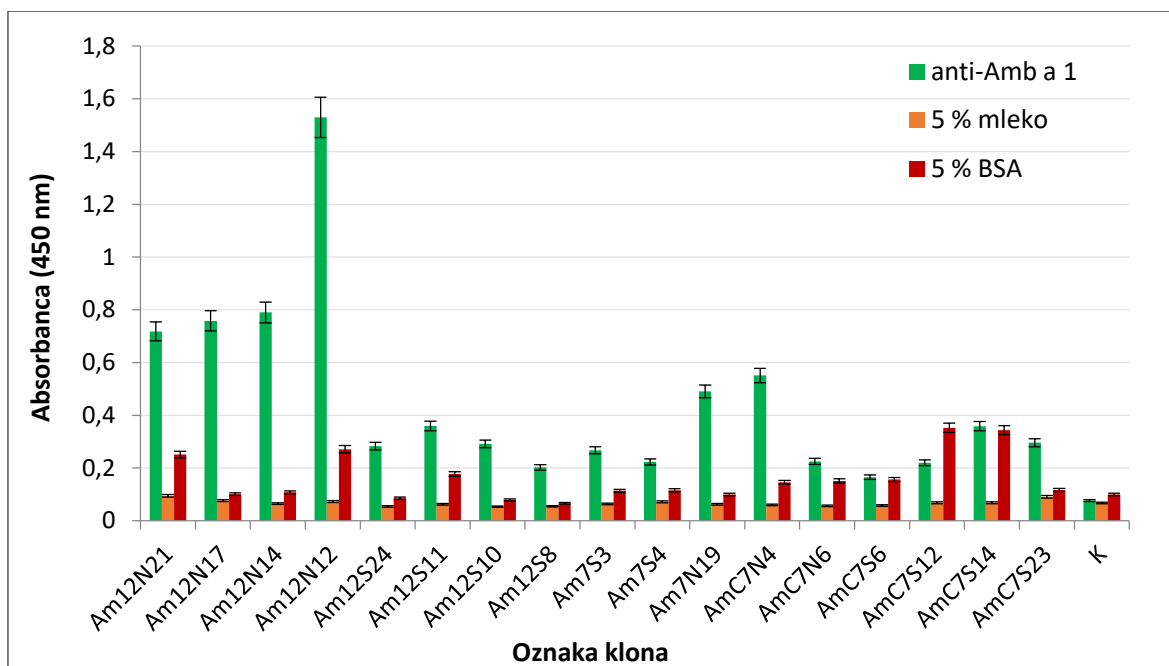
Izhodna koncentracija je znašala 10^{11} fagov/ mL. V vsako vdolbinico MTP smo odpipetirali 100 μ L suspenzije, torej je znašala končna količina fagov v vdolbinici 10^{10} . Graf na *sliki 3* prikazuje rezultate vezave klonov na vdolbinice MTP, prekrite s tarčnimi protitelesi anti-Amb a 1 (zelena barva), na vdolbinice, blokirane s 5 % mlekom (oranžna barva) in vdolbinice, blokirane s 5 % BSA (rdeča barva).

Kot je razvidno iz *slike 3*, po vrednosti absorbance, ki je sorazmerna avidnosti vezave na imobilizirano tarčno protitelo anti-Amb a 1, izstopa šest bakteriofagnih klonov. Govorimo o klonih Am12N21, Am12N17, Am12N14, Am12N12, izoliranih iz bakteriofagne knjižnice Ph.D.-12™, o klonu Am7N19, izoliranem iz bakteriofagne knjižnice Ph.D.-7™, ter o klonu AmC7N4, izoliranem iz bakteriofagne knjižnice Ph.D.-C7C™. Omenjeni bakteriofagni kloni so pokazali najmočnejšo vezavo na tarčna protitelesa. Peptidi, ki jih na svoji površini izražajo, torej posnemajo epitope glavnega alergena ambrozije – Amb a 1. Pri ostalih klonih je znašala vrednost absorbance pod 0,4, pri najslabšem (klon AmC7S6) celo pod 0,2.

Ozadje je v izvedenih testih predstavljal blokirni pufer, s katerim prekrijemo nezasedeno površino v vdolbinicah in preprečimo nespecifične vezave na plastične stene MTP. Nespecifično vezavo bakteriofagnih klonov na ozadje smo testirali v kontrolnih vdolbinicah, v katere nismo imobilizirali tarčnih protiteles, pač pa smo jih prvič prekrili le s 5 % posnetim mlekom v prahu/PBS, drugič pa s 5 % BSA/PBS. Absorbanca, ki prikazuje vezavo bakteriofagnih klonov na vdolbinice, blokirane s 5 % mlekom oz. s 5 % BSA, je pri večini klonov relativno nizka v primerjavi z absorbanco, ki prikazuje vezavo klonov na tarčna protitelesa, kar je dobro, saj to pomeni, da se bakteriofagni kloni niso vezali na mleko oz. BSA, pač pa na naša imobilizirana tarčna protitelesa. Odstopajo absorbance klonov z oznakami AmC7S12, AmC7S6 in AmC7S14. Klona AmC7S6 in AmC7S14

kažeta enako vezavo na BSA in tarčna protitelesa, medtem ko je pri klonu AmC7S12 opazen višji signal vezave na BSA, kakor na tarčna protitelesa.

Klon z oznako K je služil kot kontrola, saj ni pridobljen v selekciji na tarčnih protitelesih anti-Amb a 1 in na svoji kapsidi ne izraža peptidov. Posledično nima afinitete do tarčnega protitelesa oz. z njim ne tvori interakcij, kar potrjuje nizek odziv, ki je primerljiv z odzivom slepe kontrole (vezavi na ozadje).

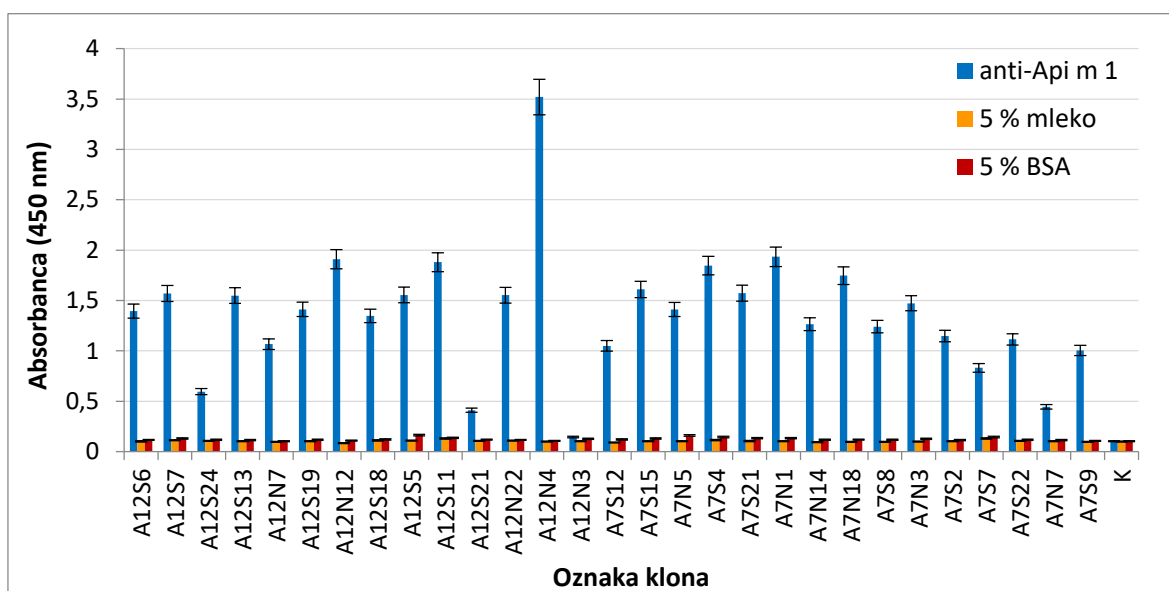


Slika 3: Grafični prikaz rezultatov semikvantitativnega testa ELISA za Amb a 1. Na immobilizirana tarčna protitelesa anti-Amb a 1 ter na ozadje (5 % posneto mleko v prahu v PBS ali 5 % BSA v PBS) smo nanesti 10^{10} bakteriofagnih delcev. Za vsak bakteriofagni klon smo naredili tri paralele. Abscisna os predstavlja bakteriofage, ki na svoji površini izražajo potencialne peptidne mimetike Amb a 1, ter kontrolni bakteriofag K, ki peptidov ne izraža. Vrednosti predstavljajo povprečje treh meritev. Navpični interval napak predstavlja standardni odklon treh ponovitev.

Pri preprečevanju nespecifičnih vezav ima pomembno vlogo tudi pufer za spiranje, ki vsebuje površinsko aktivno snov TWEEN 20. Pomembno je namreč, da med posameznimi koraki testa ELISA nevezane bakteriofage dobro speremo, sicer bi lahko slednji vplivali na izid poskusa in povzročili popačene rezultate.

4.2.2 Primerjava vezave potencialnih mimotopov Api m 1 na tarčna protitelesa in preverjanje nespecifične vezave na ozadje

V primerjavi z Amb a 1, smo pri Api m 1 vrednotili vezavo 30 bakteriofagnih klonov iz dveh bakteriofagnih knjižnic - Ph.D.-12™ in Ph.D.-7™. Količina bakteriofagov, ki smo jo dodali v vsako vdolbinico, znaša 2×10^9 . Vrednost absorbance pri posameznem klonu je premosorazmerna z jakostjo vezave njegovih površinsko izraženih peptidov na imobilizirano tarčno protiteleso anti-Api m 1. *Slika 4* prikazuje rezultate vezave klonov na vdolbinice MTP, prekrte s tarčnimi protitelesi anti-Api m 1 (modra barva), na vdolbinice, blokiranje s 5 % mlekom (oranžna barva) in vdolbinice, blokiranje s 5 % BSA (rdeča barva).

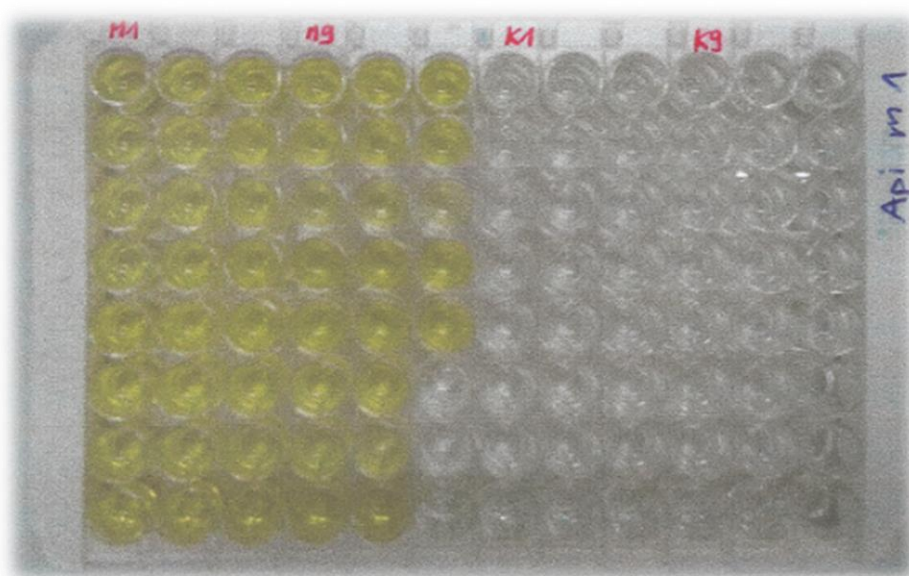


Slika 4: Grafični prikaz rezultatov semikvantitativnega testa ELISA za Api m 1. Na imobilizirana tarčna protitelesa anti-Api m 1 ter na ozadje (5 % posneto mleko v prahu v PBS ali 5 % BSA v PBS) smo nanesti 2×10^9 bakteriofagnih delcev. Za vsak bakteriofagni klon smo naredili tri paralele. Na abscisni osi so predstavljeni bakteriofagi, ki na svoji površini izražajo potencialne peptidne mimotope Api m 1, ter kontrolni bakteriofag K, ki peptidov ne izraža. Vrednosti predstavljajo povprečje meritev in standardni odklon za tri ponovitve.

Glede na rezultate semikvantitativnega testa ELISA, prikazane na *sliki 4*, se je večina klonov na tarčna protitelesa močno vezala. Izmed klonov, izoliranih iz bakteriofagne knjižnice Ph.D.-12™, so se kot najboljši vezalci izkazali kloni A12N12, A12S11 in

A12N4, kot najslabši pa kloni A12S24, A12S21 in A12N3. Izmed klonov, izoliranih iz bakteriofagne knjižnice Ph.D.-7™, pa po jakosti vezave izstopajo kloni A7S4, A7N1 in A7N18, najslabše se je iz omenjene bakteriofagne knjižnice vezal klon z oznako A7N7. Kontrolni klon K na svoji površini ni izražal peptidnih mimetikov, zaradi česar se na imobilizirano primarno protitelo pričakovano ni vezal, kar potrjuje izmerjena absorbanca oz. odziv, primerljiv z odzivom slepe kontrole.

Tudi pri Api m 1 so kot negativna kontrola testa služile vdolbinice MTP, prekrite le s 5 % mlekom v PBS oz. s 5 % BSA v PBS (*slika 5*). V primerjavi z rezultati pri Amb a 1, lahko tukaj rečemo, da so razmerja med višino stolpcev absorbanc pri tarčnih protitelesih in slepih kontrolah večja. Pri vseh klonih je višina stolpcev oz. vrednost absorbance slepih kontrol na približno enakem nivoju, kar pomeni, da se bakteriofagni kloni niso vezali na ozadje (mleko oz. BSA), pač pa na naša imobilizirana tarčna protitelesa – anti-Api m 1.



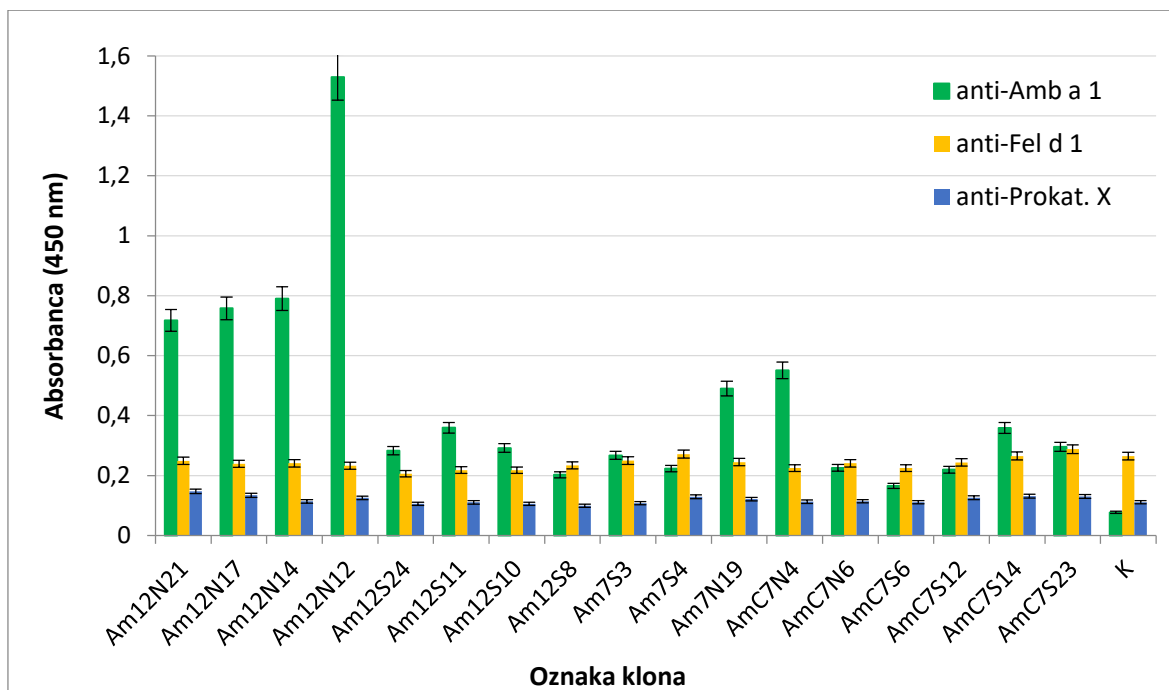
Slika 5: MTP po izvedenem testu ELISA. Vezane bakteriofage smo detektirali z monoklonskimi protitelesi proti bakteriofagom, konjugiranimi s hrenovo peroksidazo, ki katalizira pretvorbo prozornega substrata TMB do modro obarvanega produkta. Ob dodatku raztopine za prekinitev reakcije modra barva nemudoma preide v rumeno. V vdolbinicah z rumeno raztopino so torej prisotni bakteriofagi, ki so se vezali na tarčna protitelesa. Vdolbinice s prozorno tekočino predstavljajo slepe vzorce, ki niso vsebovali tarčnih protiteles, pač pa le mlečne beljakovine iz blokirnega pufra, na katere se bakteriofagi niso vezali, zato v teh vdolbinicah do obarvanja ni prišlo. (Vir: lasten arhiv)

4.3 Preverjanje nespecifične vezave peptidov, izraženih na bakteriofagih, na konstantno (Fc) regijo protiteles

4.3.1 Preverjanje nespecifične vezave potencialnih mimotopov Amb a 1 na konstantno (Fc) regijo protiteles

Za preverjanje nespecifične vezave na Fc regijo protiteles smo izvedli test ELISA, kjer smo vdolbinice MTP namesto s tarčnimi protitelesi anti-Amb a 1 prekrili s kontrolnimi protitelesi, pridobljenimi iz iste vrste, in sicer z zajčjimi protitelesi proti prokatepsinu X ter poliklonskimi zajčjimi protitelesi proti glavnemu mačjemu alergenu. Omenjena tipa protiteles imata enako Fc regijo, vendar različen Fab fragment kot tarčna protitelesa.

Rezultati testa ELISA za Amb a 1 so grafično predstavljeni na *sliki 6*. Z zeleno barvo je prikazana vezava klonov na vdolbinice prekrite s tarčnimi protitelesi anti-Amb a 1. Rumeni in modri stolpci prikazujejo vezavo klonov na kontrolna protitelesa anti-Fel d 1 in anti-Prokatepsin X. Ker gre za kontrole, je dober rezultat poskusa čim nižja vrednost absorbance. Izkazalo se je, da ima šest bakteriofagnih klonov izrazito večje signale pri vezavi na anti-Amb a 1, kot pri vezavi na drugi dve vrsti uporabljenih protiteles. To so bakteriofagni kloni Am12N21, Am12N17, Am12N14, Am12N12, Am7N19 in AmC7N4.



Slika 6: Grafični prikaz rezultatov testa ELISA za preverjanje specifičnosti interakcije s paratopi tarčnih protiteles anti-Amb a 1. Na vse tri vrste imobiliziranih protiteles smo nanegli 10^{10} bakteriofagnih delcev. Za vsak bakteriofagni klon smo izvedli tri ponovitve. Na abscisni osi so predstavljeni bakteriofagi, ki na svoji površini izražajo potencialne peptidne mimotope Amb a 1, ter kontrolni bakteriofag K, ki peptidov ne izraža. Vrednosti predstavljajo povprečje meritev. Navpični interval napak predstavlja standardni odklon treh ponovitev.

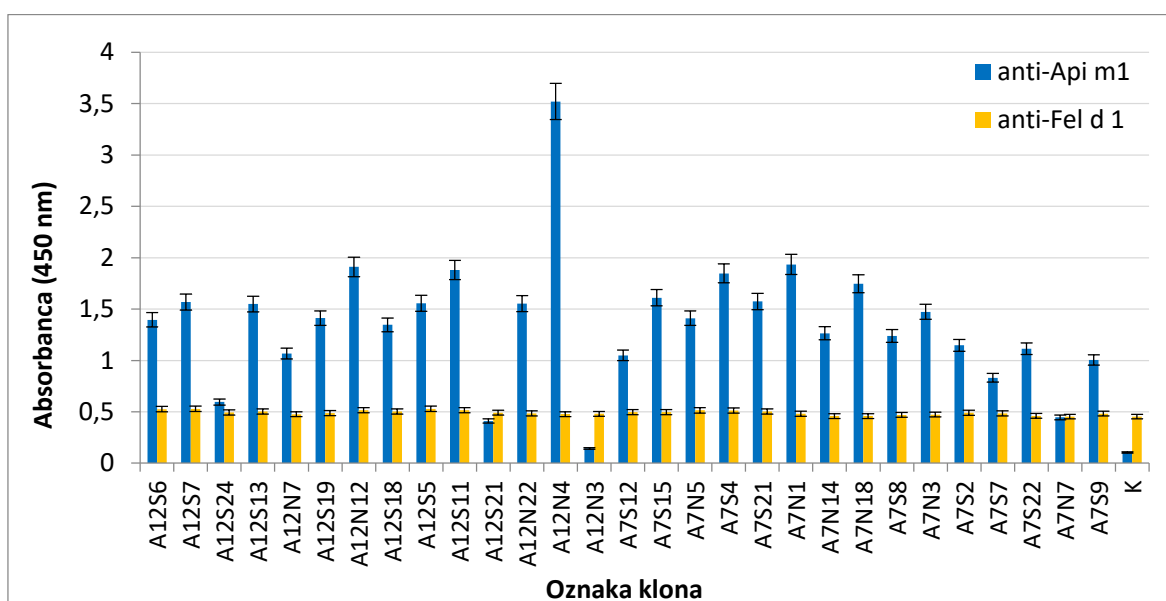
4.3.2 Preverjanje nespecifične vezave potencialnih mimotopov Api m 1 na konstantno (Fc) regijo protiteles

Za preverjanje specifičnosti vezave na protitelesa anti-Api m 1 smo izvedli test ELISA, pri katerem smo kot imobilizirano protitelo v vdolbinicah MTP namesto anti-Api m 1 uporabili protitelesa, pridobljena iz iste vrste, ki imajo enake konstantne dele. Uporabili smo poliklonska zajčja protitelesa proti glavnemu mačjemu alergenu - anti-Fel d 1.

Na *sliki 7* je z modro barvo prikazana vezava klonov na vdolbinice prekrte s tarčnimi protitelesi anti-Api m 1, rumeni stolpci pa prikazujejo vezavo klonov na kontrolna protitelesa anti-Fel d 1. Zaradi uporabe kontrolnih protiteles smatramo čim nižjo vrednost absorbance kot dober rezultat. Pri večini klonov so odzivi, ki prikazujejo vezavo na

kontrolna protitelesa, nižji, kot pri vezavi klonov na anti-Api m 1, kar je ugodno, saj kaže, da lahko v večini primerov govorimo o specifični vezavi.

Kot specifični vezalci glede na *slika 7* najbolj izstopajo kloni A12N12, A12S11, A12N4, A7S4, A7N1 in A7N18, saj je pri njih največja razlika med jakostjo vezave na tarčna in kontrolna protitelesa. Daleč največja razlika v višini stolpcev oz. v jakosti vezave je vidna pri klonu z oznako A12N4. Rezultati kažejo, da je prišlo pri klonih A12S21, A12N3 in A7N7 do močnejše ali enake vezave na kontrolno protitelo anti-Fel d 1, kot na anti-Api m 1, zato smo jih iz nadaljnega vrednotenja izključili.



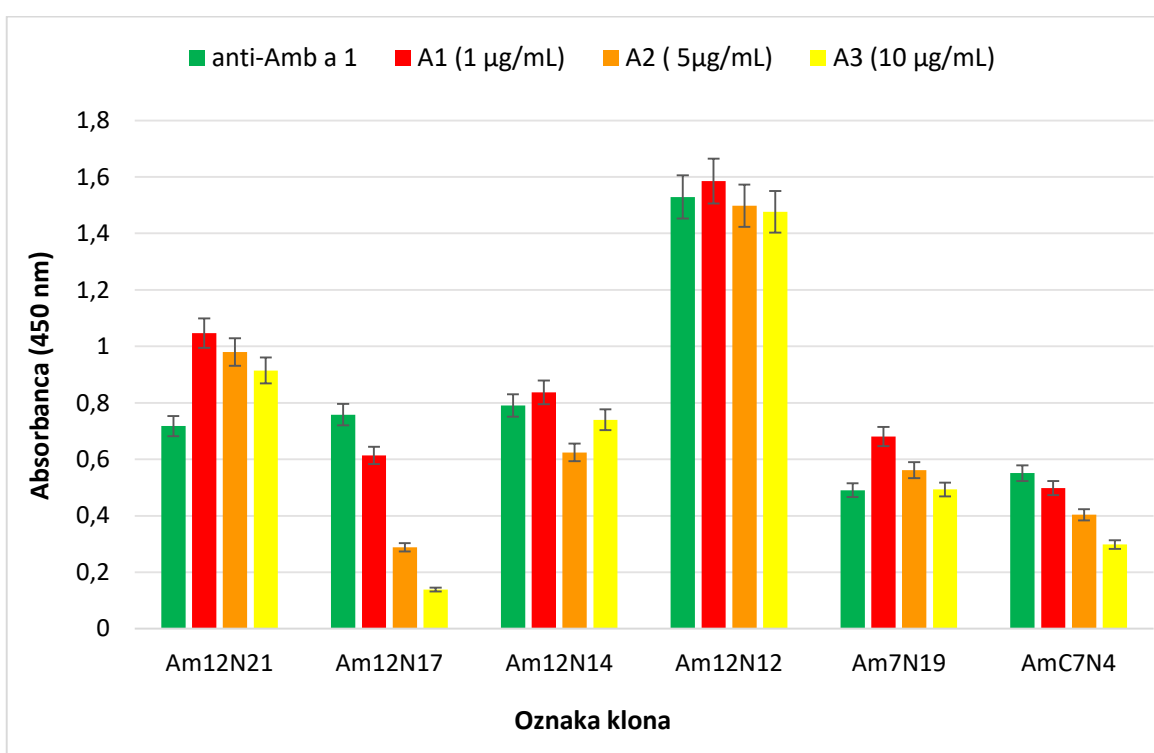
Slika 7: Grafični prikaz rezultatov testa ELISA za preverjanje specifičnosti interakcije s paratopi tarčnih protiteles anti-Api m 1. Na obe vrsti imobiliziranih protiteles smo nanesti 2×10^9 bakteriofagnih delcev. Za vsak bakteriofagni klon smo izvedli tri paralele. Na abscisni osi so predstavljeni bakteriofagi, ki na svoji površini izražajo potencialne peptidne mimotope Api m 1, ter kontrolni bakteriofag K, ki peptidov ne izraža. Vrednosti predstavljajo povprečje meritev in standardni odklon za tri ponovitve.

4.4 Kompetitivni test ELISA z alergenom

4.4.1 Kompetitivni test ELISA z Amb a 1

Pri predhodno izvedenih testih ELISA za Amb a 1 smo izbrali šest bakteriofagnih klonov, ki na površini svoje kapside izražajo peptide, ki posnemajo epitop glavnega alergena

ambrozije. Omenjene klone smo vrednotili naprej s kompetitivnim testom ELISA, kjer smo preverjali izpodrivanje bakteriofagnih klonov s primarnih protiteles s prostim alergenom Amb a 1. Na ta način smo želeli dokazati, da peptidi in alergen tekmujejo za vezavo na iste paratope tarčnih protiteles anti-Amb a 1. Izpodrivanje smo izvedli s tremi različnimi koncentracijami prostega alergena, in sicer 1 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ in 10 $\mu\text{g/mL}$. Z uporabo različnih koncentracij prostega alergena smo želeli dokazati, da večja kot je koncentracija dodanega prostega alergena, več molekul tekmuje za isto vezavno mesto, večje je izpodrivanje in manjši je izmerjen signal. Za vsak klon in vsako koncentracijo smo izvedli tri ponovitve. Rezultate kompetitivnega testa ELISA klonov s prostim alergenom Amb a 1 prikazuje graf na *sliki 8*.



Slika 8: Grafični prikaz rezultatov kompetitivnega testa ELISA z Amb a 1. Zeleni stolpci prikazujejo vezavo klonov na vdolbinice prekrivane z anti-Amb a 1. Rdeči, oranžni in rumeni stolpci prikazujejo vezavo klonov na tarčna protitelesa, ki jim je dodan prost alergen v treh različnih koncentracijah. Za vsak klon in vsako koncentracijo smo opravili tri ponovitve. Vrednosti predstavljajo povprečje meritev in standardni odklon označen z navpičnim intervalom napak na vsakem stolpcu.

Tekmovanje za vezavno mesto med površinsko izraženimi peptidi na bakteriofagih in prostim alergenom potrjuje vezavo peptidov na paratop tarčnega protitelesa. V primeru, da

ne gre za isto vezavno mesto na tarčnem protitelesu, ostane signal po dodatku prostega alergena enak. To pomeni, da prosti alergen faga ni izpodrinil, zato je ta ostal vezan na protitelesu in so se nanj v nadaljevanju vezala sekundarna protitelesa, ki služijo za detekcijo. Signal zaznamo torej samo tam, kjer so tudi po dodatku prostega alergena prisotni vezani fagi. Nespremenjen signal je torej dokaz, da ima prosti alergen drugo vezavno mesto na tarčnem protitelesu kot bakteriofag. Večji padec signala po dodatku prostega alergena lahko pomeni, da je vezava bakteriofaga na tarčno protitelo šibka. Manjši padec signala lahko pomeni, da se bakteriofag veže tako močno, da ga alergen težko izpodrine. Upad signala šele ob dodatku večje koncentracije prostega alergena pomeni, da je vezava faga močna in so potrebne večje koncentracije alergena, da bi ga izpodrinil s protitelesa, kar dokazuje, da fag in alergen tekmujeta za isto vezavno mesto. Najvišjo vezavo do tarčnega protitelesa torej izkazujejo tisti bakteriofagni kloni, pri katerih se vrednost absorbance z večanjem koncentracije dodanega prostega alergena zmanjšuje najmanj intenzivno.

Dva peptida, izražena na površini bakteriofagnih klonov Am12N17 in AmC7N4, kažeta najboljše rezultate izpodrivanja. Z naraščanjem koncentracije dodanega prostega alergena za izpodrivanje se namreč pri obeh klonih vrednost absorbance zmanjšuje (*slika 8*), večjo razliko v višini stolpcev opazimo pri klonu Am12N17. Glede na rezultate izpodrivanja pri ostalih klonih sklepamo, da ne gre za vezalce na iste paratope, torej s prostim alergenom ne tekmujejo za isto vezavno mesto na tarčnem protitelesu. Možno je tudi, da je njihova vezava na protitelesa tako močna, da jih prosti alergen ne more izpodriniti. Pri klonih Am12N21 in Am7N19 je po dodatku prostega alergena nepričakovano prišlo do povečanja signala. Slednje skušamo razložiti s predpostavko, da prosti alergen spremeni konformacijo tarčnega protitelesa in hkrati okrepi vezavo bakteriofagov.

4.4.2 Kompetitivni test ELISA z Api m 1

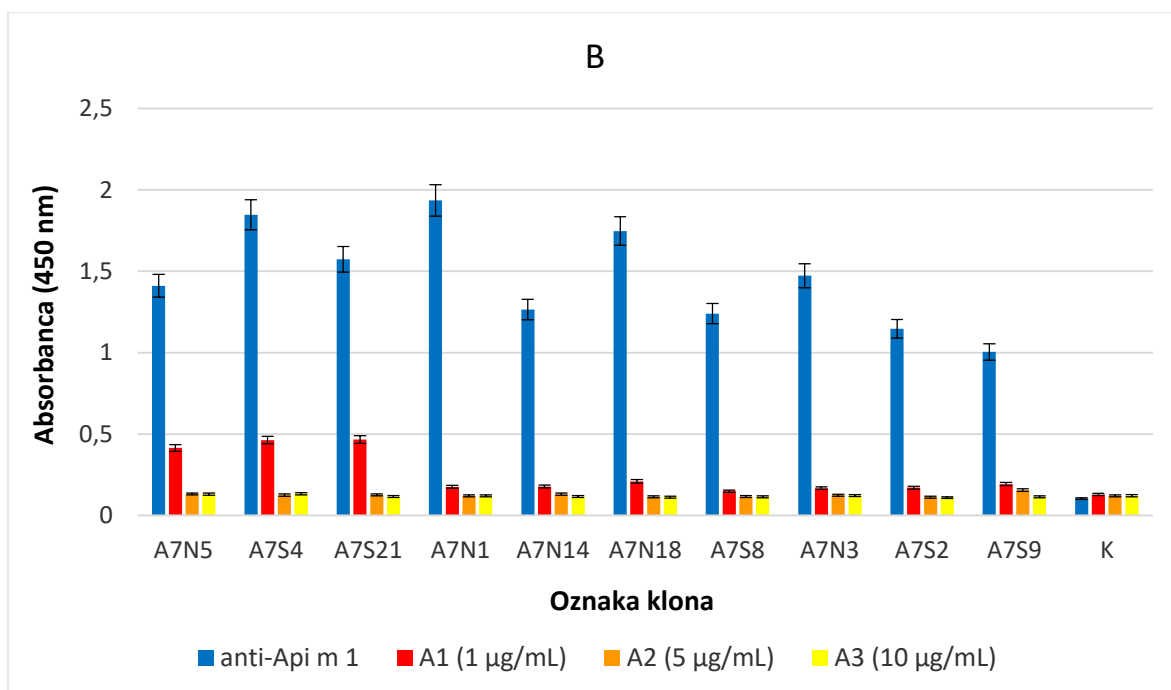
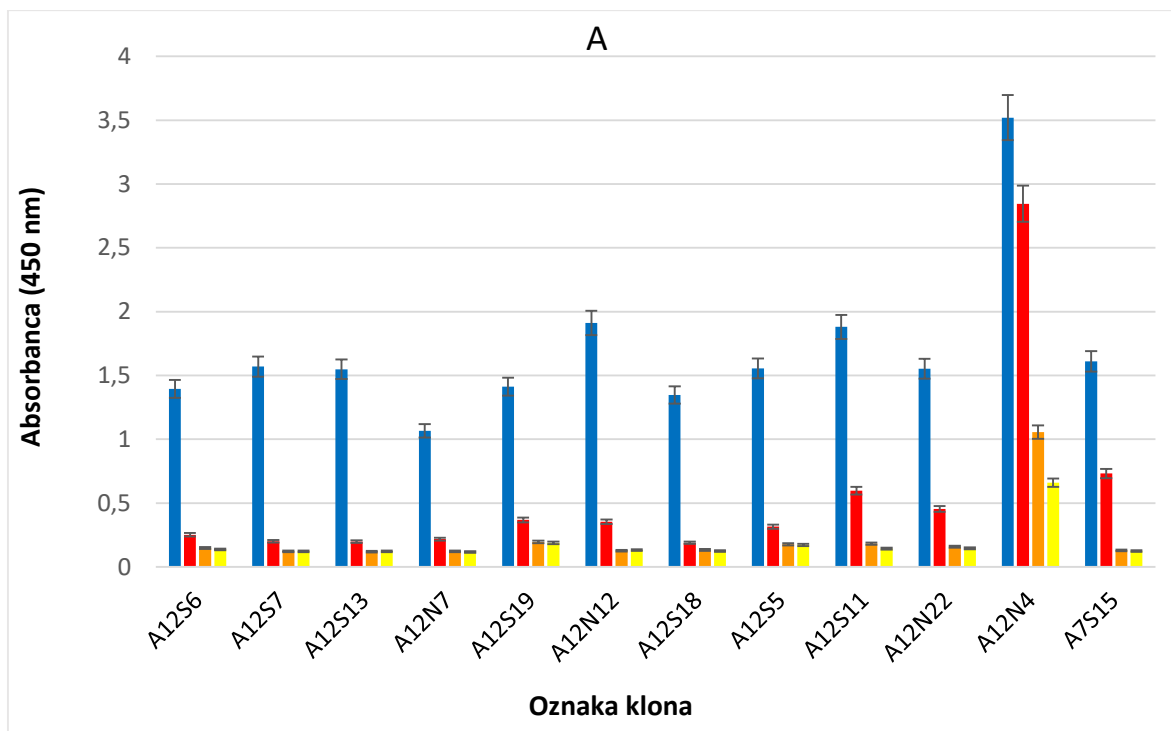
Za razliko od Amb a 1, smo pri Api m 1 v kompetitivni test ELISA vključili 23 bakteriofagnih klonov. Zaradi relativno šibke vezave na tarčna protitelesa ter zaradi enake ali močnejše vezave na tarčna kot na kontrolna protitelesa smo izključili klone A12S24, A12S21, A12N3 in A7N7, dodatno pa so bili izločeni še kloni A7S12, A7S7 in A7S22. Pri ostalih klonih je bil namen kompetitivnega testa potrditi njihovo vezavo na paratope

tarčnih protiteles oz. dokazati njihovo vezavo na iste paratope, na katere se veže alergen. Izpodrivanje smo na enak način izvedli s tremi različnimi koncentracijami prostega alergena, saj smo zopet želeli dokazati, da se z večanjem koncentracije dodanega prostega alergena jakost izpodrivanja poveča, absorbanca oz. izmerjen signal pa posledično zmanjša. Za vsako koncentracijo smo izvedli tri paralele.

Rezultati kompetitivnega testa ELISA s prostim alergenom Api m 1 so zaradi velikega števila klonov in večje preglednosti predstavljeni na dveh grafih, ki jih prikazuje *slika 9*. Modri stolpci predstavljajo vezavo klonov na vdolbinice prekrte z anti-Api m 1. Rdeči, oranžni in rumeni stolpci prikazujejo vezavo klonov na tarčna protitelesa, z dodatkom alergena v treh različnih koncentracijah. Če površinsko izraženi peptidni mimetiki na bakteriofagih tekmujejo s prostim alergenom za vezavna mesta na imobiliziranih tarčnih protitelesih, to potrjuje njihovo vezavo na isti paratop.

Dobljeni rezultati nakazujejo, da je prišlo do izpodrivanja pri večini klonov, kar potrjuje njihovo tekmovanje za isto vezavno mesto (paratop) na tarčnem protitelesu. Pri klonu A12N4 opazimo, da ga prosti alergen ni popolnoma izpodrinil oz. je signal pri najvišji koncentraciji dodanega prostega alergena še vedno relativno visok. Ob dodatku manjše koncentracije prostega alergena, pri omenjenem klonu ni videti tako drastičnega padca signala kot pri ostalih klonih, vendar z večanjem koncentracije alergena signal vendarle pade. Vidimo, da v vdolbinicah z omenjenim bakteriofagnim klonom vrednost absorbance z večanjem koncentracije dodanega prostega alergena upada najmanj intenzivno, kar potrjuje njegovo močno vezavo na tarčno protitelo.

Iz izida poskusa sklepamo, da je večina vrednotenih klonov specifičnih do tarčnih protiteles in tako predstavljajo mimotope alergena Api m 1. Pri zadnjem, kontrolnem klonu K, brez površinsko izraženih peptidov, so vsi stolpci pričakovano na nivoju slepe kontrole.



Slika 9: Grafični prikaz rezultatov kompetitivnega testa ELISA z Api m 1. Modri stolpci prikazujejo vezavo klonov na vdolbinice prekrte z anti-Api m 1. Rdeči, oranžni in rumeni stolpci prikazujejo vezavo klonov na tarčna protitelesa, ki jim je dodan prost alergen v treh različnih koncentracijah. Za vsak klon in vsako koncentracijo smo opravili tri ponovitve. Vrednosti predstavljajo povprečje meritev in standardni odklon označen z navpičnim intervalom napak na vsakem stolpcu.

5 SKLEP

V okviru raziskovalnega dela smo ovrednotili vezavo osemnajstih potencialnih peptidnih mimetikov glavnega alergena ambrozije in tridesetih potencialnih peptidnih mimetikov glavnega alergena čebeljega strupa. Peptidi so bili pridobljeni pri afinitetni selekciji iz bakteriofagnih peptidno-predstavitvenih knjižnic in so bili v procesu vrednotenja izraženi kot fuzijske beljakovine s plaščno beljakovino bakteriofaga M13. Bakteriofagne klonne smo uspešno pomnožili, jih očistili in jim določili koncentracijo, nato pa s prirejenimi encimsko-imunskimi testi (ELISA) ovrednotili njihovo vezavo na tarčna protitelesa.

Za primerjavo vezave bakteriofagnih klonov na tarčna protitelesa smo izvedli semikvantitativni test ELISA z enakimi koncentracijami bakteriofagnih klonov. Pri preverjanju nespecifične vezave na Fc regijo protiteles smo izvedli test ELISA z uporabo kontrolnih protiteles, ki so izhajala iz iste vrste kot tarčna protitelsa. Na ta način smo iz nadaljnjih poskusov izločili nespecifične vezalce. Izvedli smo tudi kompetitivni test ELISA, kjer smo klonne izpodrivali z dodatkom različnih koncentracij prostega alergena in s tem dokazali specifičnost vezave bakteriofagnih klonov na paratop tarčnih protiteles.

Glede na dobljene rezultate lahko rečemo, da nam je uspelo določiti dva mimotopa glavnega alergena ambrozije Amb a 1. Gre za peptidne mimetike, ki so izraženi na površini bakteriofagnih klonov z oznakama Am12N17 in AmC7N4, saj sta ravno omenjena klona pri vseh izvedenih poskusih kazala najboljše rezultate. V nasprotju z Amb a 1, izidi testov za Api m 1 nakazujejo, da specifičnost do tarčnih protiteles izraža večina vrednotenih klonov s površinsko izraženimi peptidnimi mimetiki, ki se tako kažejo kot mimotopi alergena Api m 1. Z izvedenimi poskusi nam je torej v obeh primerih uspelo dokazati specifičnost določenih bakteriofagnih klonov do tarčnih protiteles.

Vsak bakteriofagni klon ima na svoji površini izražen drugačen peptidni mimetik (oz. 5 njegovih kopij) z določenim aminokislinskim zaporedjem. Pri bakteriofagnih klonih, ki smo jim z izvedenimi testi ELISA potrdili avidnost do tarčnega protitelesa, bi lahko v nadaljevanju poskušali poiskati najmanjši skupni motiv v zaporedju peptidov, ki bi lahko bil odgovoren za vezavo na tarčno protitelo. Nadalje bi lahko še preverili, ali se dotični peptidni mimetiki vežejo na protitelesa IgE iz serumov alergičnih bolnikov, za potrditev njihove uporabe v terapevtske namene pa bi bilo potrebno opraviti še dodatne študije in izvesti obsežnejše raziskave.

6 LITERATURA

- [1] <http://www.klinika-golnik.si/dejavnost-bolnisnice/opis-bolezni-in-preiskav/alergija.php> (dostopano 13. 3. 2017)
- [2] Larsen N J, Broge L, Jacobi H: Allergy immunotherapy: the future of allergy treatment, *Drug Discovery Today*, 2016; 21(1): 26-37.
- [3] <http://www.krka.si/sl/v-skrbi-za-vase-zdravje/v-skrbi-za-vase-zdravje/alergija-in-astma/kaj-je-alergija/1421/> (dostopano 13. 3. 2017)
- [4] <http://www.pomurske-lekarne.si/tocka-zdravja/pomlad-in-joj-ze-spet-ta-alergija> (dostopano 13. 3. 2017)
- [5] http://www.mb-lekarne.si/slo/svetovalec/pogosta_vprasanja/-1/ni teme/-1/ni_razvrscanja/8/alergija_in_alergeni (dostopano 13. 3. 2017)
- [6] Brunčko A: Alergija na žuželke, *Obzornik zdravstvene nege*, 1982; 16(1-2): 30-34.
- [7] Štarkl L., 2016, Ozaveščenost o nevarnostih pelinolistne ambrozije in pogostost senzibilizacije za alergene v vdihanem zraku pri izbranih skupinah ljudi v Brežiško-Krški kotlini: magistrsko delo [na spletu]. Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta . [Dostopano 14. maj 2017]. Pridobljeno od: <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?lang=slv&id=82679>
- [8] Žveplan S: Pelinolistna ambrozija, *Hmeljar, Žalec*, 2010; 72(8/12): 59-61.
- [9] Buters J, Alberternst B, Nawrath S et al., "Ambrosia artemisiifolia (ragweed) in Germany. Current presence, allergologic relevance and containment procedure.," *Allergo Journal International* 2015; 24:108–20.
- [10] <http://www.phadia.com/es/5/Productos/ImmunoCAP-Allergens/Weed-Pollens/Allergens/Common-ragweed/> (dostopano 28. 4. 2017)
- [11] Ihler F, Canis M: Ragweed induced allergic rhinoconjunctivitis: current and emerging treatment options., *Journal of Asthma and Allergy* 2015; 8:15-24.
- [12] http://kazalci.arso.gov.si/?data=indicator&ind_id=683 (dostopano 28. 4. 2017)

- [13] Hauser M, Roulias A, Ferreira F, Egger M: Panallergens and their impact on the allergic patient, *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* 2010; 6:1.
- [14] Gril-Jevšek L: Alergija na pik žuželke, Navodila za bolnike, Združenje zdravnikov družinske medicine, 2014
- [15] <http://www.klinika-golnik.si/dejavnost-bolnisnice/opis-bolezni-in-preiskav/alergija-za-pike-zuzelk.php> (dostopano 1. 5. 2017)
- [16] Biló BM, Rueff F, Mosbech H, Bonifazi F, Oude-Elberink JNG: Diagnosis of Hymenoptera venom allergy, *Allergy* 2005; 60:1339-49.
- [17] Alfaya Arias T et. al.: Key Issues in Hymenoptera Venom Allergy: An Update, *The Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 2017; 27(1): 19-31.
- [189] Černe K: Kompleksna sestava in učinki strupa medonosne čebele – od anafilaksije do toksičnosti, *Farmacevtski vestnik* 2009; 60: 319- 25.
- [19] <http://www.czs.si/content/C25> (dostopano 1. 5. 2017)
- [20] Mohamed Ali MAAS: Studies on Bee Venom and Its Medical Uses, *International Journal of Advancements in Research & Technology*, 2012; 1(2).
- [21] Čelesnik Smodiš N, 2014, Ugotavljanje senzibilizacije in spremljanje imunoterapije z rekombinantnimi alergeni iz strupov kožekrilcev: doktorska disertacija [na spletu]. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. [Dostopano 14. maj 2017]. Pridobljeno od: <http://www.dlib.si/details/URN:NBN:SI:DOC-1NDJL5YB>
- [22] David B K, Golden M D: Stinging Insect Allergy, *American Family Physician*, 2003; 67(12): 2541-46.
- [23] Šuntar Erjavšek A: Patient-partner pri izvajanju specifične imunoterapije, *Medicinske sestre in babice - znanje je naša moč*, 7. kongres zdravstvene in babiške nege Slovenije, Ljubljana, 2009; 312E:1-8.
- [24] Košnik M: Zgodnja terapija alergijskih bolezni: Zagotavljanje kakovosti v alergologiji, Slovensko zdravniško društvo, Alergološka in imunološka sekcija, 2006; 8-12.
- [25] Aberle N: Alergen –specifična imunoterapija u liječenju astme i alergijskog rinitisa, *Medix. Supplement* (1311-3002), 2014; 109/110: 164-70.

- [26] Valenta R, Linhart B, Swoboda I, Niederberger V: Recombinant allergens for allergen-specific immunotherapy: 10 years anniversary of immunotherapy with recombinant allergens, *Allergy* 2011; 66: 775–83.
- [27] Stanley JS, King N, Burks AW, Huang SK, Sampson H, Cockrell G, Helm RM, West CM, Bannon GA: Identification and Mutational Analysis of the Immunodominant IgE Binding Epitopes of the Major Peanut Allergen *Ara h 2*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1997; 342(2): 244-53.
- [28] Riemer A, Scheiner O, Jensen-Jarolim E: Allergen mimotopes, *Methods* 32, 2004; 321-27.
- [29] Luzar J, Šrukelj B, Lunder M: Phage display peptide libraries in molecular allergology: from epitope mapping to mimotope-based immunotherapy, *Allergy* 2016
- [30] Strasner, Sara, 2016, Izražanje mimotopov glavnega alergena arašidov *Ara h 2* na površini mlečnokislinskih bakterij *Lactococcus lactis*: enoviti magistrski študij farmacije [na spletu]. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo. [Dostopano 14. maj 2017]. Pridobljeno od: http://www.ffa.uni-lj.si/docs/default-source/knjiznica-doc/magistrske/strasner_sara_mag_nal_2016.pdf?sfvrsn=2
- [31]<http://pubs.rsc.org/en/Image/Get?imageInfo.ImageType=GA&imageInfo.ImageIdentifier.ManuscriptID=C4RA07059C> (dostopano 19. 5. 2017)
- [32]<http://www.biosci.missouri.edu/smithGp/PhageDisplayWebsite/PhageDisplayWebsiteIndex.html> (dostopano 27. 7. 2017)