

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.549>

<https://orcid.org/0000-0003-4415-0986>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Aistė Sližienė

Nauji monokloniniai antikūnai žuvų alergenų nustatymui ir tyrimams

DAKTARO DISERTACIJA

Technologijos mokslai,
Chemijos inžinerija (T 005)

VILNIUS 2023

Disertacija rengta 2018–2023 metais Vilniaus universitete, Gyvybės mokslų centre Biotechnologijos institute.

Mokslinius tyrimus rėmė Europos regioninės plėtros fondo lėšos (projekto Nr. 01.2.2-LMT-K-718-01-0008) pagal dotacijos sutartį su Lietuvos mokslo taryba (LMTLT).

Mokslinė vadovė:

prof. dr. Aurelija Žvirblienė (Vilniaus universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija – T 005).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – prof. dr. Rimantas Daugelavičius (Vytauto Didžiojo universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija – T 005).

Nariai:

dr. Rima Budvytytė (Vilniaus universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija – T 005),

prof. habil. dr. Rūta Dubakienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001),

dr. Algirdas Grevys (Thermo Fisher Scientific R&D (Oslos, Norvegija), technologijos mokslai, chemijos inžinerija – T 005),

dr. Gintautas Tamulaitis (Vilniaus universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija – T 005).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2023 m. spalio mėn. 27 d. 14 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R-401 auditorijoje ir/arba nuotoliniu būdu. Adresas: Saulėtekio alėja 7, LT-10257, Vilnius, Lietuva.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekose ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.549>

<https://orcid.org/0000-0003-4415-0986>

VILNIUS UNIVERSITY

Aistė Sližienė

New Monoclonal Antibodies for Immunodetection and Investigation of Fish Allergens

DOCTORAL DISSERTATION

Technological Sciences,
Chemical Engineering (T 005)

VILNIUS 2023

The dissertation was prepared between 2018 and 2023 during the studies at Vilnius University Life Sciences Centre Institute of Biotechnology.

The research was supported by European Regional Development Fund (Project No. 01.2.2-LMT-K-718-01-0008) under grant agreement with Research Council of Lithuania (LMTLT).

Academic supervisor:

Prof. Dr. Aurelija Žvirblienė (Vilnius University, Technological Sciences, Chemical Engineering – T 005).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Rimantas Daugelavičius (Vytautas Magnus university, Technological Sciences, Chemical Engineering – T 005).

Members:

Dr. Rima Budvytytė (Vilnius University, Technological Sciences, Chemical Engineering – T 005).

Prof. Habil. Dr. Rūta Dubakienė (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

Dr. Algirdas Grevys (Thermo Fisher Scientific R&D (Oslo, Norway), Technological Sciences, Chemical Engineering – T 005).

Dr. Gintautas Tamulaitis (Vilnius University, Technological Sciences, Chemical Engineering – T 005).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 14:00 hour on 27 October 2023 in Room R401 of the Life Sciences Center (Vilnius University). Address: Sauletekio av. 7, LT-10257, Vilnius, Lithuania.

The text of this dissertation can be accessed at the libraries of Vilnius University as well as on the website of Vilnius University: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

SANTRUMPOS

Alt a 6 – *Alternaria alternata* grybo enolazė;
APS – amonio persulfatas;
ASIT – alergenų specifinė imunoterapija;
bp – bazių pora;
BSA – jaučio serumo albuminas (angl. *bovine serum albumin*);
Cyp c 1 – paprastojo karpio β -parvalbuminas;
Cyp c 2 – paprastojo karpio β -enolazė;
Clu h 1 – atlantinės silkės β -parvalbuminas;
DMEM – *Dulbecco* modifikuota *Eagle* terpė;
EoE – eozinofilinis ezofagitas;
Eso lu 1 – europinės lydekos β -parvalbuminas;
FBS – fetalinis veršiuko serumas (angl. *fetal bovine serum*);
Gad c 1 – Baltijos menkės β -parvalbuminas;
Gad m 1 – atlantinės menkės β -parvalbuminas;
Gad m 2 – atlantinės menkės β -enolazė;
Gal d 8 – vištos α -parvalbuminas;
Gal d 9 – vištos β -enolazė;
HAT – hipoksantinas, aminopterinas ir timidinas;
HRP – krienų peroksidazė (angl. *horseradish peroxidase*);
IB – imunoblota;
IFA – imunofermentinė analizė (angl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)*);
Ig – imunoglobulinas;
IgE – imunoglobulinas E;
IL – interleukinas;
IMBT – imobilizacijos buferinis tirpalas;
IPTG – izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidas;
iRNR – informacinė RNR (angl. *messenger RNA*);
 K_d – tariamoji giminingumo konstanta;
kDa – kilodaltonas;
kDNR – kopijinė DNR;
LB – *Luria-Bertani* mitybinė terpė;
Lep w 1 – paprastojo megrimo β -parvalbuminas;
MAk – monokloniniai antikūnai;
MBP – maltozę surišantis baltymas (angl. *maltose binding protein*);
NDS – natrio dodecilsulfatas;
ODM – odos dūrio mėginio testas;
Onc m 1 – vaivorykštinio upėtakio β -parvalbuminas;

OT – optinis tankis;
PAk – polikloniniai antikūnai;
Pan h 1 – siaminės pangasijos β -parvalbuminas;
Pan h 2 – siaminės pangasijos β -enolazė;
PBS – fosfatinis buferinis tirpalas;
PBS-T – PBS su 0,1 % Tween-20;
PEG – polietileno glikolis;
PGR – polimerazės grandininė reakcija;
PMSF – fenilmetilsulfonilchloridas;
POM – provokacinis oralinis mėginys;
PVDF – polivinildifluoridas;
RE – restrikcijos endonukleazė;
RT – kambario temperatūroje (angl. *room temperature*);
Sal s 1 – atlantinės laišos β -parvalbuminas;
Sal s 2 – atlantinės laišos β -enolazė;
Sco s 1 – atlantinės skumbės β -parvalbuminas;
SDS-PAGE – baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis (angl. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*);
Seb m 1 – didžiojo jūrinio ešerio β -parvalbuminas;
Shark – Kaliforninio šakadančio ryklio α -parvalbuminas;
sIgE – pacientų kraujo serume esantys alergeniui specifiniai IgE;
TB – taškinis blotas;
TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletano-1,2-diaminas;
TEV – cisteino proteazė iš *Tobacco etch* viruso;
Thu a 1 – gelsvauodegio tuno β -parvalbuminas;
Thu a 2 – gelsvauodegio tuno β -enolazė;
TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidinas;
TRIS – 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis;
VU GMC BTI EGIS – Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos instituto Eukariotų genų inžinerijos skyrius;
VU GMC BTI ILS – Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos instituto Imunologijos skyrius.

TURINYS

SANTRUMPOS	5
ĮVADAS	10
LITERATŪROS APŽVALGA	14
1.1. Alergija maistui	14
1.1.1. Alergijos maistui tipai	18
1.1.2. Alergijos maistui nustatymo būdai	20
1.1.3. Alergijos maistui gydymas	22
1.2. Alergenai	25
1.3. Alergija žuviai	27
1.4. Žuvies alergenai	31
1.4.1. Parvalbuminas	31
1.4.2. β-enolazė	36
1.4.3. Kiti žuvų alergenai	37
1.5. Rekombinantiniai žuvų alergenai	38
1.6. Antikūnai	41
1.7. Monokloniniai antikūnai	44
1.7.1. Monokloniniai antikūnai prieš žuvų alergenų	46
1.8. Alergenų ekstraktai	47
1.9. Žuvies alergenų nustatymo metodai	48
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	52
2.1. Medžiagos	52
2.1.1. Bakterijų kamienai ir vektoriai	52
2.1.2. Terpės	52
2.1.3. Tirpalai	52
2.1.4. Rinkiniai	54
2.1.5. Reagentai	54
2.1.6. Alergenų ekstraktai ir maisto produktai	56
2.1.7. Antigenai, antikūnai ir rekombinantiniai baltymai	56

2.1.8. Eksperimentiniai gyvūnai	56
2.1.9. Biologiniai žmogaus kraujo mėginiai	57
2.1.10. Pradmenys ir sintetiniai genai	57
2.2. Metodai	58
2.2.1. Rekombinantinių alergenų kūrimas	58
2.2.2. Monokloninių antikūnų kūrimas	63
2.2.3. Polikloninių antikūnų surinkimas	67
2.2.4. Antikūnų gryninimas iš hibridomų augimo terpės.....	67
2.2.5. Antikūnų žymėjimas krienų peroksidaze	68
2.2.6. Metodai, skirti rekombinantinių alergenų ir antikūnų tyrimams.....	69
2.2.7. Rekombinantinių alergenų hidrolizė TEV proteaze.....	75
2.2.8. Alergenų ekstraktų ruošimas laboratorijos sąlygomis	75
2.2.9. Baltymų koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu	75
2.2.10. Bioinformatiniai metodai	76
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	77
3.1. Rekombinantinių alergenų sintezė ir gryninimas.....	77
3.2. Rekombinantinių alergenų alergeniškumo tyrimai	83
3.3. Monokloninių antikūnų prieš žuvies alergenų kūrimas	86
3.4. Monokloninių antikūnų apibūdinimas	88
3.5. Monokloninių antikūnų kryžminis specifiškumas	89
3.6. Monokloninių antikūnų sąveika su žuvies ekstraktais	93
3.7. Monokloninių antikūnų sąveika su kitų organizmų tiksliniais baltymais	100
3.8. Monokloninių antikūnų epitopų analizė.....	104
3.9. Monokloninių antikūnų taikymas parvalbuminų išskyrimui iš alergenų ekstraktų	111
3.10. Monokloninių antikūnų taikymas parvalbuminų aptikimui žuvų ekstraktuose.....	113
REZULTATŲ APIBENDRINIMAS	119
IŠVADOS.....	121

LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	122
PRIEDAI	134
SUMMARY	149
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	177
PATENTAI	178
PRANEŠIMAI KONFERENCIJOSE	179
CURRICULUM VITAE	181
PADĖKA.....	182

ĮVADAS

Pienas, vištos kiaušiniai, kviečiai, žuvis, soja, žemės riešutai, vėžiagyviai ir moliuskai, bei medžių riešutai ir sėklos yra laikomi pagrindiniais maisto alergenais, galinčiais alergija sergantiems pacientams sukelti skrandžio ar žarnyno veiklos sutrikimus, odos bėrimą, bronchų spazmą ir kartais ūmią, sisteminę alerginę reakciją – anafilaksiją. Žuvyje yra gausu vertingų nepakeičiamų aminorūgščių (pvz., lizino, metionino, fenilalanino ir kitų), polinesočiųjų riebalų rūgščių ir riebaluose tirpių vitaminų. Dėl žuvyje esančių vertingų maistinių medžiagų ji laikoma svarbiu maisto produktu ir vis dažniau įtraukiama į mitybos racioną. Pasaulyje vis didėjant žuvies vartojimui, kartu yra stebimas ir didėjantis alergijų žuviai atvejų skaičius. Manoma, kad 0,1–0,4 % pasaulio gyventojų yra alergiški žuviai. Alergija žuviai gali pasireikšti ne tik suvalgius žuvies, bet ir gaminant žuvies patiekalus arba dirbant žuvies perdirbimo įmonėje (palietus jos paviršių ar įkvėpus garų). Alergijos simptomai gali būti dilgėlinė, rinitas, vėmimas, pilvo skausmai ir kiti, retais atvejais gali ištikti anafilaksinis šokas. Pacientai gali būti įsijautrinę vienai arba kelioms skirtingoms žuvų rūšims. Tai gali priklausyti nuo žmogaus mitybos įpročių ir geografinio regiono, kuriame jis gyvena, nes ten gali būti aptinkamos tik tam tikros žuvų populiacijos. Gydant alergiją žuviai, pacientams yra rekomenduojamas visiškas žuvies ir jos produktų vengimas, nors yra nustatyta atvejų, kuomet specifinei žuvies rūšiai įsijautrinęs pacientas galėtų valgyti kitos rūšies žuvį ir jam nepasireikštų jokie alergijos simptomai. Maisto ir kosmetikos produktų sudėtyse yra skatinama pažymėti, ar į jų sudėtį įeina žuvų produktai, siekiant taip apsaugoti žmones nuo nepageidaujamų alerginių reakcijų. Deja, dėl klaidingo žymėjimo ar dėl produktų gamyboje pasitaikančių užteršimo šių reakcijų išvengti nepavyksta. Dėl to kuriamos analitinės sistemos, kurios būtų skirtos žuvų alergenų aptikimui maisto produktuose ar kituose analizuojamuose mėginiuose. Tokių sistemų kūrimui gali būti naudojami rekombinantiniai žuvų alergenai ir jiems specifiniai monokloniniai antikūnai.

Žuvies alergenai, t. y. baltymai, kuriems yra įsijautrinę žuviai alergiški pacientai, yra nustatyti ir apibūdinti daugiau nei 40 skirtingų žuvų rūšių.

β -parvalbuminas, β -enolazė, aldolazė A, tropomiozinas, kolagenas ir vitelogeninas yra daugiausiai tirti žuvies alergenai, kurie aptinkami žuvų mėsoje, kauluose, odoje ar žuvų ikruose. Pagrindiniais žuvies alergenais laikomi β -parvalbuminai, sukeltantys alergijos simptomus didžiąjai daliai pacientų (> 90 %). Tai 10–12 kDa termostabilūs baltymai, aptinkami kaulinių žuvų (pvz., karpio, silkės, šamo) raumenyse. Tuo tarpu α -parvalbuminai yra nustatomi kremzlinių žuvų (pvz., kaliforninio šakadančio ryklio, rajos)

raumenyse ir jie laikomi alergijų nesukeliančiais baltymais (nealerginiais). Analizuojant skirtingų žuvies rūšių (pvz., menkės, lašišos, karpio) β -parvalbuminų aminorūgščių sekas buvo nustatytas daugiau nei 60 % sutapimas. Tai galėtų paaiškinti, kodėl pacientai gali būti įsijautrinę kelioms skirtingoms žuvų rūšims. β -parvalbuminai yra aptikti ir apibūdinti daugiausiai pasaulyje vartojamų žuvų rūšyse (pvz., atlantinės lašišos, atlantinės menkės, paprastojo karpio, siaminės pangasijos, geltonpelekio tuno ir kitose). Yra sukurta keletas rekombinantinių β -parvalbuminų, kuriuos galima taikyti analizuojant šių baltymų struktūras, bei įvertinti, kokie veiksniai gali lemti šių alergenų struktūros pokyčius, kurie yra svarbūs kuriant hipoalerginius β -parvalbuminų variantus, skirtus alergenų specifinei imunoterapijai. Taip pat pastebėta atvejų, kuomet žuviai alergiško paciento serume esantys E klasės imunoglobulinai (IgE) kryžmiškai sąveikauja su varlės, krokodilo arba vištos α -parvalbuminiais.

Kitas svarbus žuvų alergenai yra β -enolazė. Tai 50 kDa termolabilus fermentas, irgi aptinkamas žuvų raumenyse. Šis alergenai kol kas nustatytas ir ištirtas tik penkiose skirtingose žuvų rūšyse, tačiau buvo pastebėta, kad vis daugiau žuviai alergiškų pacientų būna įsijautrinę ir šiam baltymui, todėl jis tampa vis svarbesniu žuvies alergenu.

Yra sukurta keletas žuvų parvalbuminams specifinių monokloninių ir polikloninių antikūnų, tačiau žuvų β -enolazei specifinių antikūnų nėra sukurta.

Alergenų ekstraktas yra iš natūralaus alergeno šaltinio išskirtas alergenų ir kitų junginių mišinys. Dėl netinkamų ekstrakto paruošimo ir laikymo sąlygų, tam tikro alergeno komponento kiekis ekstrakto gali sumažėti arba jo iš viso gali nebūti, o tai gali lemti klaidingus atliekamų alergijos testų rezultatus. Monokloniniai antikūnai sukurti prieš alergenų ekstraktus gali būti pritaikyti alergenų ekstraktų standartizavimui, t. y. konkretaus alergeno nustatymui ir jo kiekio įvertinimui paruoštame ekstrakto. Tokiu būdu būtų galima užtikrinti tinkamus ekstraktų paruošimo protokolus ir geresnę jų kokybę, kadangi ekstraktai yra naudojami alergijų diagnostikai.

Darbo tikslas

Sukurti ir apibūdinti naujus monokloninius antikūnus prieš žuvų alergenų, skirtus žuvų β -parvalbuminų ir β -enolazių nustatymui skirtingų žuvų rūšių alergenų ekstraktuose.

Darbo uždaviniai

1. *Escherichia coli* ląstelėse susintetinti rekombinantinius alergenų, sulietus su maltoze surišančiu baltymu (MBP), ir įvertinti jų antigenines savybes.
2. Sukurti hibridomų linijas, sekretuojančias monokloninius antikūnus (MAk) prieš žuvų alergenų: atlantinės menkės β -parvalbuminą, paprastojo karpio β -parvalbuminą ir β -enolazę.
3. Nustatyti naujų MAk afiniškumą, iširti jų kryžmines reakcijas su skirtingų žuvų rūšių ir kitų gyvūnų alergenais, identifikuoti jų atpažįstamus epitopus.
4. Įvertinti MAk gebėjimą aptikti žuvų alergenų įvairių žuvų rūšių ir kitų gyvūnų raumenų ekstraktuose.

Darbo mokslinis naujumas ir praktinė reikšmė

Monokloniniai antikūnai (MAk) prieš tikslinį alergeną gali būti pritaikyti tiek paties alergeno charakterizavimui, jo struktūros analizei, tiek kuriant analitines sistemas, skirtas alergeno aptikimui tiriamuosiuose mėginiuose. Šiame darbe buvo sukurta nauja kolekcija MAk prieš žuvies alergenų, kurie sąveikavo tiek su rekombinantiniais, tiek su natūraliais skirtingų žuvų rūšių alergenais. Plačiu kryžminiu reaktyvumu pasižymintys MAk prieš žuvų parvalbuminus galėtų būti pritaikyti šių baltymų nustatymui alergenų ekstraktuose ir pakeisti šiuo metu dažniausiai naudojamą komercinį MAk PARV-19, sukurtą prieš varlės parvalbuminą.

Pirmą kartą sukurti MAk prieš paprastojo karpio β -enolazę, kurie atpažino ne tik žuvų, bet ir kitų organizmų enolazes. Šie MAk patentuoti – gautas Lietuvos patentas ir pateikta tarptautinė patentinė paraiška.

Šiame tyrime pirmą kartą iš karpio raumenų buvo išskirta ir susintetinta rekombinantinė paprastojo karpio β -enolazė, kuri patvirtinta kaip naujas žuvies alergenas. Tiriant šio baltymo alergeniškumą, buvo nustatyta, kad žuviai alergiškų pacientų serume esantys IgE klasės antikūnai sąveikauja su šiuo žuvies baltymu. Todėl 2020 metais, remiantis mūsų gautais rezultatais, karpio β -enolazė buvo pripažinta nauju žuvies alergenu ir Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) sukurtoje WHO/IUIS alergenų nomenklatūros duomenų bazėje užregistruota pavadinimu Cyp c 2.

Šio darbo metu buvo susintetinta 12 skirtingų žuvų rūšių rekombinantinių parvalbuminų, kurie ne tik pasižymėjo alergeniškumu, bet ir buvo pritaikyti atliekant MAk apibūdinimą ir tiriant jų kryžminį reaktyvumą. Be to, buvo pasirošta skirtingų žuvies rūšių alergenų ekstraktų kolekcija, į kurią buvo

įtrauktos kelios Lietuvoje gyvenančios žuvų rūšys (stinta ir pūgžlys), kurių alergenai iki šiol nebuvo tirti.

Atlikti tyrimai parodė, kad žuvų β -parvalbuminai turi bendrų epitopų su vištos α -parvalbuminu, taigi, žuvų β -parvalbuminui įsijautrinę pacientai taip pat gali būti alergiški ir vištos α -parvalbuminui. Susintetinus rekombinantinį vištos α -parvalbuminą, buvo patvirtinta, kad žuvims alergiški pacientai gali būti įsijautrinę ir vištos alergeniui. Tiriant MAK kryžminį specifiškumą su įvairiais parvalbuminiais, pirmą kartą buvo parodyta, kad žuvų β -parvalbuminams specifiški MAK geba atpažinti ir sąveikauti ne tik su vištos, bet ir su kiaulės raumenyse esančiais parvalbuminiais, kas iki šiol nebuvo žinoma.

Šiame tyrime sukurti MAK geba atpažinti ir aptikti tiek žuvies, tiek kitų organizmų parvalbuminus ir enolazes, todėl šie antikūnai gali būti pritaikyti alergenų ekstraktų sudėties tyrimams ir jų standartizavimui.

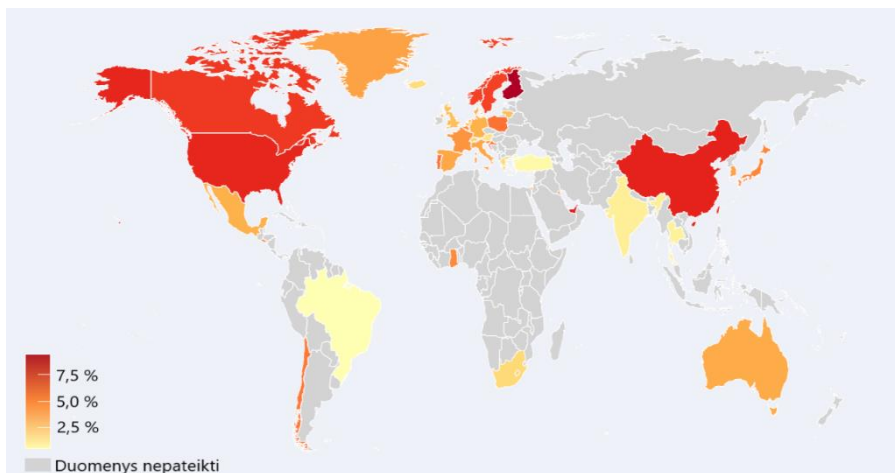
Ginamieji teiginiai

1. *Escherichia coli* ląstelėse susintetinta 14 rekombinantinių alergenų, kurie turi taisyklingą antigeninę struktūrą ir tinka alergenams specifiškų MAK kūrimui bei apibūdinimui.
2. Identifikuotas naujas alergenai – paprastojo karpio β -enolazė.
3. Sukurti nauji MAK prieš žuvies alergenai, kurie atpažįsta konservatyvius epitopus ir kryžmiškai reaguoja su skirtingos kilmės homologais.
4. Sukurtieji nauji MAK gali būti pritaikyti žuvų alergenų tyrimams bei imunologinių metodų, skirtų alergenų ekstraktų analizei, kūrimui.

LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Alergija maistui

Per pastaruosius dešimtmečius visame pasaulyje nustatoma vis daugiau alergijos maistui atvejų (6–13 % visos žmonių populiacijos), ypač išsivysčiusiose šalyse (1.1 pav.) (Mayorga et al., 2021; Sampath et al., 2020). Alergija maistui yra pakitusi organizmo imuninė reakcija, kuri gali pasireikšti suvalgius tam tikro maisto produkto (Rudzevičienė, 2021). Skirtinguose pasaulio regionuose, priklausomai nuo mitybos įpročių ir geografinės padėties, gyventojai gali būti alergiški tam tikriems maisto produktams. Pavyzdžiui, Ganoje buvo nustatyta, kad 5–16 metų amžiaus vaikai dažniausiai yra alergiški ananasui, papajai, apelsinui ir mangui. Tuo tarpu Šiaurės Amerikoje gyvenantys vaikai yra įsijautrinę žemės riešutams, karvės pienui, vištos kiaušiniams, vėžiagyviams ir sojai (Yu et al., 2016).



1.1 pav. Nustatomų maisto alergijos atvejų vaikams paplitimas visame pasaulyje (pritaikyta pagal Brough et al., 2022).

Pagrindiniai alergiją sukeltantys maisto produktai, kurie sudaro apie 90 % visų alergijos maistui atvejų, yra karvės pienas, vištos kiaušiniai, žemės riešutai, soja, kviečiai, žuvis, medžių riešutai (migdolai, braziliški riešutai, anakardžiai, lazdyno riešutai, makadamijos riešutai, pekano riešutai, pušies riešutai (pignolija), pistacijos ir graikiniai riešutai), vėžiagyviai ir moliuskai (1.2 pav.) (Mayorga et al., 2021; Stewart et al., 2012; Boye, 2012). Alerginės reakcijos karvės pienui ir vištos kiaušiniams yra vienos iš dažniausiai nustatomų alergijų vaikams. Buvo pastebėta, kad vaikai dažnai šias alergijas „išauga“, t. y. išsivysto klinikinė oralinė tolerancija. Tuo tarpu alergija žemės

riešutams gali išlikti visą gyvenimą (Iweala et al., 2018). Suaugusiems, be alergijos žemės riešutams ir medžių riešutams, alergija jūros gėrybėms (žuviai, vėžiagyviams ir moliuskams) yra viena iš dažniausiai nustatomų maisto alergijų (Yu et al., 2016). Manoma, kad alergiją maistui gali lemti tiek tam tikri vidiniai (pvz., žmogaus genetika, biochemija, fiziologija), tiek išoriniai (pvz., gyvenamoji aplinka, valgomi maisto produktai) veiksniai (Liu and Sathe, 2018). Pavyzdžiui, vieno atlikto tyrimo metu buvo pastebėta, kad atopiniu dermatitu sergantys vaikai dažniau būna alergiški maisto produktams, negu šia liga nesergantys vaikai (Eigenmann et al., 1998).



1.2 pav. Europos sąjungoje dažniausiai maisto alergiją arba netoleravimą sukeliančios medžiagos ir produktai, kurie pagal Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (ES) Nr. 1169/2011, Higienos norma HN 119:2014, turi būti nurodyti ženklinant fasuotus maisto produktus ir nurodyti prie informacijos apie viešojo maitinimo įmonių tiekiamus patiekalus (https://europa.eu/youreurope/business/product-requirements/food-labelling/general-rules/index_lt.htm, tikrinta 2023-06-09) (pritaikyta pagal <https://www.pid-labelling.co.uk/multisite-allergen-labelling-system-for-natashas-law/>).

Dilgėlinė, angioedema, odos paraudimas, viduriavimas, vėmimas, pilvo skausmai, astma, alerginis rinitas yra dažniausi alergijos simptomai, kurie pasireiškia pacientams esant alergijai maistui (1.1 lentelė). Deja, tam tikruose maisto produktuose (pvz., žuvyse, vėžiagyviuose, piene, kiaušiniuose, vaisiuose) esantys alergenai pacientams gali sukelti ir anafilaksinį šoką. Anafilaksija yra sunki sisteminė padidėjusio jautrumo reakcija, kurios metu sukelti įvairūs simptomai gali pažeisti odos, virškinimo, kvėpavimo, širdies ir kraujagyslių sistemas. Išanalizavus keletą klinikinių atvejų buvo pastebėta,

kad anafilaksinę reakciją gali sukelti labai nedidelis maisto alergeno kiekis. Pavyzdžiui, aprašytas atvejis, kai per kelias minutes mergaitę išbėrė dilgėliniu bėrimu, jai patino veidas ir lūpos, atsirado sloga ir silpnumas po to, kai ji išgėrė vandenį iš puodelio, kuriame prieš tai buvo įpiltas kefyras. Taip pat aprašyti atvejai, kai pacientus ištiko anafilaksinis šokas, kai jie sportavo praėjus 1–4 valandom po to, kai jie suvalgė maisto produkto, galinčio sukelti alergiją (pvz., kviečių, riešutų, žuvies, pieno, obuolių) (Rudzevičienė, 2021).

1.1 lentelė. Alergijos maistui simptomai (pritaikyta pagal Rudzevičienė, 2021).

Organų sistemos	Simptomai
<i>Oda</i>	Dilgėlinė; angiodema; niežulys; paraudimas.
<i>Virškinimo organai</i>	Niežėjimas burnoje; lūpų, liežuvio ir gomurio tinimas; vėmimas; viduriavimas; pilvo skausmai; pilvo pūtimas; vidurių užkietėjimas; pakitusi išmatų konsistensija, priemaišos išmatose.
<i>Kvėpavimo organai</i>	Čiaudulys; kosulys; rinorėja (nosies ertmės prisipildymas gleivėmis); švokštimas; stridora (šiurkštus, triukšmingas kvėpavimas); balso užkimimas; dusulys.

Alergijos simptomai gali atsirasti ne tik suvalgius maisto produkto, bet taip pat palietus jo paviršių ar įkvėpus garų ruošiant patiekalus. Pavyzdžiui, buvo nustatyta, kad keliems maisto perdirbimo įmonėse dirbantiems asmenims įvairius alergijos simptomus (astma, alerginė sloga ar kontaktinė dilgėlinė), sukėlė maisto produktai (pvz., žuvis, vėžiagyviai, kviečiai, vaisiai ir daržovės), su kuriais jie dirbo (Rudzevičienė, 2021; Dahlman-Höglund et al., 2013). Nustatyta, kad 30–50 % visų lateksui alergiškų pacientų yra įsijautrinę kai kuriems augalinės kilmės produktams (pvz., avokadui, bananui, kiviui, persikui, pomidorui). Maisto ir kosmetikos produktuose naudojami dažikliai, paruošti iš ciberžolės, paprikos, daržinės urlijos medžių sėklų ir vabzdžių taip pat gali pacientams sukelti alergijos simptomus, tokius kaip alerginį rinitą, astmą, netgi yra aprašyti keli anafilaksijos atvejai. Be to, aprašyti atvejai, kuomet alergines reakcijas suaugusiems sukelia įvairūs prieskoniai (pvz., kmynai, krapai, kalendros, svogūnai) (Rudzevičienė, 2021).

Be alergijos maistui, pacientams gali pasireikšti ir padidėjęs nealerginis jautrumas maistui. Nepageidaujamos reakcijos į maistą gali atsirasti dėl maisto produktuose esančių toksinių medžiagų (pvz., aflatoksinai aptinkami pelijančiuose riešutuose, solaninas – neprinokusiųose pomidoruose), kurios gali pažeisti virškinimo sistemos organus, centrinę nervų sistemą. Taip pat šios reakcijos gali vykti dėl fermentų stokos (pvz., laktazės nepakankamumo) organizme, kurie lemia virškinimo sutrikimus, bei dėl maisto produktuose

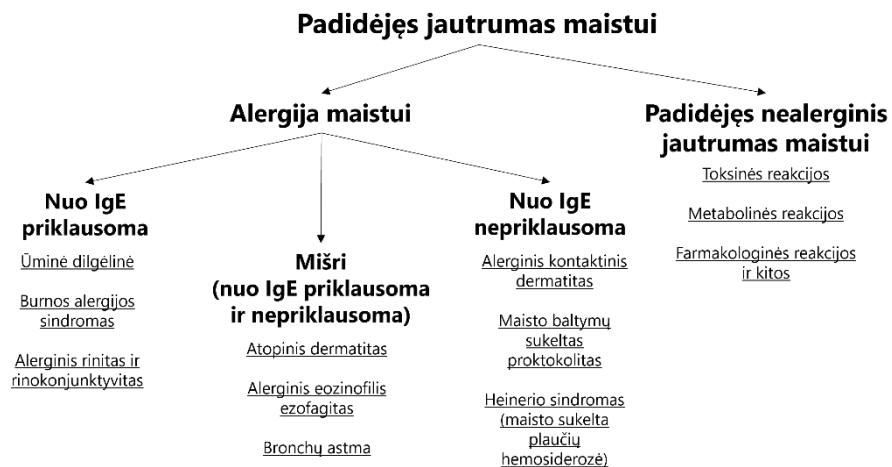
esančių farmakologiniu aktyvumu pasižyminčių medžiagų (pvz., kofeinas, teobrominas, histaminas, tiraminas). Suvartojus didesnius kiekius kofeino (geriant kavą, arbatą) arba teobromino (suvalgius šokolado) pacientams gali pasireikšti įvairūs simptomai (pvz., pykinimas, vėmimas, nerimas). Pastebima, kad ir į maisto produktus dedami maisto priedai (sieros dioksidas, sulfritai, glutamo rūgštis ir kiti), kurie naudojami kaip konservantai, antioksidantai ar skonio stiprikliai, irgi gali sukelti nepageidaujamas organizmo reakcijas (Dubakienė, 2021; Rudzevičienė, 2021).

2005–2009 metais buvo atliktas Europos Sąjungos finansuojamas projektas „Europevall“ (angl. *The prevalence, cost and basis of food allergy across Europe*), t. y. tarptautinis daugialypis integruotas alergijos maistui tyrimas, kurio vienas iš uždavinių buvo nustatyti veiksniai, kurie turi didžiausią įtaką alergijos maistui paplitimui. Tyrime dalyvavo Šveicarija, Gana, Islandija, Naujoji Zelandija, Australija, Rusija, Kinija, Indija ir 17 Europos Sąjungos šalių (tarp jų ir Lietuva). Lietuvoje buvo tirtos dvi grupės: vaikų (Vilniaus miesto pradinės mokyklos mokiniai) ir suaugusiųjų (amžius 19–57 m.), ir atlikti tyrimai: paplitimo (nustatyti kiek populiacijos prastai jautėsi suvalgius maisto) ir atvejo-kontrolės (atlikti laboratorinius tyrimus ir užpildyti pildomus išsamesnius klausimynus). Vaikų tyrimo metu buvo išdalintos 4333 anketos, iš kurių užpildytos tik 3084. Suaugusiųjų tyrimo metu dalyvavo 2634 asmenys (Vilniaus miesto Šeškinės ir Antakalnio poliklinikų pacientai). Nustatyta, kad 46,9 % visų tyrime dalyvavusių pradinių klasių mokinių ir tik 1,9 % suaugusiųjų sirgo ar negalavo suvalgius maisto. Viduriavimas, vėmimas, bėrimas, tinimas ar odos niežulys yra simptomai, kuriais dažniausiai skundėsi vaikai, o suaugusieji – bėrimu, tinimu ar odos niežuliu. Atlikus apklausas nustatyta, kad vaikams alergijas dažniausiai sukeldavo šokoladas, kiaušiniai, karvės pienas, keletas vaisių (obuoliai, apelsinai, kiviai), uogos (braškės, žemuogės), pomidoras, morka ir t. t. Šiuos rezultatus patvirtino laboratorinių tyrimų rezultatai (dalyvavo tik 186 vaikai), kurie nustatė, kad vaikai yra įsijautrinę karvės pienui, kiviams, lazdyno riešutams, o rečiau žuviai ir vėžiagyviams. Tuo tarpu apklausius suaugusius, dažniausiai jiems alergija sukėlė žemės riešutai, bet taip pat į sąrašą buvo įtraukti kiaušiniai, šokoladas, lazdyno riešutai, morka, bulvės ir t. t. Atlikti laboratoriniai tyrimai (dalyvavo tik 50 suaugusiųjų) atskleidė, kad dažniausiai alergija yra lazdyno riešutams, persikams ir kiviams. Kalbant apie alergiją žuviai, šio tyrimo metu nustatyta, kad 5,9 % vaikų ir 0,6 % suaugusiųjų buvo įsijautrinę žuviai. Palyginus Lietuvoje gautus rezultatus su kitų šalių rezultatais pastebėta, kad pacientų įsijautrinimą tam tikriems produktams lemia gyvenamoji vieta, šalies geografinė padėtis, toje vietoje auginami ir gaminami produktai (tam tikri vaisiai ir daržovės, pieno produktai). Taip pat

pastebima, kad per pastaruosius metus Lietuvoje vis daugiau vaikų tampa alergiški žemės riešutams, sezamui, kiviams (Dubakienė, 2021).

1.1.1. Alergijos maistui tipai

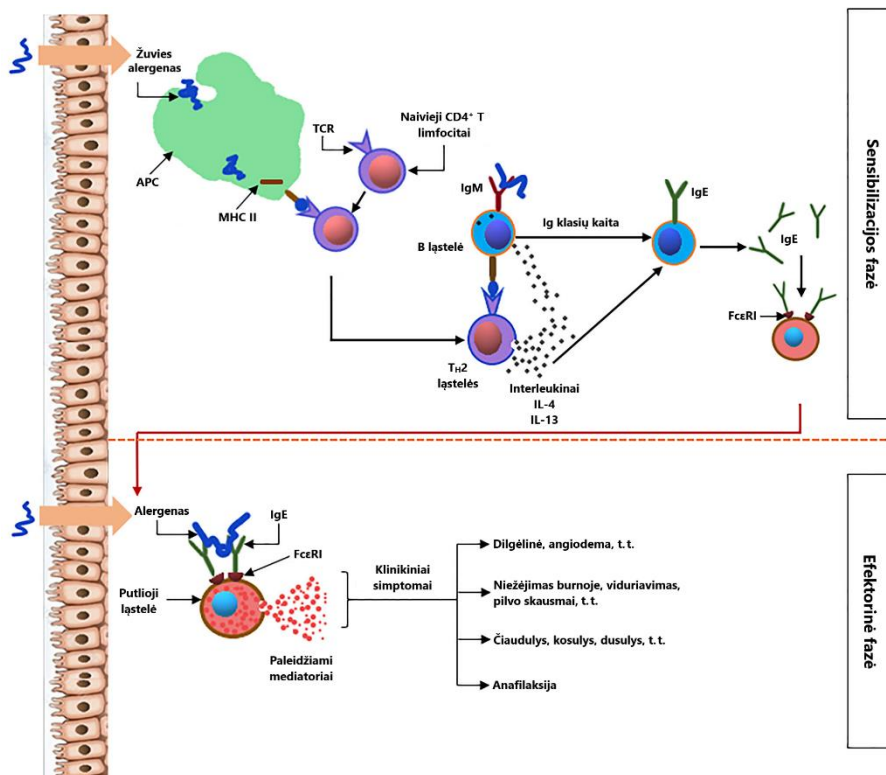
Alergija maistui gali būti skirstoma į nuo imunoglobulino E (IgE) priklausomą, nuo IgE nepriklausomą ir mišrią alerginę reakciją (nuo IgE priklausomą ir nepriklausomą) (1.3 pav.) (Sampath et al., 2020). Nuo IgE nepriklausomos alerginės reakcijos, tokios kaip maisto baltymų sukeltas enterokolitas (angl. *Food protein-induced enterocolitis syndrome (FPIES)*) ar maisto baltymų sukeltas proktokolitas (angl. *Food protein-induced allergic proctocolitis (FPIAP)*) pirmiausia paveikia virškinamąjį traktą, o ne odą ar kvėpavimo takus. Tai yra uždelsta (lėtojo tipo) maisto alergijos reakcija, kurios simptomai gali atsirasti praėjus 24–72 valandom po valgio. Šios alerginės reakcijos metu dalyvauja ne IgE, o specifiniai IgG klasės antikūnai, jų imuniniai kompleksai. Dažniausia šios reakcijos pasireiškia karvės pienui alergiškiems kūdikiams. Pagrindiniai simptomai yra vėmimas, viduriavimas, dehidratacija, medžiagų apykaitos sutrikimas, o gydoma visiškai vengiant alergiją sukėlusio maisto produkto vartojimo (Yu et al., 2016; Connors et al., 2018; Dubakienė, 2021).



1.3 pav. Padidėjusio jautrumo maistui klasifikacija. Pateikti pavyzdžiai alerginių ligų ir galimų nepageidaujamų reakcijų (pritaikyta pagal Rudzevičienė, 2021).

Eozinofilinis ezofagitas (EoE) yra lėtinė uždegiminė stemplės liga, kuri priskiriama mišriam maisto alergijos tipui (nuo IgE priklausomai ir nepriklausomai reakcijai). Šios reakcijos metu padidėja eozinofilų ir kitų uždegiminių ląstelių infiltracija į stemplės epitelį, galinčių sukelti stemplės

uždegimą, pogleivio fibrozę ir stemplės striktūras. EoE išsivystymą gali lemti genetiniai veiksniai, aplinkos veiksniai ir maisto alergenai (pvz., karvės pienas, soja, kiaušinis, riešutai, žuvis ir jūros gėrybės). Galimi ligos simptomai yra disfagija, pykinimas, vėmimas, pilvo skausmai. Gydoma taikant dietą ir vaistus (Carr et al., 2018).



1.4 pav. Nuo IgE priklausomos alergijos žuviai etapai. Įsijautrinimo fazė prasideda kuomet pacientas pirmą kartą susiduria su žuvies alergenu. Alergenas prasiskverbia pro gleivinės membraną, yra apdorojamas (suskaldomas į peptidus) antigeną pateikiančiose ląstelėse (APC) (dendritinės ląstelės, makrofagai, B ląstelės), o peptidai prijungti prie MHC II molekulių yra pateikiami naiviesiems CD4⁺ T limfocitams ir atpažįstami jų paviršiuje esančiais T ląstelių receptoriais (angl. *T-cell receptor* (TCR)). Naivieji CD4⁺ T limfocitai diferencijuojasi į Th2 efektorius, kurie sekretuoja IL-4 ir IL-13, skatinančius imunoglobulinų klasių kaitą iš IgM į IgE, t. y. skatina B ląstelių diferenciaciją į plazmines ląsteles, kurios sekretuoja alergeniui specifiskus IgE. Kraujyje cirkuliuojantys IgE jungiasi prie putliųjų ląstelių paviršiuje esančių FcεRI. Tai sensibilizacijos fazė. Efektorinė fazė prasideda, kuomet pacientas pakartotinai susiduria su tuo pačiu žuvies alergenu. Patekęs alergenai sąveikauja su putliųjų ląstelių paviršiuje esančiomis keliomis IgE molekulėmis ir sukelia šių ląstelių degranuliaciją, kurios metu išskirti mediatoriai sukelia alergijai būdingus simptomus (pritaikyta pagal Dasanayaka et al., 2022).

Nuo IgE priklausoma alergija maistui yra greitai padidėjusio jautrumo reakcija į maisto produktuose esančius alergenų, kurie į žmogaus organizmą gali patekti juos prarijus, įkvėpus ar palietus. Simptomai gali pasireikšti po kelių minučių ar kelių valandų po kontakto su alergenu (Bagdonaitė, 2013). Alergenai pirmą kartą patekę į organizmą jis apdorojamas antigeną pateikiančiose ląstelėse (angl. *antigen-presenting cells (APC)*), kuriose suskaldomas iki peptidų. Peptidai prijungiami prie II klasės pagrindinio audinių dermės komplekso molekulių (angl. *major histocompatibility complex class II (MHC II)*) ir pateikiami naiviosioms CD4⁺ T ląstelėms, kurios esant interleukinui 4 (IL-4) diferencijuoja į T_H2 efektorius. B ląstelės taip pat apdoroja ir pateikia alergeno peptidus MHC II molekulėse T_H2 ląstelėms, kurios tada išskiria citokinus IL-4 ir IL-13, kad paskatintų B ląstelių proliferaciją ir diferenciaciją į plazmines ląsteles, sekretuojančias alergenai specifiskus IgE. Tuomet IgE jungiasi prie putliųjų ląstelių paviršiuje esančių didelio giminingumo IgE receptorių (angl. *high-affinity IgE receptors (Fc ϵ RI)*). Pakartotinai į organizmą patekęs tas pats alergenas sąveikauja su putliųjų ląstelių paviršiuje esančiais IgE ir sukelia degranuliaciją, t. y. iš putliųjų ląstelių atpalaiduojami įvairūs mediatoriai (histaminas, citokinai, prostaglandinai, leukotrienai, įvairūs fermentai ir t. t.), kurie sukelia kraujagyslių išsiplėtimą ir padidina jų pralaidumą, bronchų susiaurėjimą, padidina gleivių sekreciją, gali sukelti viduriavimą ar vėmimą, uždegimus ar audinių pažeidimus, t. y. įvairius alergijos simptomus (1.4 pav.) (Abbas et al., 2018; Mayorga et al., 2021).

1.1.2. Alergijos maistui nustatymo būdai

Siekiant nustatyti, kokiam maisto produktui pacientas įsijautrinęs, yra analizuojama paciento ligos istorija ir vykdoma jo apklausa (anamnezė), atliekama medicininė apžiūra, vėliau atliekamas odos dūrio mėginio (ODM) testas, nustatoma, ar kraujo serume yra specifinių IgE (sIgE) prieš alergeną, gali būti atliekamas provokacinis oralinis mėginys (POM) (Mayorga et al., 2021).

Svarbu surinkti kaip įmanoma išsamesnę paciento anamnezę, t. y. išsiaiškinti, kas galėjo būti alergenų šaltinis, kokie simptomai pasireiškė, jų trukmė ir t. t. Taip pat svarbu išsiaiškinti, ar šeimos nariai serga alerginėmis ligomis. ODM testo metu pacientui ant neišbertos odos (dilbio, nugaros) yra užlašinami tiriamieji alergenai (ekstraktai arba natūralūs alergenai), tose vietose atskiromis steriliomis specialiomis adatomis įduriama į odos paviršių ir po 15–20 min. stebima, ar vyksta alerginė reakcija, t. y. ar susidaro pūklė ir yra įvertinamas jos dydis (teigiamas rezultatas, jeigu pūklės skersmuo yra

> 3 mm) (1.5 pav. A dalis). Teigiamas šio testo rezultatas rodo, kad pacientas yra įsijautrinęs nustatytam alergenui, bet yra reikalingi papildomi tyrimai siekiant įvertinti, ar būtent tas alergenas ir sukelia klinikinius simptomus. Odos dūrio-dūrio mėginio testas dažniausiai atliekamas, kai pacientams įtariama alergija vaisiams ir daržovėms. Šiuose maisto produktuose esantys alergenai yra labilūs (pvz., profilinai), todėl labai svarbu tinkamai paruošti jų ekstraktus. Pastebėta, kad kartais komerciniuose ekstraktuose šių alergenų kiekis yra nepakankamas, todėl naudojant tokius ekstraktus ODM testo metu galimi klaidingi rezultatai. Atliekant odos dūrio-dūrio mėginio testą atskiriomis adatomis durinama į natūralų produktą ir tada į odą ir toliau analizuojama kaip ODM testo metu (1.5 pav. B dalis) (Calamelli et al., 2019; Rudzevičienė, 2021; Dubakienė, 2021; Dubakienė, 2019).

A



B



1.5 pav. Pateikti keli alergijos maistui nustatymo būdai: A – odos dūrio mėginio (ODM) testas; B – odos dūrio-dūrio mėginio testas (pritaikyta pagal Brand, 2007; Wüthrich, 2014).

Atliekant sIgE tyrimą, galima nustatyti konkrečią alergeno molekulę, kuriai pacientas yra įsijautrinęs. Šių tyrimų metu gali būti naudojami tiek alergenų ekstraktai, tiek natūralūs alergenai. Yra sukurta keletas skirtingų sIgE tyrimų būdų: pavienių alergenų tyrimas, kuomet pacientui tiriami tik atrinkti alergenai (pvz., „ImmunoCAP“ sistema (Thermo Fisher Scientific, JAV)) arba daugiųjų alergenų tyrimai, kurių metu ištiriamas paciento įsijautrinimas 20 ir daugiau skirtingų alergenų ekstraktų ar komponentų (pvz., alergenų makrogardelės „ALEX²“ (Macro Array Diagnostics, Austrija)). sIgE rekomenduojama atlikti pacientams, kuriems negalima atlikti ODM dėl pažeistos odos (pvz., atopinio dermatito atveju), arba pacientai yra patyrę

anafilaksinį šoką, arba norima nustatyti konkrečią alergeno molekulę, kuri sukėlė alergijos simptomus, bei išsiaiškinti galimas kryžmines reakcijas. Atliekant ODM testą ir nustatant sIgE kiekį galima nustatyti, kokiam maisto alergenui pacientas gali būti įsijautrinęs, tačiau siekiant patvirtinti arba paneigti alergiją maistui dar gali būti atliekamas POM, kuris laikomas „auksiniu standartu“. Prieš atliekant POM, pacientui skiriama diagnostinė eliminacinė dieta. Jos metu maisto produktas, kuris manoma sukelia alergiją, nustatytą laikotarpį (dažniausiai 2–4 savaites arba ilgiau) yra pašalinamas iš paciento mitybos raciono, o po to vėl sugražinamas. Jeigu po produkto sugražinimo pacientui pasireiškė alergijos simptomai, atliekamas POM. Jo metu pacientui duodama valgyti arba gerti vis didesnius kiekius potencialaus maisto alergeno nustatytais laiko intervalais tol, kol arba yra sukeliama alerginė reakcija, arba nustatoma maksimali alergeno dozė, kurią pacientas gali suvartoti. POM gali būti atliekamas atviras (kai žinoma bandomojo mėginio sudėtis) arba abipusiškai slaptas placebo kontroliuojamas (angl. *double-blind, placebo-controlled food challenge (DBPCFC)*) (kai nei gydytojas, nei pacientas nežino mėginio sudėties). Dėl galimų nepageidaujamų reakcijų, šį testą gali atlikti tik tinkamai pasiruošę ir kvalifikuoti specialistai. POM atlikti nerekomenduojama, jei paciento ligos istorijoje buvo nurodyta anafilaksinė reakcija suvalgius tam tikrą maisto produktą (Yu et al., 2016; Calamelli et al., 2019; Rudzevičienė, 2021; Dubakienė, 2021; Dubakienė, 2019).

Alergijos maistui nustatymui yra kuriamas ir tobulinimas bazofilų aktyvacijos tyrimas (BAT). Jo metu tėkmės citometrijos metodu tiriami įsijautrinusio paciento kraujo serumo mėginyje esantys bazofilai. Stebima, ar pasirinktais alergenais yra aktyvinami paciento bazofilai, t. y. ar jų paviršiuje padidėja CD63 ir CD203c baltymų raiška. Atlikti tyrimai parodė, kad BAT metodu gali būti nustatoma alergija žemės riešutams ir kitiems maisto alergenams (Yu et al., 2016).

1.1.3. Alergijos maistui gydymas

Visiškas alergiją sukeliančio maisto produkto vengimas ir alergijos simptomus lengvinančių medikamentų (antihistamininių, gliukokortikoidų, leukotrienų antagonistų ir kitų) vartojimas yra pagrindiniai būdai, kurie taikomi gydant alergiją maistui (Mayorga et al., 2021). Jeigu pacientui alergiją sukelia labilūs maisto alergenai (pvz., esantys šviežiuose vaisiuose ir daržovėse), termiškai apdorojus tokius maisto produktus juos galima valgyti (Rudzevičienė, 2021). Deja, ne visada pacientams pavyksta išvengti alergeno (juo gali būti užteršti kiti maisto produktai arba produkto aprašyme nėra

nurodyta, kad jis įeina į produkto sudėtį), todėl gali pasireikšti nepageidaujamos alerginės reakcijos. Siekiant pagerinti pacientų gyvenimo kokybę, siekiama sukurti saugų, ilgalaikį ir veiksmingą gydymą. Manoma, kad alergenų specifinė imunoterapija (ASIT) yra vienas iš galimų variantų. Taikant ASIT pacientui yra laipsniškai didinamas tam tikro maisto alergeno kiekis, kol nustatoma paros palaikomoji alergeno dozė ir pasiekama desensibilizacija (Mayorga et al., 2021).

Alergijos maistui gydymui gali būti pritaikyta poodinė imunoterapija (angl. *subcutaneous immunotherapy (SCIT)*), oralinė imunoterapija (angl. *oral immunotherapy (OIT)*), poliežuvinė imunoterapija (angl. *sublingual immunotherapy (SLIT)*) ir epikutaninė imunoterapija (angl. *epicutaneous immunotherapy (EPIT)*) (Sampath et al., 2020). SCIT buvo taikyta gydyti alergiją žemės riešutams ir nors buvo stebimas sumažėjęs pacientų įsijautrinimas alergenui, daliai pacientų pasireikšdavo nepageidaujamos alerginės reakcijos. Siekiant patobulinti šią imunoterapiją, pacientų gydymui buvo naudotas cheminiu būdu modifikuotas aliuminio hidroksidu adsorbuotas žemės riešutų ekstraktas (HAL-MPE1). Atlikti I fazės klinikiniai tyrimai parodė, kad HAL-MPE1 yra saugus pacientams ir gerai toleruojamas. OIT buvo efektyvi sumažinant pacientų jautrumą žemės riešutams, karvės pienui ir vištos kiaušiniams. Pacientai kiekvieną dieną turėjo suvartoti tam tikrą alergeno dozę (pvz., nuo 3 iki 6 mg alergeno), kuri po tam tikro laikotarpio (pvz., kas dvi savaites) buvo palaipsniui didinama, kol pasiekama palaikomoji dozė. Šios imunoterapijos trukmė yra keli mėnesiai. Deja, pabaigus gydymą buvo pastebėta, kad dažnai pacientų desensibilizacija alergenams yra laikina ir daliai pacientų pasireikšdavo alerginės reakcijos, todėl buvo nuspręsta standartizuoti žemės riešutų alerganą. Atlikti III ir II fazės OIT klinikiniai tyrimai naudojant apibūdintus ir standartizuotus žemės riešutų miltelių preparatus (Aimmune (AR101) ir Camallergy (CA002)) parodė, kad pacientų jautrumas alergenui sumažėjo ir šiuos preparatus saugu vartoti. Siekiant, kad OIT būtų dar saugesnė ir efektyvesnė gydant alergiją maistui, buvo nuspręsta taikyti terapiją kartu naudojant antikūnus (pvz., omalizumabą – humanizuotą IgG1 monokloninį antikūną prieš žmogaus IgE, kuris skirtas gydyti astmą). Parodyta, kad atliekant OIT kartu su omalizumabu pacientams yra sutrumpinamas laikas iki desensibilizacijos, t. y. kelios savaitės, o ne keli mėnesiai ar visi metai (palyginus su OIT be antikūno), rečiau pasireiškėdavo nepageidaujamos reakcijos ir vienu metu galima gydyti alergiją keliems maisto alergenams. Tokio gydymo trūkumas – didelė omalizumabo kaina, todėl reikalingas taikomo metodo optimizavimas, kad jis būtų kuo naudingesnis ir reikalautų mažesnių išlaidų. SLIT yra kitas imunoterapijos būdas, kuris buvo taikomas gydyti alergiją kiviui, žemės riešutams, karvės

pienui, lazdyno riešutams ir persikams. Pacientui duodama skysto alergeno ekstrakto, kurį reikia kelias minutes laikyti po liežuviu. Gauti rezultatai parodė, kad metodas yra saugesnis pacientams nei taikant OIT, tačiau pasižymi mažesniu efektyvumu (terapijos trukmė ilgesnė, naudojamos mažesnės alergeno dozės) (Sampath et al., 2020; Yu et al., 2016; Iweala et al., 2018). Taikant EPIT pacientams ant rankos užklijuojamas specialus odos lopo mėginys su maisto alergenu (~100–500 µg baltymo), kad būtų sukeliama desensibilizacija veikiant odą alergenu. Šiuo metu atliekami I/II fazės klinikiniai tyrimai naudojant specialius odos lopo mėginius (Viaskin patch), skirtus gydyti alergiją karvės pienui. Taip pat jau atlikti III fazės klinikiniai tyrimai, kurių metu naudojami specialūs „Viaskin patch“, skirti gydyti alergiją žemės riešutams, ir buvo parodyta, kad metodas yra saugus. Daugelis iš šių išvardytų imunoterapijos variantų, skirtų gydyti alergiją maistui, yra daug žadantys, tačiau dar reikalingi papildomi tyrimai siekiant kaip įmanoma geriau įvertinti jų efektyvumą ir patikimumą gydant pacientus (Sampath et al., 2020; Mayorga et al., 2021).

Maisto alergijos gydymui ieškoma įvairiausių priemonių. Vienas iš galimų variantų yra specialių monokloninių antikūnų (MAK) taikymas. Etokimabas yra humanizuotas IgG1 MAK, kuris slopina citokiną IL-33. Tai priešūždegiminis citokinas, kuris esant alerginei reakcijai aktyvina eozinofilus, bazofilus, putliąsias ląsteles, dendritines ląsteles, įgimtojo imuniteto antrojo tipo limfoidines ląsteles (angl. *type 2 innate lymphoid cells, ILC2*) ir T ląsteles). II fazės klinikiniai tyrimai parodė, kad šis MAK yra saugus, gerai toleruojamas ir gali būti pritaikytas gydyti alergiją žemės riešutams (Sampath et al., 2020; Chan et al., 2019). Dupilumabas yra rekombinantinis žmogaus IgG4 MAK prieš žmogaus IL-4 receptoriaus α grandinę (IL-4R α), kuris sąveikaudamas su IL-4R α neleidžia prie jo prisijungti IL-4 ir IL-13. Sukurtas antikūnas taikomas gydyti astmą ir atopinį dermatitą. Aprašytas atvejis, kai paciento, kuriam buvo nustatytas atopinis dermatitas ir alergija maistui, gydymas taikant dupilumabą sumažino jo įsijautrinimą pistacijoms ir kukurūzui. Šiuo metu atliekami II fazės klinikiniai tyrimai, siekiant įvertinti šio MAK efektyvumą ir saugumą gydant alergiją žemės riešutams (Sampath et al., 2020; Mayorga et al., 2021).

Siekiant padidinti imunoterapijos veiksmingumą, t. y. pagerinti paciento toleranciją alergenui ir apsaugoti jį nuo galimų nepageidaujamų reakcijų, imunoterapijai gali būti naudojami sintetiniai peptidai. PVX108 yra vakcina, sudaryta iš trumpų sintetinių peptidų, kurie yra pagrindinių žemės riešutų alergenu T ląstelių epitopai, ir kurioje nėra žemės riešutų alergenu, galinčių sukelti alergijos simptomus. I fazės klinikinių tyrimų rezultatai parodė, kad vakcina yra saugi ir gerai toleruojama, gydant žemės riešutams alergiškus

pacientus (Sampath et al., 2020; Mayorga et al., 2021). ASP0892 (anksčiau vadinta ARA-LAMP-Vax) yra kita vakcina, kurioje yra alergenų koduojančios DNR sekos ir kuri skirta gydyti pacientus, įsijautrinusius pagrindiniams žemės riešutų alergenams (Ara h 1, Ara h 2 ir Ara h 3). Šiuo metu atliekamais I fazės klinikiniais tyrimais siekiama įvertinti šios vakcinos efektyvumą, pacientų toleranciją ir imuninį atsaką (Sampath et al., 2020).

Atliekami įvairūs tyrimai, siekiant išsiaiškinti, kaip reguliuojant žmogaus žarnyno mikrobiomą būtų galima suvaldyti ir gydyti alergiją maistui. Manoma, kad tam gali būti panaudojami probiotikai („gerosios“ bakterijos) ir prebiotikai (nevirškinami angliavandeniai, kurie maitina „gerąsias“ bakterijas, gyvenančias mūsų organizme). Karvės pienui alergiškiems pacientams paskirta dieta buvo papildyta *Lactocaseibacillus casei* arba *Bifidobacterium* bakterijomis ir buvo pastebėta atsiradusi tolerancija šiam maisto produktui (Mayorga et al., 2021). Kitas atvejis – papildžius vaikų dietą hidrolizuota kazeino forma, turinčia *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG), buvo nustatoma mažiau alerginių reakcijų karvės pienui (Berni Canani et al., 2017). Nors atlikti tyrimai parodė, kad probiotikai galėtų būti taikomi maisto alergijos gydymui, tačiau dar reikalingi papildomi tyrimai, siekiant įvertinti gydymo efektyvumą (Mayorga et al., 2021). Kalbant apie prebiotikus, buvo ištirta, kad papildyta prebiotikais kūdikių mityba gali sumažinti jų riziką susirgti egzema. Deja, jokių reikšmingų pokyčių nėra nustatyta kalbant apie alergijos maistui gydymą (Grimshaw et al., 2017).

1.2. Alergenai

Alergenas – alerginę reakciją galintis sukelti antigenas. Didžioji dalis alergenų yra baltymai arba glikoproteinai, kurių molekulinė masė (angl. *molecular weight (MW)*) yra 5–70 kDa. Jie aptinkami maisto produktuose, žiedadulkėse, grybų sporose ir t. t. (1 priedas). Alergeno molekulės dydis, jo tirpumas ir kiekis (koncentracija), bei būdas, kuriuo jis patenka į organizmą (įkvėpus, suvalgius ar palietus) yra tos savybės, kurios gali nulemti, ar žmogaus bus įsijautrinęs konkrečiam alergenui. Pavyzdžiui, pacientas yra alergiškas maisto produktui, tačiau kai jį išverda ar iškepa (paveikia aukšta temperatūra), jokie alergijos simptomai jam nepasireiškia. Taip yra todėl, kad pakaitinus alergeną jo struktūra pasikeičia ir jis jau nėra atpažinamas paciento organizme esančių alergenų specifinių IgE. Alergenas, kurio alergeniškumas sumažėja jį paveikus aukšta temperatūra arba virškinimo fermentais, yra vadinamas labiliu. Tuo tarpu stabilūs yra tie alergenai, kurie išlaiko savo struktūrą ir alergeniškumą. Rūkymas, pramoniniai išmetami teršalai ir kiti veiksniai taip pat prisideda prie vis didėjančių nustatomų alergijos atvejų

skaičių pasaulyje (Stewart et al., 2012; Rudzevičienė, 2021; Dubakienė, 2019).

Svarbiausia informacija apie pasaulyje atrastus ir ištirtus alergenų komponentus (atskiras molekules, esančias alergenų šaltinyje) yra pateikiama WHO/IUIS alergenų nomenklatūros duomenų bazėje (angl. *World Health Organization and International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS)*), <http://www.allergen.org/index.php>). Nustatytiems naujiems alergeno komponentams yra suteikiamas specialus pavadinimas, pagal lotynišką rūšies, iš kurios jie kilę, pavadinimą, sudarytą iš pirmųjų trijų genties raidžių, po kurių seka pirmoji rūšies raidė ir baigiasi arabišku skaičiumi. Pavyzdžiui, namų dulkių erkės *Dermatophagoides pteronyssinus* alergeno komponentas yra žymimas Der p ir tada seka skaičius, kuris dažniausiai lemia alergenų nustatymo tvarką arba jo klinikinę svarbą. Alergenai, kurių alergenų šaltinyje aptinkamos kelios izoformos, žymimi papildomais skaičiais. Pavyzdžiui, Phl p 12.0101, Phl p 12.0102 ir Phl p 12.0103 yra nustatytos trys pašarinio motiejuko profilino izoformos (Stewart et al., 2012; Rudzevičienė, 2021).

Alergenais gali būti ir įvairūs vaistai (pvz., penicilinas, rokuroniumas), kurie prisijungdami prie baltymo nešiklio gali sukelti alerginę reakciją. Taip pat alergijas gali sukelti ir angliavandeniai. Kryžmiškai reaguojančios angliavandenių determinantės (angl. *cross-reactive carbohydrate determinant (CCD)*) (L-fukozė, D-ksilozė) yra aptinkamos daugelio vabzdžių, latekso ir augalinės kilmės (augalų žiedadulkėse) alergenų struktūrose, todėl tai svarbus žymuo tiriant galimas kryžmines reakcijas. IgE prieš CCD gali susidaryti po vabzdžio įkandimo arba po susidūrimo su žiedadulkėmis. α -Gal (Galaktozė-alfa-1,3-galaktozė) yra siejama su alergija žaliai mėsei (jautienai, avienai, kiaulienai), kuomet pasireiškia lėtojo tipo alergijos reakcija (prėjus daugiau nei 3 valandom po mėsos suvalgymo), kurią sukelia žmogaus organizme esantys IgE prieš α -Gal, susidarę po erkės (pvz., Europoje *Ixodes ricinus*) įkandimo (Matricardi et al., 2016; Rudzevičienė, 2021).

Atlikti tyrimai parodė, kad terminis (pvz., kepimas, virimas, skrudinimas ar pasterizavimas) ir neterminis maisto apdorojimai (pvz., hidrolizė, fermentacija) turi įtakos baltymų struktūros, stabilumo ir alergeniškumo pokyčiams (Pekar et al., 2018). Be to, virškinimo metu proteazės, žemas skrandžio pH ir tulžies druskos gali mažai tirpius alergenų suskaldyti į dar mažesnius tirpius fragmentus, kurie po to gali sukelti alergijos simptomus, arba kaip tik dar smulkiau suskaldyti alergeną ir taip jis praranda savo alergeniškumą (Matricardi et al., 2016).

Skirtinguose alergenų šaltiniuose galima aptikti alergenų, kurių atliekama funkcija ir struktūra yra panaši, o palyginus aminorūgščių sekas jos

tarpusavyje reikšmingai sutampa. Dėl didelio aminorūgščių sekų tapatumo, IgE susidarę prieš vieną alergeną gali atpažinti tą patį antigeno epitopą esantį kitoje alergeno molekulėje (kryžminis reaktyvumas), t. y. reaguoti su kitu alergenu, su kuriuo anksčiau nebuvo jokio kontakto ir įsijautrinimo laikotarpio. Kalbant apie alergiją maistui, yra pastebimas žiedadulkių–maisto sindromas, kurį lemia IgE kryžminis reaktyvumas tarp tos pačios baltymų šeimos alergenų, esančių maisto produktuose ir esančių žiedadulkėse. Pavyzdžiui, pacientas alergiškas beržo alergeno komponentui Bet v 1, gali būti įsijautrinęs ir maisto produktams (pvz., šviežiems obuoliams, persikams), dėl juose esančių tai pačiai PR-10 baltymų šeimai priklausančių alergenų (pvz., Mal d 1, Pru p 1) (Stewart et al., 2012).

Parvalbuminai ir tropomiozinai laikomi pagrindiniais žuvų ir vėžiagyvių alergenais, tuo tarpu α -livetinas ir ovotransferinas – paukščių, o imunoglobulinas ir kazeinas – žinduolių alergenais. Augalinės kilmės maisto produktų vieni iš svarbesnių alergenų yra 2S albuminai, 7S ir 11S globulinai, profilinai, prolaminai ir PR-10 baltymai (2 priedas) (Stewart et al., 2012).

1.3. Alergija žuviai

Žuvis yra laikoma vienu iš labiausiai rekomenduojamų maisto produktų žmogui, dėl joje esančių vertingų maistinių medžiagų, tokių kaip omega-3 riebalų rūgščių, riebaluose tirpių vitaminų ir nepakeičiamų aminorūgščių, todėl vis daugiau žmonių įtraukia žuvies patiekalus į savo maisto racioną. Manoma, kad žuvies vartojimas gali prisidėti prie širdies ir kraujagyslių ligų, vėžio prevencijos, bei kontroliuoti glikemiją. Pastebėta, kad per pastaruosius metus dėl padidėjusio suvartojamo žuvies kiekio, kartu yra išaugęs ir nustatomų alergijos atvejų skaičius pasaulyje. Žuvis yra laikoma viena iš pagrindinių maisto alergeno šaltinių, kuriam yra įsijautrinę < 1 % visos pasaulio populiacijos (Dijkema et al., 2022; Carvalho et al., 2020; Fernandes et al., 2017).

Pasaulyje yra žinoma ir aprašyta daugiau nei 30 000 skirtingų žuvų rūšių, iš kurių daugiau nei 700 rūšių galima įsigyti įvairiose žuvų pardavimo vietose (Matricardi et al., 2016; Klueber et al., 2019). Skirtinguose geografiniuose regionuose yra paplitusios ir dažniausiai vartojamos tik tam tikros žuvų rūšys, kurios priklauso arba kaulinių (lot. *Osteichthyes*) (pvz., menkė, jūrų lydeka, ešeris, upėtakis) arba kremzlinių žuvų (lot. *Chondrychthyes*) (pvz., raja, melsvasis ryklis) klasei (1.6 pav.) (Feketea et al., 2021). Vienos dažniausiai vartojamų žuvų būrių yra lašišažuvės, ešeržuvės, menkiažuvės, plekšniažuvės, silkiažuvės ir karpžuvės (Lee et al., 2011). Azijos ir Ramiojo vandenyno šalyse populiarios žuvų rūšys yra nilinė tilapija, kelios karpio rūšys, šamas ir

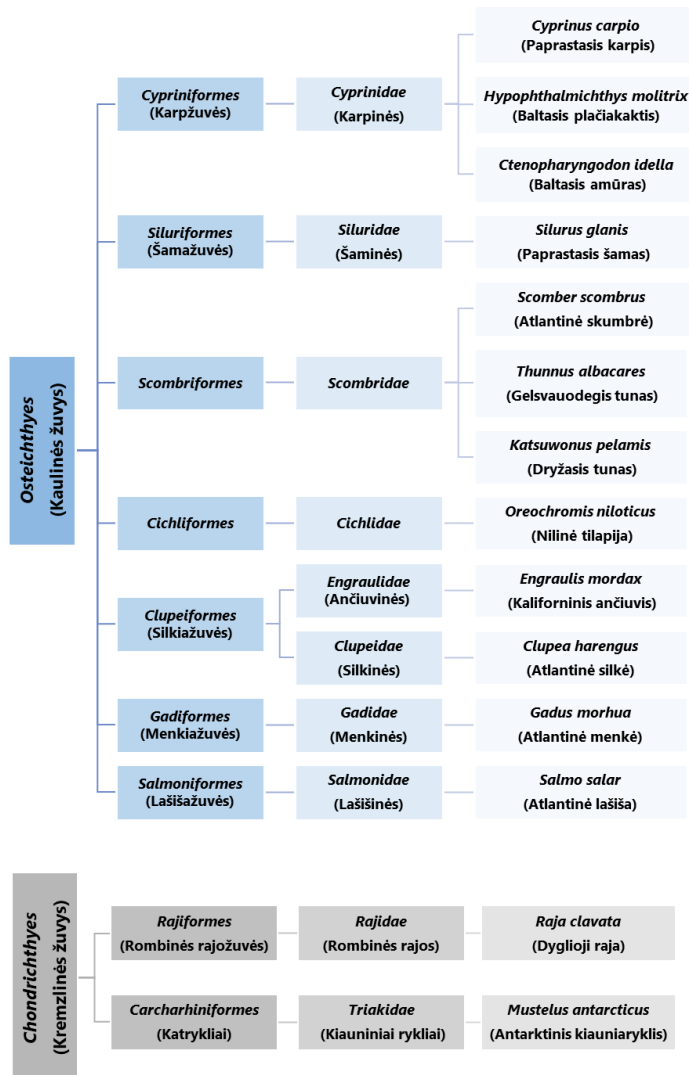
tunas. Tuo tarpu Europoje paplitusios yra atlantinė silkė, atlantinė skumbė, atlantinė lašiša, vaivorykštinis upėtakis, dryžuotasis tunas ir atlantinė menkė, o Jungtinėse Amerikos Valstijose – atlantinė lašiša, šamas, tilapija ir kitos (Kalic et al., 2021). Daugiausiai alergijos žuviai atvejų yra nustatoma šalyse, turinčiose ilgas pakrantes ir kur yra suvartojamas didelis kiekis žuvies (pvz., Ispanija, Norvegija, Japonija), bei regionuose, kuriuose yra veikiančios žuvies perdirbimo įmonės (Matricardi et al., 2016).

Žuviai alergiški gali būti tiek vaikai, tiek suaugusieji, kuriems gali pasireikšti įvairūs simptomai (pvz., dilgėlinė, sloga, viduriavimas, pykinimas ir kiti), o esant sunkesniems atvejams pacientus gali ištikti ir anafilaksinis šokas (Carvalho et al., 2020; Kuehn et al., 2014). Alergijos simptomai pacientui gali pasireikšti per labai trumpą laiką, t. y. per kelias minutes ar valandas po maisto nurijimo (Dasanayaka et al., 2022). Alergijos simptomus žmogus gali jausti ne tik suvalgius žuvies, bet ir po kontakto su žuvimi (palietus jos paviršių) ar įkvėpus garų gaminant žuvies patiekalus (Dijkema et al., 2022). Pacientai gali būti įsijautrinę vienai specifiniai žuvų šeimai (pvz., lašišinėms) arba kelioms skirtingoms žuvų šeimoms (Sharp and Lopata, 2014; Peñas et al., 2014). Pastebėta, kad jei pacientui nustatoma alergija žuviai, tai yra 50 % tikimybė, kad jis bus įsijautrinęs daugiau nei vienai žuvies rūšiai. Atliktais tyrimais parodyta, kad žuviai alergiški pacientai dėl kryžmiškai reaguojančių baltymų (parvalbuminų ir kolageno), gali būti irgi įsijautrinę vėžiagyviams, vištienai ar varlėms (Jiang and Rao, 2021). Alergija žuviai yra nustatoma remiantis paciento ligos istorija, odos dūrio mėginių ir kraujo tyrimais (nustatant alergeniui specifinius IgE) ir yra gydoma vengiant bet kokio žuvies ir jos produktų vartojimo (Matricardi et al., 2016; Kleine-Tebbe and Jakob, 2017). Žuvis taip pat yra vienas iš pagrindinių maisto produktų, galinčių sukelti FPIAP (Kalic et al., 2021).

Suvalgius žuvies, pacientui gali pasireikšti nepageidaujamos reakcijos ne tik dėl to, kad jis alergiškas žuviai, bet dėl žuvyje esančių bakterijų, virusų, toksinų, parazitų ar kitų medžiagų. Vienas tokių atvejų yra apsinuodijimas skumbrinių šeimos žuvimis (pvz., skumbre, silke, tunu, sardine), kuriose aptinkamas didelis kiekis histidino. Alergijos simptomai (dilgėlinė, vėmimas, viduriavimas ir t. t.) pasireškia suvalgius netinkamai laikytos žuvies, kurioje esančios enterobakterijos aminorūgštį histidiną paverčia histaminu (vienas pagrindinių alerginės reakcijos mediatorių). Kitu atveju, pykinimą, pilvo skausmus ar net apendicitą pacientui gali sukelti žuvyse aptinkami *Anisakis* šeimos apvaliosios kirmėlės, kurios patenka į žmogaus organizmą suvalgius žalią, marinuotą ar nepakankamai termiškai apdorotą žuvį. Be to, yra nustatyta atvejų, kuomet alergijos simptomai pacientui pasireiškia dėl įsijautrinimo *Anisakis simplex* parazito baltymams (Ruethers et al., 2018; Sharp and Lopata,

2014; Rodgers, 2011). Taip pat patariama vengti valgyti žuvis, kurios buvo veikiamos aplinkoje esančių teršalų ir toksinų, tokių kaip metilo gyvsidabrio, patvariųjų organinių teršalų (pesticidų, pramoninių cheminių medžiagų ir t. t.), kadangi jie kaupiasi žuvų organizme (Dasanayaka et al., 2022).

KLASĖ BŪRYS ŠEIMA RŪŠIS



1.6 pav. Dažniausiai maistui vartojamų kaulinių ir kremzlinių žuvų klasifikacija (pritaikyta pagal Kalic et al., 2021).

Žuvis yra greitai gendantis produktas, todėl siekiant prailginti galiojimo laiką, pagerinti skonį ir pašalinti patogeninius mikroorganizmus, žuvis yra

paruošiama taikant įvairius maisto apdorojimo būdus. Kepimas, virimas, grilinimas, garinimas yra vieni iš būdų, kuriuos taikome gaminant įvairius žuvies patiekalus, tačiau jų metu žuvies alergeniškumas ir antigeniškumas gali būti sumažintas, išlikti nepakitęs, arba kaip tik padidintas (Jiang and Rao, 2021; Dasanayaka et al., 2022; Kalic et al., 2021). Termiškai apdorojant žuvį karščiui jautrių baltymų struktūra gali pakisti, tad suvalgius termiškai apdorotos žuvies, pacientui nepasireikštų alerginė reakcija, kadangi alergenai nebūtų atpažinti kraujo serume esančių alergenams specifinių IgE. Keletas tyrimų parodė, kad konservuota žuvis (tunas ir lašiša) praranda savo alergeniškumą ir dažnai gali būti vartojama žuviai alergiškų pacientų. Tačiau yra atvejų, kuomet maisto konservavimo metu pakinta alergenų struktūra, susiformuoja nauji alergeno epitopai (nebūdingi natyviai alergeno struktūrai), kurie gali sukelti pacientams alergines reakcijas. Atliktame tyrime parodyta, kad kelių pacientų IgE sąveikavo su naujais baltymais (MW 38–60 kDa), aptiktais konservuotame tune. Kalbant apie karšto rūkymo žuvis, tai priklausomai nuo atliekamų procedūrų ir naudojamų cheminių medžiagų, gali padidėti arba sumažėti lašišos, upėtakio, skumbrės alergeniškumas (pvz., sumažėja parvalbuminų kiekis, susiformuoja alergenų oligomerai ir t. t.). Taip pat ir netermiškas žuvies apdorojimas (pvz., sūdymas, šaltas rūkymas) turi įtakos tam tikrų žuvų rūšių alergenų struktūros pokyčiams (Dasanayaka et al., 2022). Atliktame tyrime buvo parodyta, kad daugiau nei kelis mėnesius –20 °C temperatūroje laikytuose skirtingų žuvų rūšių mėginiuose, pasitelkus alergenui specifinius antikūnus, buvo galima aptikti parvalbuminus (Lee et al., 2012). Kitų tyrimų metu aliaskinės rudagalvės menkės filė, taikant specialius metodus ir naudojant įvairius priedus (pvz., ovalbuminą, α -laktalbuminą ir kitus), buvo paruošta į perdirbtą jūros gėrybių produktą (vytintą surimą) ir po to į krabų lazdeles panašų produktą. Taikant tokį žuvies apdorojimą metodą buvo nustatytas mažesnis β -parvalbumino kiekis gautame produkte, lyginant su jo kiekiu esančiu žuvies filė, ir kartu buvo stebimas sumažėjęs žuviai alergiškų pacientų serume esančių IgE prisijungimas. Nors šis produktas būtų puiki alternatyva žuvies β -parvalbuminams įsijautrinusiems pacientams, deja jame galima aptikti ir kitų žuvies alergenų (kolageno, tropomiozino, β -enolazės, aldolazės A), bei kiaušinio ir pieno baltymų, todėl prieš vartojimą reikėtų atidžiai įvertinti jo sudėtį (Pérez-Tavarez et al., 2021).

Žuvies perdirbimo įmonėse dirbantys darbuotojai nuolatos susiduria su žuvies alergenais, todėl dažnai dalis jų skundžiasi alergenų sukeltais alergijos simptomais (pvz., kontaktine dilgėline ir dermatitu, alergine sloga ir astma). Tokie pat simptomai gali pasireikšti ir restoranų virėjams, gaminantiems žuvies patiekalus, kurie darbo metu irgi susiduria su dideliais žuvų alergenų kiekiais (Klueber et al., 2019). Atliktais tyrimais buvo parodyta, kad alerginė

astma yra nustatoma iki 8 % visų žuvies perdirbimo įmonėse dirbančių darbuotojų, o kontaktinis dermatitas – iki 11 % (Hilger et al., 2017).

Kalbant apie žuvies taukus, tai juose esančios riebalų rūgštys pacientams nesukelia alerginės reakcijos. Nepaisant to, rekomenduojama vengti vartoti žuvies taukus, jeigu yra alergija žuviai, kadangi alergijos simptomus gali sukelti žuvies baltymai, atsitiktinai patekę į žuvų taukus jų gamybos metu (Rudzevičienė, 2021).

1.4. Žuvies alergenai

Žuviai alergiški pacientai būna įsijautrinę tam tikriems žuvų baltymams, t. y. žuvų alergenams, kurie yra aptinkami žuvų raumenyse, odoje, ikruose ar kraujyje. Šiuo metu WHO/IUIS alergenų nomenklatūros duomenų bazėje yra užregistruota 12 žuvies alergenų, kurie buvo nustatyti ir ištirti įvairiose žuvų rūšyse (pvz., baltajame baramude, atlantinėje menkėje, rytinėje sardinėje ir kitose) (1.2 lentelė) (Ruethers et al., 2018; Dasanayaka et al., 2022; Sharp and Lopata, 2014; Das Dores et al., 2002; Beale et al., 2009). Geriausiai ištirti žuvų alergenai yra β -parvalbuminas, β -enolazė, aldolazė A, tropomiozinas, kolagenas ir vitelogeninas. Dėl padidėjusio žuvies vartojimo ir didelės žuvų rūšių įvairovės nustatoma vis daugiau naujų žuvies alergenų, tokių kaip baltojo amūro β -parvalbuminas, atlantinės lašišos kreatino kinazė ar paprastojo karpio β -enolazė, kurie gali būti pritaikyti alergijų diagnostikoje (Ruethers et al., 2018; Leung et al., 2020; Ruethers et al., 2021; Sližienė et al., 2022).

1.4.1. Parvalbuminas

Parvalbuminas yra nedidelis (10–12 kDa), kalcio (arba magnio) jonus surišantis, vandenyje tirpus baltymas, pasižymintis dideliu atsparumu aukštai temperatūrai, denatūruojančioms medžiagoms ir proteolitiniams fermentams. Šis baltymas aptinkamas žuvų, varliagyvių, roplių, paukščių ir žinduolių raumenyse ir yra laikomas antru pagal svarbą gyvūlinės kilmės maisto alergenų (Fernandes et al., 2015). Tarpusavyje palyginus parvalbuminų aminorūgščių sekas, jie buvo suskirstyti į dvi skirtingas evoliucines linijas: α -parvalbuminus ir β -parvalbuminus. Izoelektrinis taškas (pI) α -parvalbuminų yra ≥ 5 , o $\beta \leq 4,5$. Tiriant pacientų įsijautrinimą parvalbuminams buvo pastebėta, kad didžioji dalis alergines reakcijas sukeliančių parvalbuminų priklauso būtent β linijai (Sharp and Lopata, 2014; Fernandes et al., 2017; Rodgers, 2011). Analizuojant atlantinės menkės ekstraktą imunobloto metodu (naudojant MAk prieš parvalbuminus) buvo nustatytos skirtingo dydžio

baltymų juostelės, kurios parodė, kad ekstrakte parvalbuminai gali būti monomerai (10–12 kDa) ir gali formuoti dimerus, trimerus ar tetramerus (24, 38 ir 51 kDa) (Das Dores et al., 2002).

Parvalbuminai, aptinkami žuvų raumenyse, laikomi pagrindiniais žuvų alergenais. Žuvų raumenys yra skirstomi į „baltuosius“ ir į „raudonuosius“, kurie skiriasi savo sandara ir atliekama funkcija. Atliektais tyrimais buvo parodyta, kad didesnis parvalbuminų kiekis yra aptinkamas baltajame raumens audinyje (~ 4–8 kartus didesnis), negu raudonajame, todėl tos žuvų rūšys, kuriose yra daugiau raudonojo raumens (pvz., dryžasis tunas, paprastoji durklažuvė) pasižymi mažesniu alergeniškumu (Bukelskis et al., 2017; Kuehn et al., 2014; Kobayashi et al., 2006; Griesmeier et al., 2010; Dijkema et al., 2022). Taip pat buvo nustatyta, kad neapdorotame karpio raumens audinyje β -parvalbumino yra 3,75 mg/g, silkės – 4,75 mg/g, tuo tarpu skumbrės ir tuno raumenyse – tik po 0,5 mg/g ir 0,03 mg/g (Kuehn et al., 2010). Taigi, β -parvalbumino kiekis tarp skirtingų žuvų rūšių skiriasi ir tai gali lemti, kodėl pacientai yra alergiški tik tam tikroms žuvmis. Kitų tyrimų metu buvo parodyta, kad užpakalinėje žuvies kūno dalyje esančiuose raumenyse (arčiau uodegos) aptinkami mažesni parvalbumino kiekiai, nei priekiniuose ir viduriniuose žuvies kūno raumenyse (Lee et al., 2012).

Parvalbuminai priklauso EF rankos (angl. *EF-hands*) baltymų šeimai, nes yra sudaryti iš trijų EF rankos motyvų (spiralė-kilpa-spiralė), kur dvi 12 aminorūgščių ilgio kilpos, jungiančios tarpusavyje α -spirales, dalyvauja surišant kalcio arba magnio jonus (1.7 pav.). Iš trijų EF rankos motyvų tik du gali surišti metalo jonus (CD ir EF), jie dar vadinami funkciniais domenais, kurie reikalingi stabilizuoti baltymo struktūrai ir palaikyti jo funkcijai. Tuo tarpu trečiasis domenas (AB) uždengia baltymo hidrofobinę sritį. Manoma, kad žuvyse parvalbuminas dalyvauja reguliuojant viduląstelinio kalcio jonų koncentraciją raumenų atsipalaidavimo metu. Taip pat nustatyta, kad α -parvalbuminai suriša tik kalcio jonus ir jų struktūra išlieka labai panaši tiek esant prisijungus metalo jonus, tiek be jų. Tuo tarpu β -parvalbuminai struktūra pasikeičia jiems prisijungus arba netekus kalcio arba magnio jonų. Atliektais tyrimais buvo pastebėta, kad kalcio jonų neturinčiu parvalbuminų alergeniškumas sumažėja (Kuehn et al., 2014; Fernandes et al., 2015; Rodgers, 2011)

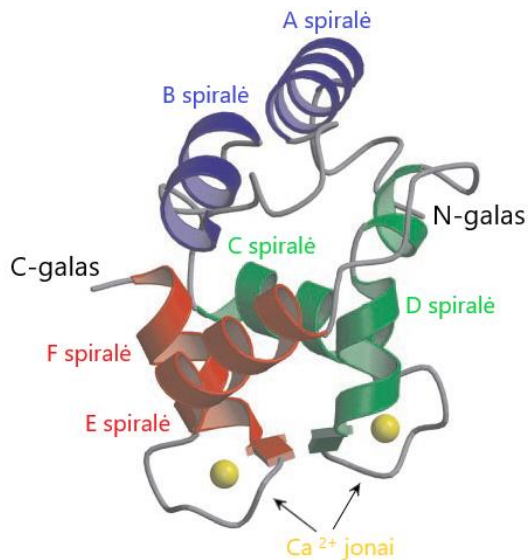
β -parvalbuminai yra aptinkami kaulinių žuvų raumenyse ir pastebėta, kad būtent šiam baltymui yra įsijautrinę didžioji dalis žuviai alergiškų pacientų (> 90 % atvejų).

1.2 lentelė. WHO/IUIS alergenų nomenklatūros duomenų bazėje užregistruoti žuvų alergenai (pritaikyta pagal Dasanayaka et al., 2022).

Žuvies alergenai	Žuvies rūšis	Alergeno pavadinimas (IUIS)	Alergeno izoformų skaičius	Molekulinė masė (kDa)
<i>Aldolazė A</i>	<i>Gadus morhua</i> (atlantinė menkė)	Gad m 3	1	40
	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (siaminė pangasija)	Pan h 3	1	40
	<i>Salmo salar</i> (atlantinė lašiša)	Sal s 3	1	40
	<i>Thunnus albacares</i> (gelsvauodegis tunas)	Thu a 3	1	40
<i>β-enolazė</i>	<i>Cyprinus carpio</i> (paprastasis karpis)	Cyp c 2	1	47
	<i>Gadus morhua</i> (atlantinė menkė)	Gad m 2	1	47,3
	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (siaminė pangasija)	Pan h 2	1	50
	<i>Salmo salar</i> (atlantinė lašiša)	Sal s 2	1	47,3
<i>β-parvalbuminas</i>	<i>Thunnus albacares</i> (gelsvauodegis tunas)	Thu a 2	1	50
	<i>Clupea harengus</i> (atlantinė silkė)	Clu h 1	3	12
	<i>Ctenopharyngodon idella</i> (baltasis amūras)	Cten i 1	1	9
	<i>Cyprinus carpio</i> (paprastasis karpis)	Cyp c 1	2	12
	<i>Gadus callarias</i> (Baltijos menkė)	Gad c 1	1	12
	<i>Gadus morhua</i> (atlantinė menkė)	Gad m 1	4	12
	<i>Lates calcarifer</i> (baltasis baramundis)	Lat c 1	2	11,5
	<i>Lepidorhombus whiffiagonis</i> (paprastasis megrimas)	Lep w 1	1	11,5
	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (vaivorykštinis upėtakis)	Onc m 1	2	12
	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (siaminė pangasija)	Pan h 1	2	11
	<i>Rastrelliger kanagurta</i> (azijinė atogrąžinė skumbrė)	Ras k 1	1	11,3
	<i>Salmo salar</i> (atlantinė lašiša)	Sal s 1	1	12

<i>β</i> -parvalbuminas	<i>Sardinops sagax</i> (rytinė sardinė)	Sar sa 1	1	12
	<i>Scomber scombrus</i> (atlantinė skumbė)	Sco s 1	1	12
	<i>Sebastes marinus</i> (didysis jūrinis ešeris)	Seb m 1	2	11
	<i>Solea solea</i> (europinis jūrų liežuvis)	Sole s 1	1	11–14
	<i>Thunnus albacares</i> (gelsvauodegis tunas)	Thu a 1	1	11
	<i>Xiphias gladius</i> (paprastoji durklažuvė)	Xip g 1	1	11,5
Kolageno alfa grandinė	<i>Lates calcarifer</i> (baltasis baramundis)	Lat c 6	3	130–140
	<i>Salmo salar</i> (atlantinė lašiša)	Sal s 6	4	130–140
Kreatino kinazė	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (siaminė pangasija)	Pan h 7	1	43
	<i>Salmo salar</i> (atlantinė lašiša)	Sal s 7	1	43
Gliukozės-6-fosfato izomerazė	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (siaminė pangasija)	Pan h 11	1	60
Glicer aldehido 3-fosfato dehidrogenazė	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (siaminė pangasija)	Pan h 13	1	36
Laktato dehidrogenazė	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (siaminė pangasija)	Pan h 10	1	34
Piruvato kinazė	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (siaminė pangasija)	Pan h 9	1	65
	<i>Salmo salar</i> (atlantinė lašiša)	Sal s 9	1	65
Triozės fosfato izomerazė	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (siaminė pangasija)	Pan h 8	1	25
	<i>Salmo salar</i> (atlantinė lašiša)	Sal s 8	1	25
Tropomiozinas	<i>Oreochromis mossambicus</i> (mozambikinė tilapija)	Ore m 4	1	33
	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (siaminė pangasija)	Pan h 4	2	35
	<i>Salmo salar</i> (atlantinė lašiša)	Sal s 4	1	37
Vitelogeninas (<i>β</i> -pirminis komponentas)	<i>Oncorhynchus keta</i> (keta)	Onc k 5	1	18

α -parvalbuminų daugiausia yra kremzlinėse žuvyse ir manoma, kad dėl artimo panašumo žmogaus α -parvalbuminui, jie laikomi nealergeniškais baltymais. Žmogus turi α -parvalbuminą (PVALB) ir β -parvalbuminą (dar vadinamą onkomodulinu). Atlikta žmogaus, varlės, lydekos ir kitų gyvūnų parvalbuminų aminorūgščių sekų analizė atskleidė, kad žinduolių onkomodulinas yra filogenetiškai nutolęs nuo daugelio žuvų, varlių ir roplių β -parvalbuminų. Palyginus, pavyzdžiui, kaliforninio šakadančio ryklės α -parvalbumino sekas su paprastojo karpio β -parvalbuminų aminorūgščių sekomis buvo nustatytas 54 % sekų panašumas, kas galėtų paaiškinti, kodėl taip skiriasi žuvų α ir β parvalbuminų alergeniškumas (Rodgers, 2011; Dijkema et al., 2022; Climer et al., 2019; Kalic et al., 2019). Palyginus tarpusavyje skirtingų kaulinių žuvų rūšių β -parvalbuminų aminorūgščių sekas buvo parodyta, kad sekos sutampa nuo 61 % (pvz., Lep w 1.0101 ir Sal s 1.0101) iki > 80 % (pvz., Cyp c 1.0101 ir Gad m 1.0101). Pastebima, kad kalcio jonų surišimo srityse yra daug konservatyvių aminorūgščių motyvų, kurie aptinkami daugelyje skirtingų žuvų rūšių β -parvalbuminų ir manoma, kad tai gali lemti, kodėl pacientai gali būti įsijautrinę skirtingos žuvų rūšims (Kalic et al., 2021).



1.7 pav. Rekombinantinio paprastojo karpio β -parvalbumino (rCyp c 1) erdvinė struktūra. Mėlyna spalva pažymėtos α -spiralės ir jas jungianti kilpa yra nefunkcinis N-galinis EF rankos domenas (AB). Tuo tarpu žalia ir raudona spalva pažymėtos α -spiralės ir jas jungiančios kilpos yra funkciniai EF rankos domenai (CD ir EF), kurie yra surišę kalcio jonus (pažymėti geltona spalva) (pritaikyta pagal Swoboda et al., 2002b).

Baltijos menkės β -parvalbuminas (Gad c 1) buvo pirmasis nustatytas žuvų alergenai, nuo kurio prasidėjo išsamesni šio baltymo tyrinėjimai, lėmę β -parvalbuminų bei kitų žuvų alergenų atradimą skirtingose žuvų rūšyse (lašišoje, karpyje, menkėje, tunoje, skumbrėje ir t. t.) (Kuehn et al., 2014; Lee et al., 2011). Tam tikrose žuvų rūšyse yra nustatyta daugiau nei viena β -parvalbumino izoforma, kurių aminorūgščių sekos tarpusavyje gali reikšmingai skirtis. Pavyzdžiui, atlantinėje menkėje yra aptiktos ir aprašytos net keturios izoformos (Gad m 1.0101, Gad m 1.0102, Gad m 1.0201, Gad m 1.0202). Tuo tarpu vaivorykštinio upėtakio dviejų izoformų (Onc m 1.0101 ir Onc m 1.0201) aminorūgščių sekos tarpusavyje sutampa tik 65 %, o paprastojo karpio izoformų (Cyp c 1.0101 ir Cyp c 1.0201) aminorūgščių sekos – 84 %. Dėl egzistuojančių kelių alergenų izoformų pacientai gali būti labiau įsijautrinę vienai alergenų izoformai, nei kitai, ir tai gali būti problema nustatant tikrą žuvies alergeną (Dasanayaka et al., 2022; Sharp and Lopata, 2014). Atliktu tyrimu buvo parodyta, kad β -parvalbuminų izoformų kiekis žuvų ekstraktuose gali skirtis. 100 g atlantinės menkės raumens mėginyje buvo aptikta Gad m 1.0202 izoformos 263,5 mg, o tuo tarpu Gad m 1.0102 – 46,5 mg (Pérez-Tavarez et al., 2019).

Tarpusavyje palyginus skirtingų žuvų rūšių β -parvalbuminų aminorūgščių sekas buvo nustatyta 60–80 % homologija, kas galėtų paaiškinti, kodėl dalis žuviai alergiškų pacientų yra įsijautrinę kelioms skirtingoms žuvų rūšims (Carvalho et al., 2020). Tačiau yra atvejų, kuomet pacientai yra įsijautrinę vienai specifiniam žuvų šeimai (pvz., lašišinėms), nes jų kraujo serume esantys IgE atpažįsta tik tai žuvų šeimai būdingus parvalbumų epitopus (Dasanayaka et al., 2022). Be to, IgE kryžminis reaktyvumas buvo nustatytas tarp žuvų ir kitų stuburinių gyvūnų parvalbuminų: tarp varlės ir menkės parvalbuminų, tarp vištienos ir menkės parvalbuminų, tarp krokodilo ir jūros lydekos bei menkės parvalbuminų (Kalic et al., 2021).

1.4.2. β -enolazė

Enolazė, dar vadinama fosfopiruvato hidrataze, yra metalo fermentas (50 kDa), kuris esant magnio jonams dalyvauja gliukozės metabolizme ir katalizuoja 2-fosfoglicerato vartimą į fosfoenolpiruvatą (Díaz-Ramos et al., 2012). Šis fermentas buvo nustatytas žmogaus, triušio, vištos, žuvies organizmuose, taip pat mielėse ir bakterijose (Nakagawa and Nagayama, 1991). Enolazė yra nustatyta ir pripažinta alergenais grybeliuose (pvz., *Alternaria alternata* (Alt a 6), *Cladosporium herbarum* (Cla h 6)), braziliniame kaučiukmedyje (Hev b 9), mielėse (*Rhodotorula mucilaginosa* (Rho m 1)), Amerikos tarakonuose (Per a 14) ir kituose organizmuose (Liu et

al., 2012). Žinduolių organizmuose enolazė yra aptinkama trijų skirtingų izoformų: α -enolazė (ENO-1), kuri yra aptinkama daugelyje audinių; β -enolazė (ENO-3), kuri yra dažniausiai nustatoma raumenyse ir γ -enolazė (ENO-2) randama nerviniuose audiniuose (Díaz-Ramos et al., 2012; Morales-Amparano et al., 2021). 1966 metais iš vaivorykštinio upėtakio raumens buvo išgryninta pirmoji žuvų β -enolazė. Vėliau šis fermentas buvo aptiktas ir daugelyje kitų žuvų rūšių (japoninėje skumbrėje, atlantinėje menkėje, mozambikinėje tilapijoje, paprastajame karpyje, raudonajame karose, karšyje, ilgauodegyje tune, megrime) (Cory and Wold, 1966; Kuehn et al., 2013; Liu et al., 2012; Nakagawa and Nagayama, 1991; Liu et al., 2011; Rosmilah et al., 2013; Haroun Díaz et al., 2023). Kryžminis reaktyvumas buvo pastebėtas tarp menkės, lašišos ir tuno β -enolazių, o vėliau nustatytas ir tarp didžiojo nilinio ešerio ir atlantinės menkės β -enolazių (Kuehn et al., 2013; Tomm et al., 2013; Kalic et al., 2021). Šiuo metu WHO/IUIS alergenų nomenklatūros duomenų bazėje alergenais yra pripažintos penkios žuvų β -enolazės, išskirtos iš atlantinės menkės (Gad m 2), atlantinės lašišos (Sal s 2), siaminės pangasijos (Pan h 2), gelsvauodegio tuno (Thu a 2) ir paprastojo karpio (Cyp c 2). Pastarasis alergenai buvo identifikuotas mūsų tyrime.

1.4.3. Kiti žuvų alergenai

Aldolazė (dar vadinama D-fruktozės bifosfato aldolazė), kaip ir β -enolazė, yra metalo fermentas, dalyvaujantis gliukozės metabolizme, kuris katalizuoja fruktozės-1,6-difosfato skilimą į 3-glicerolio fosfato aldehidą ir į dihidroksiacetono fosfatą. Tai yra tetramerinis baltymas, kurio vieno subvieneto molekulinė masė yra 40 kDa. Žinduoliuose aldolazė yra aptikta trijų skirtingų izoformų: aldolazė A (aptinkama raumenyse, raudonosiose kraujo ląstelėse), aldolazė B (kepenyse, inkstuose) ir aldolazė C (smegenyse, nerviniuose audiniuose) (Kleine-Tebbe and Jakob, 2017; Arakaki et al., 2004). 2013 metais aldolazės A, kaip žuvies alergenai, buvo pirmą kartą aptikti ir išgryninti iš trijų skirtingų žuvų raumenų: atlantinės menkės (Gad m 3), atlantinės lašišos (Sal s 3) ir gelsvauodegio tuno (Thu a 3). Vėliau šis žuvies alergenai buvo nustatytas ir siaminėje pangasijoje (Pan h 3). Pastebėta, kad kaip ir β -enolazė, aldolazė A yra mažiau stabilus žuvies alergenai nei β -parvalbuminas, todėl jis jautrus aukštai temperatūrai maisto gamavimo metu. Yra reikalingi papildomi tyrimai, siekiant įvertinti pacientų įsijautrinimą šiam alergenai (Kuehn et al., 2013; Tomm et al., 2013, Kuehn et al., 2014).

Kolagenas yra struktūrinis baltymas (320 kDa), aptinkamas žuvies odoje, kauluose ir raumenyse, sudarytas iš dviejų alfa ir vieno beta subvienetų. Tiek žuvies kolagenas, tiek želatina, kuri gaunama hidrolizuojant kolageną esant

specialioms sąlygoms, yra plačiai naudojami kosmetikoje, vaistų ir maisto pramonėse (Matricardi et al., 2016). 2001 metais Japonijoje pirmą kartą buvo nustatyta alergija tuno kolagenui, vėliau buvo užfiksuotas anafilaksijos atvejis saldiniuose rastai žuvies želatinai. Kitas aprašytas atvejis Japonijoje, kuomet iš 36 žuviai alergiškų pacientų, 18 jų buvo įsijautrinę skumbrės kolagenui. Taip pat buvo stebimas kryžminis reaktyvumas tarp skumbrės ir kitų 22 skirtingų žuvų rūšių (dryžuotojo tuno, atlantinės lašišos, kardžuvės ir kitų) kolagenų. Žuvies alergenais yra pripažintos kolageno alfa grandinės, išskirtos iš atlantinės lašišos (Sal s 6) ir baltojo baramundžio (Lat c 6) (Klueber et al., 2019; Kalic et al., 2020; Kobayashi et al., 2016).

Tropomiozinas yra svarbus struktūrinis baltymas (32 kDa), aptinkamas raumenyse ir dalyvauja reguliuojant raumenų susitraukimus (Kleine-Tebbe and Jakob, 2017). Kaip dar vienu žuvies alergenu tropomiozinas buvo nustatytas ir pripažintas mozambikinėje tilapijoje (Ore m 4). Parodyta, kad tilapijai alergiškų pacientų serume esantys IgE sąveikavo su išgrynintu alergenu ir kartu kryžmiškai reagavo su krevetės tropomiozinu. Vėliau tropomiozinas buvo aptiktas ir atlantinėje lašišoje (Sal s 4) ir siaminėje pangasijoje (Pan h 4) (Klueber et al., 2019; Kalic et al., 2021).

Vitelogeninai – glikoproteinai (150 kDa), aptikami žuvų ikruose, dar vadinami kiaušinio trynio pirmtakais, kurie aprūpina embrioną lipovitino (lipido) ir fosvitino (fosfato) atsargomis. Šie žuvies alergenai pasižymi stabilumu ir didele koncentracija ikruose. Vitelogeninai yra aptikti lašišos, upėtakio ir eršketo ikruose, bet žuvies alergenų yra pripažintas kol kas tik 35 kDa vitelogenino fragmentas (Onc k 5) išskirtas iš ketos (angl. *chum salmon*). Viename atliktame tyrime buvo parodyta, kad pacientų, kuriems anafilaksiją sukėlė lašišos ikrai, kraujo serume esantys IgE kryžmiškai reagavo su silkės ikrais (Kleine-Tebbe and Jakob, 2017; Matricardi et al., 2016; Klueber et al., 2019; Kondo et al., 2005). 2019 m. buvo aprašytas pirmasis klinikinis atvejis Lietuvoje, kai pacientei buvo nustatyta alergija žuvies ikrams (Rudzevičienė, 2021).

1.5. Rekombinantiniai žuvų alergenai

Atliekant alergijos testus ar kuriant analitines sistemas yra naudojami ne tik natūralūs alergenų ekstraktai, bet taip pat ir natūralūs, t. y., iš alergeno ekstrakto išgryninti alergeno komponentai. Tačiau ruošiant atskirus alergeno komponentus susiduriama su keliomis problemomis. Pirma, alergenų ekstrakto gali būti aptinkamos kelios alergeno izoformos, kurias atskirti viena nuo kitos gryninimo metu yra sunku. Antra, tam tikrų alergenų kiekis ekstraktuose yra labai mažas ir išsigryninti didelius kiekius norimo alergeno

tampa neįmanoma (Tschepe and Breiteneder, 2017). Siekiant išspręsti susidariusias problemas buvo pradėti kurti rekombinantiniai alergenai (Jutel et al., 2012). Šie alergenai pasižymi imunologinėmis savybėmis, būdingomis natūraliems alergenams ir gali būti susintetinti neribotais kiekiais (Lorenz et al., 2001).

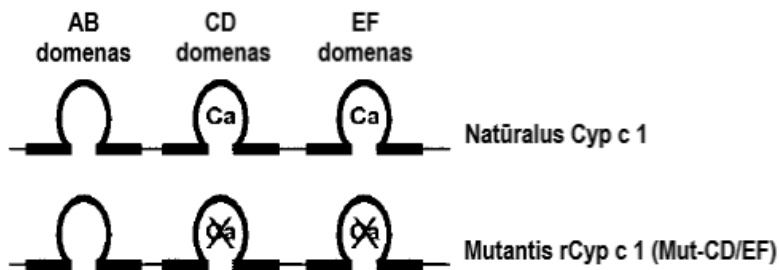
Rekombinantiniai alergenai gali būti sintetinami skirtingose baltymų raiškos sistemose: *E. coli* bakterijose, mielėse, vabzdžių, augalų arba žinduolių ląstelėse, kurios pasižymi skirtingomis savybėmis (pvz., prokariotų sistemoje nėra galimos baltymų potransliacinės modifikacijos – glikozilimas, disulfidinių ryšių formavimas, t. t.), todėl renkantis raiškos sistemą reikia atkreipti dėmesį į natūralaus alergeno struktūrą. *E. coli* bakterijos yra viena iš dažniausiai naudojamų baltymų raiškos sistemų rekombinantinių maisto alergenų (pvz., saliero, žemės riešutų, karvės pieno, sojų pupelių, graikinių riešutų) sintezei. Taip yra dėl greito ląstelių dauginimosi, paprastesnių baltymų sintezės sąlygų ir dėl gebėjimo sintetinti didelius kiekius tikslinio baltymo. Alergeną koduojanti DNR seka įterpiama į pasirinktą raiškos vektorių, kuriuo yra transformuojamos paruoštos *E. coli* bakterijos. Transformuotos bakterijos sintetina alergeną, kuris taikant afininės chromatografijos metodą gali būti išgryninamas iš ląstelių lizato. Siekiant palengvinti rekombinantinio alergeno gryninimą ir pagerinti jo tirpumą, jis gali būti susintetintas kartu su suliejimo partneriu (pvz., su maltozę surišančiu baltymu (MBP), glutationo S-transferaze (GST)) (Grozdanovic et al., 2014; Lorenz et al., 2001; Larsen et al., 2020).

Rekombinantiniai alergenai gali būti naudojami tiek alergenų ekstraktų standartizavimui, tiek atliekant alergijos testus, taip siekiant pagerinti atliekamo testo jautrumą. Tuo tarpu alergenų specifinei imunoterapijai (ASIT) yra kuriami ir taikomi hipoalerginiai rekombinantiniai alergenai, kurie yra skirti alergijos gydymui (nesukelia pacientams alergijos simptomų) (Grozdanovic et al., 2014; Zhernov et al., 2019).

Pirmasis rekombinantinis žuvies alergenai buvo susintetintas *E. coli* bakterijose ir tai buvo paprastojo karpio β -parvalbuminas (rCyp c 1.01). Žiedinio dichroizmo spektroskopijos metodu nustatyta, kad išgryninto rCyp c 1.01 struktūra pasižymėjo bruožais, būdingais natūraliam Cyp c 1 baltymui, o masių spektrometrijos metodu įvertinta baltymo molekulinė masė (11,416 kDa). Taip pat buvo parodyta, kad tiek MAK prieš karpio parvalbuminą (PA-235), tiek žuviai alergiškų pacientų serume esantys IgE antikūnai sąveikavo su rCyp c 1. Be to, buvo nustatyta, kad šis rekombinantinis alergenai turi IgE būdingus epitopus, aptinkamus ir kitų žuvų rūšių (tuno, lašišos ir menkės) parvalbuminuose. Atliktas bazofilų aktyvacijos testas parodė, kad rCyp c 1 sukėlė specifinį ir nuo alergeno dozės priklausomą histamino išsiskyrimą iš

žuviai alergiškų pacientų bazofilų. Visi šie rezultatai patvirtino, kad sukurtas rekombinantinis alergenai pasižymi savybėmis, būdingom natūraliam alergenai (Swoboda et al., 2002b). Be jau minėto paprastą karpio, yra susintetinti atlantinės lašišos, atlantinės menkės, aliaskinė rudagalvės menkės ir paprastosios vilkasilkės rekombinantiniai β -parvalbuminai, su kuriais sąveikavo žuviai alergiškų pacientų serumuose esantys IgE, taip parodant galimybes šių baltymų pritaikymui alergijų tyrimams (Van Do et al., 1999; Swoboda et al., 2002a; Van Do et al., 2003; Van Do et al., 2005a; Ma et al., 2008; Mohammadi et al., 2017; Sun et al., 2019).

Atliktais tyrimais buvo parodyta, kad kalcio jonai parvalbuminams yra svarbūs ne tik palaikyti tinkamą baltymo struktūrą, bet ir suteikia atsparumą aukštai temperatūrai ir virškinimo trakto fermentams. Netekus kalcio jonų, stebimi parvalbuminų struktūros pokyčiai, kurie lemia, kad pacientų serume esantys IgE nebegali prisijungti prie tokio alergeno (Ma et al., 2008). Siekiant pritaikyti poodinį imunoterapijos metodą alergijos žuviai gydymui, buvo nuspręsta sukurti rekombinantinį žuvies alergeną, kuris pacientams nesukeltų alergijos simptomų, t. y. hipoalerginį baltymą. Šiam tikslui rCyp c 1 baltyme funkcinuose kalcio surišimo vietose (CD ir EF domenuose) buvo įvestos taškinės mutacijos pasitelkus kryptingosios mutagenezės metodą (1.8 pav.).



1.8 pav. Natūralaus Cyp c 1 ir mutantinio rCyp c 1 (Mut-CD/EF) baltymų schematinis trijų EF rankos motyvų (AB, CD ir EF) palyginimas. Mut-CD/EF baltymo funkcinuose kalcio surišimo vietose (CD ir EF domenuose) buvo įvestos taškinės mutacijos (schemoje kryžiuoku pažymėtos kilpos, kuriose yra mutacijos) (pritaikyta pagal Swoboda et al., 2007).

Išanalizavus *E. coli* bakterijose susintetintą mutantis rCyp c 1 baltymą (Mut-CD/EF) buvo pastebėti baltymo struktūros pakitimai (lyginant su natyviu parvalbuminu) ir nustatyta, kad jo reaktyvumas su žuviai alergiškų pacientų serume esančiais IgE sumažėjo 95 %. Taip pat pelės antiserumai, gauti imunizuojant BALB/c linijos peles šiuo hipoalerginiu baltymu, kryžmiškai reagavo su natūraliu karpio ir kitų žuvų rūšių (tuno, upėtakio,

starkio) ekstraktuose esančiais parvalbuminiais. Gauti rezultatai parodė, kad šis karpio Mut-CD/EF baltymas galėtų būti pritaikytas kuriant hipoalergines vakcinas gydyti alergijas žuviai (Swoboda et al., 2007).

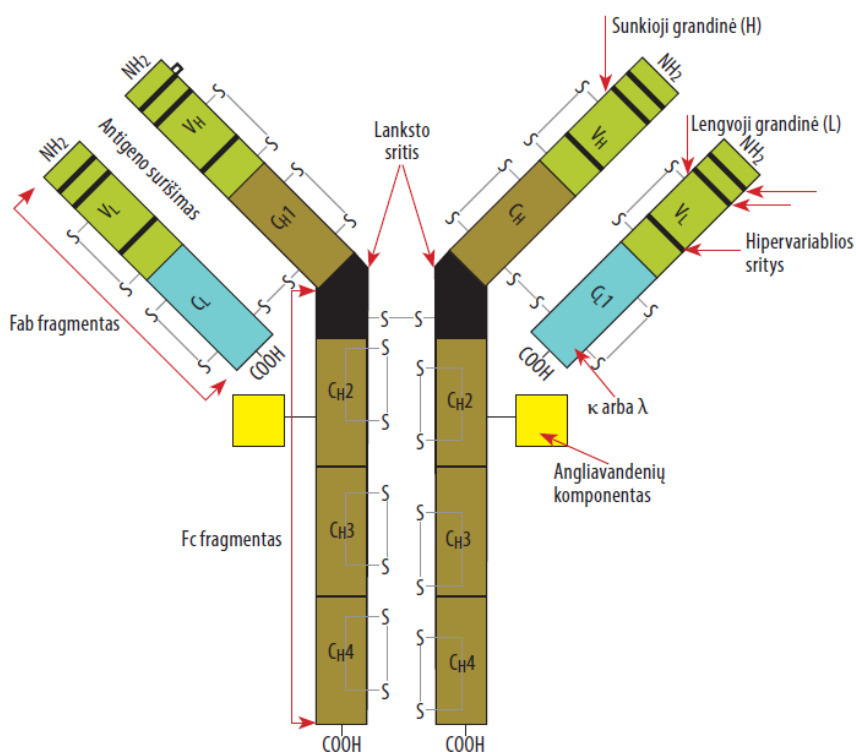
Kadangi karpio β -parvalbumino (Cyp c 1) ir kitų žuvų rūšių β -parvalbuminų aminorūgščių sekos sutampa $> 80\%$, buvo nuspręsta pritaikyti rekombinantinį mutantį rCyp c 1 baltymo (Mut-CD/EF) variantą kuriant hipoalerginę parvalbuminų vakciną, skirtą poodinei žuvies alergijos imunoterapijai (Zuidmeer-Jongejan et al., 2015). Atlikti I/IIa klinikiniai tyrimai parodė, kad preparatas pacientams yra saugus ir toleruojamas, buvo stebimos tik kelios pavienės reakcijos vaisto suleidimo vietoje, todėl buvo nuspręsta tęsti tyrimus ir pradėti IIb fazės klinikinius tyrimus (Jongejan et al., 2016). Tačiau šių tyrimų metu šios vakcinos klinikinis efektyvumas buvo nedidelis, todėl tyrimai buvo nutraukti (Zhernov et al., 2019).

1.6. Antikūnai

Antikūnai, dar vadinami imunoglobulinais (Ig), yra glikoproteinai (~ 150 kDa), kurie geba atpažinti ir neutralizuoti įvairios kilmės antigenus (pvz., baltymus ir kitas molekules, bakterijas, virusus, infekuotas ląsteles ir t. t.). Antikūnai sintetunami ir sekretuojami plazminių ląstelių po stimuliacijos antigenu. Organizme antikūnai gali būti dviejų formų: antigenų receptoriais, išsidėsčiusiais B ląstelių membranų paviršiuje, arba sekretuojami. Sekretuojami antikūnai aptinkami gleivinės sekretuose, kraujo plazmoje. Infekcijos metu jie dalyvauja mikrobinių toksinų neutralizacijoje, apsaugo organizmą nuo patogenų patekimo ir plitimo. Antikūnai yra sudaryti iš dviejų identiškų sunkiųjų (angl. *heavy chains* (*H*), 50 kDa) ir lengvųjų (angl. *light chains* (*L*), 25 kDa) grandinių, sujungtų disulfidiniais ryšiais (1.9 pav.), ir turinčių po pastovųjį (angl. *constant* (*C*)) ir kaitųjį (angl. *variable* (*V*)) regionus. Abi Ig grandinės turi po keletą pasikartojančių homologinių struktūrinių vienetų (~ 110 aminorūgščių), vadinamų Ig domenais. Sunkiosios grandinės V regionas sudarytas iš vieno Ig domeno, o C regionas iš 3–4 domenų. Lengvosios grandinės turi po vieną Ig domeną V ir C regionuose. Imunoglobulinų H ir L grandinių V regionuose yra po tris hipervariabiliąsias sritis (angl. *complementarity determining regions* (*CDR*)), t. y. aminorūgščių sekas, kurios pasižymi didžiausia aminorūgščių įvairove, lemiančia antikūnų gebėjimą atpažinti daug skirtingų antigenų. Visos šios antikūno hipervariabiliosios sritys kartu suformuoja antigeną surišančią struktūrą, todėl antikūno abiejų grandinių V regionai dalyvauja antigeno atpažinime, o tuo tarpu sunkiosios grandinės C regionas svarbus vykdant antikūno efektorines funkcijas. Antikūno molekulę paveikus proteolitiniais fermentais (pvz.,

papainu), ji suskaldoma į tris dalis: į du Fab (antigeną surišančias dalis) fragmentus ir į vieną Fc (kristalizuojamą dalį) fragmentą (Abbas et al., 2018; Tamošiūnas et al., 2015; Tamošiūnas et al., 2012; Zlatina and Galuska, 2021).

Prie imunoglobulinų gali būti prisijungę nedideli oligosacharidai (N-glikozilinimas arba O-glikozilinimas), kurių kiekis ir vieta Ig molekulėje (pvz., lanksto srityje, Fc arba Fab fragmentuose) tarp skirtingų Ig klasių gali skirtis. Be to, jie svarbūs Ig molekulės struktūros ir funkcijų palaikymui, bei gali apsaugoti nuo proteolitinių fermentų. Pavyzdžiui, tik apie 2–3 % visos IgG klasės antikūno molekulinės masės yra N-glikozilinta, kai tuo tarpu IgM, IgD ir IgE klasių antikūnų – apie 12–14 % molekulinės masės (Tamošiūnas et al., 2015; Zlatina and Galuska, 2021).



1.9 pav. Žmogaus imunoglobulino struktūra (pritaikyta pagal Tamošiūnas et al., 2015). C_L – lengvosios grandinės, o C_H – sunkiosios grandinės pastovūs domenai. V_L – lengvosios grandinės, o V_H – sunkiosios grandinės kaitūs domenai.

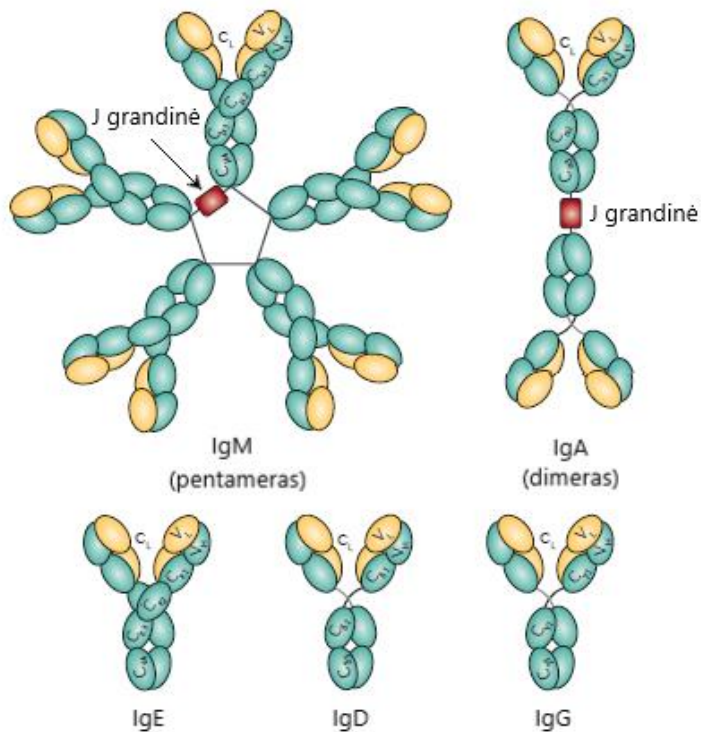
Imunoglobulinų lengvosios grandinės gali būti arba κ, arba λ (skiriasi jų C regionas). Pastebėta, kad žmogaus organizme ~ 60 % antikūnų turi κ lengvąją grandinę, o likę ~ 40 % turi λ grandinę. Tuo tarpu sunkiųjų grandinių yra penki tipai: μ, δ, γ, ε ir α. Antikūnai pagal sunkiosios grandinės tipą skirstomi į penkias atskiras klases: IgM, IgG, IgA, IgD, ir IgE, kurias tarpusavyje skiriasi

savo fizinėmis ir biologinėmis savybėmis, bei efektorinėmis funkcijomis. Žmogaus IgA ir IgG gali būti suskirstyti į dar smulkesnes grupes, t. y. į poklasius: IgA1, IgA2 ir IgG1, IgG2, IgG3 ir IgG4. Be to, IgM ir IgE C regione turi po keturis Ig domenų, visi kiti turi po tris domenų (1.10 pav.) (Abbas et al., 2018; Abbas et al., 2020; Murphy and Weaver, 2017).

IgM (turintis μ sunkiąją grandinę) yra pirmasis antikūnas, kuris sintetinamas pirminio imuninio atsako metu (pvz., infekcijos pradžioje). Organizme IgM aptinkamas naiviųjų B ląstelių membranos paviršiuje (kaip monomeras) ir sudaro dalį B ląstelių receptoriaus. Jis taip pat cirkuliuoja kraujo plazmoje (pentameras) ir dalyvauja apsaugant organizmą nuo patogenų (pvz., gali neutralizuoti antigenus, aktyvinti komplementą). IgD (turintis δ sunkiąją grandinę) yra kitas antikūnas, kurio monomeras irgi išsidėstęs B ląstelių paviršiuje ir taip pat kaip IgM, asocijuodamas su ląstelių paviršiuje esančiomis Ig- α ir Ig- β membraninėmis molekulėmis, suformuoja B ląstelių receptorių, kuris sąveikauja su antigenu. Kraujo serume taip pat galima aptikti nedidelius kiekius IgD. Manoma, kad jis sąveikauja su specifiniais bakterijų baltymais ir taip aktyvina B ląsteles. IgA klasės antikūnų (turinčių α sunkiąją grandinę) daugiausiai randama gleivinės paviršiuje ir sekretuose (piene, seilėse, ašarose, virškinimo sistemos gleivėse). Jie sudaro 10–15 % visų kraujo serume esančių Ig. Šie antikūnai dalyvauja apsaugant gleivinės paviršių nuo toksinų, virusų, bakterijų (neutralizuojant arba neleidžiant prisijungti prie gleivinės paviršiaus). Serume IgA yra monomeras, tačiau sekretuose dažniausiai aptinkamas IgA dimerai (gali būti ir trimerai arba tetramerai), kurie vadinami sekreciniais IgA. IgA1 ir IgA2 yra IgA poklasiai, o jų pagrindinis skirtumas yra antikūno lanksto sritis (J grandinė), kuri lemia, kad IgA2 yra vyraujantis poklasis sekretuose, o IgA1 – kraujo serume. Motinos piene esantys IgA klasės antikūnai apsaugo naujagimius (Schroeder and Cavacini, 2010; Tamošiūnas et al., 2015; Tamošiūnas et al., 2012).

Kraujo plazmoje dominuoja IgG klasės antikūnai, turintys γ sunkiąją grandinę. Žmogaus IgG klasės antikūnai yra skirstomi į keturius poklasius (IgG1, IgG2, IgG3 ir IgG4), kurie tarpusavyje skiriasi sunkiosios grandinės C regionu ir atliekama funkcija. Šios klasės antikūnai yra svarbūs ilgalaikiai organizmo apsaugai nuo infekcijų, bakterijų ir virusų, kadangi dalyvauja įvairiuose procesuose – aktyvina komplementą, sukelia nuo antikūnų priklausomą NK ląstelių (angl. *natural killer cell*) citotoksinę reakciją (angl. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC)), aktyvina fagocitus, perduodami per placentą. Kraujo serume mažiausia koncentracija yra IgE klasės antikūnų (< 1 % visų Ig), kuri padidėja esant organizme parazitinei (helmintų) infekcijai, alerginės reakcijos metu ar tam tikrų ligų metu (pvz., Omeno sindromo atveju). IgE klasės antikūnai (turintys ϵ sunkiąją grandinę) jungiasi

prie putliųjų ląstelių, bazofilų, eozinofilų ir Langerhanso ląstelių paviršiuje esančių FcεR receptorių. Prisijungus prie aukšto giminingumo FcεR receptorių, aktyvinamos ląstelės, vyksta jų degranuliacija – atpalaiduojami uždegimo mediatoriai, kurie lemia alergijos simptomus (Schroeder and Cavacini, 2010; Tamošiūnas et al., 2015; Tamošiūnas et al., 2012).



1.10 pav. Penkių žmogaus imunoglobulinų klasių (IgM, IgA, IgE, IgD ir IgG) struktūrų palyginimas. J grandinė jungia IgA ir IgM monomerus (pritaikyta pagal Duarte, 2016).

1.7. Monokloniniai antikūnai

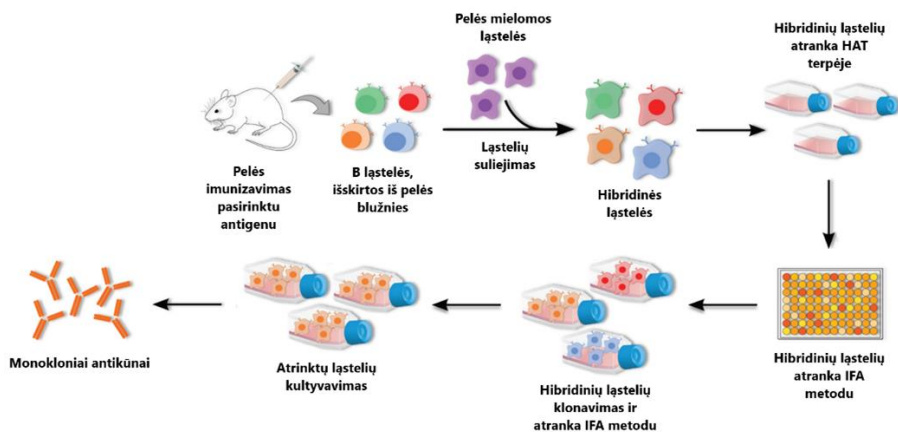
Monokloniniai antikūnai (MAk) – tai antikūnai, kurie sekretuojami vieno hibridomų klonu ir atpažįsta vieną antigeno epitopą. Hibridomos sukuriamos taikant hibridomų technologiją (1.11 pav.). Pirmiausia pasirinktu antigenu imunizuojamas laboratorinis gyvūnas, dažniausiai linijinės pelės (pvz., BALB/c), kad jų organizme esančios B ląstelės pradėtų gaminti antikūnus prieš tą antigeną. Imunizacijos gali būti vykdomos keletą kartų per pasirinktą laiko periodą (pvz., keletą mėnesių, kas 2–3 savaites). Jų metu gali būti naudojami adjuvantai, kurie sustiprina imuninį atsaką į antigeną. Taikant imunofermentinės analizės (IFA) metodą gali būti tikrinamas imunizuotų

gyvūnų kraujas, siekiant nustatyti susidariusių antikūnų prieš tikslinį antigeną titrą. MAk kūrimui naudojama imunizuoto gyvūno blužnis, kurioje yra aptinkama daug B ląstelių, sekretuojančių antikūnus prieš antigeną. Pelės hibridomų kūrimui naudojamos pelės mielomos ląstelės, kurios neturi hipoksantino-guanino fosforiboziltransferazės (angl. *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT)*) geno ir nesekretuoja imunoglobulinų. Hibridizacijos metu imunizuotos pelės blužnies ląstelės suliejamos su pelės mielomos ląstelėmis – taip gaunamos naujos hibridinės ląstelės, pasižyminčios neribotu dalijimosi potencialu ir galimybe sekretuoti antikūnus. Ląstelių suliejimo metu gali būti naudojamas polietileno glikolis (PEG), kuris skatina ląstelių plazminių membranų susiliejimą ir naujų hibridinių ląstelių susidarymą. Po hibridizacijos ląstelių mišinys yra sudarytas ne tik iš hibridomų, bet taip pat iš nesusiliejusių ląstelių, susiliejusių dviejų mielomos arba dviejų B ląstelių, todėl ląstelės kultivuojamos selektyvioje hipoksantiną-aminopteriną-timidiną (HAT) turinčioje terpėje. Šioje terpėje esantis aminopteras blokuoja nukleotidų *de novo* sintezę, todėl tokioje terpėje išgyvena tik HGPRT geną turinčios hibridinės ląstelės, nes jose nukleotidai gali būti sintetinami alternatyviuoju keliu. HAT terpėje mielomos ląstelės ir jų hibridai neišgyvena ir žūsta, nes neturi HGPRT geno. Tuo tarpu B limfocitai ir šių ląstelių hibridai nors ir turi HGPRT geną, tačiau jų gyvavimo trukmė yra trumpa ir po kelių dienų jie žūsta. Atlikus hibridizaciją ląstelės skiedžiamos ir išsėjamos specialiose plokštelėse taip, kad šulinėlyje būtų ląstelių populiacija kilusi iš vienos hibridinės ląstelės, t. y. vykdomas klonavimas. Taikant imunocheminius metodus atsirenkamos tik tos hibridinės ląstelės, kurios sekretuoja antikūnus prieš tikslinį antigeną. Atrinktos ląstelės toliau kelis kartus klonuojamos ir tikrinamos, siekiant gauti stabilias hibridinių ląstelių linijas, kurios sekretuoja MAk į ląstelių augimo terpę. Stabilios hibridomos yra šaldomos ir saugomos skystame azote arba toliau kultivuojamos, kol surenkamas reikiamas MAk kiekis tolimesniems darbams (Tabl et al., 2015; Mitra and Tomar, 2021).

Siekiant išanalizuoti sukurtų MAk savybes ir įvertinti galimą jų pritaikomumą, jie išsamiai apibūdinami taikant įvairius metodus (pvz., IFA, imunoblotas). Apibūdinimo metu siekiama nustatyti MAk klasę ir poklasį (tai svarbu renkantis antikūno gryninimo metodą), nustatyti jų giminingumo konstantą, įvertinti antikūnų specifiskumą antigenui, ištirti galimą kryžminį reaktyvumą ir t. t. (Nelson et al., 2000).

MAk plačiai naudojami įvairioms žmonių ligoms nustatyti ir tirti (pvz., hepatitui, gripui), įvairių infekcijų ir vėžio gydymui, bei tam tikrų molekulių aptikimui analizuojamuose mėginiuose (Ghagane et al., 2017). Polikloniniai antikūnai (PAk) yra išskiriami iš imunizuoto gyvūno kraujo serumo – tai

mišinys antikūnų, kurie sintetinami skirtingų B ląstelių klonų ir sąveikauja su įvairiais tikslinio antigeno epitopais. Kadangi PAK yra heterogeninis antikūnų mišinys, jis gali pasižymėti didesniu jautrumu antigeniui, bei didesniu stabilumu pasikeitus aplinkos sąlygoms (pvz., tirpalo druskų koncentracijoms, pH), todėl gali būti pritaikytas kuriant analitines sistemas įvairių molekulių aptikimui (pvz., virusų antigenų, maisto alergenų). Tačiau pasibaigus PAK atsargoms turi būti vykdomos naujos gyvūnų imunizacijos, todėl po kiekvienos imunizacijos gaunamų PAK aktyvumas ir titrai gali skirtis nuo ankstesnės antikūnų partijos (Leenaars et al., 1999; Mitra and Tomar, 2021; Panawala, 2017; Mrkvová et al., 2022).



1.11 pav. Hibridomų technologijos schema. Taikant šią technologiją gyvūnas (pvz., pelė) imunizuojamas pasirinktu antigenu. Vėliau pelės blužnies ląstelės suliejamos su pelės mielomos ląstelėmis, siekiant sukurti hibridines ląsteles (hibridomas). Hibridomų atranka vykdoma jas auginant HAT turinčioje terpėje. Vėliau taikant IFA metodą atrenkamos tik tos hibridinės ląstelės, kurios sekretuoja antikūnus prieš tikslinį antigeną, kuriuo buvo imunizuota pelė. Šios ląstelės kelis kartus klonuojamos ir tikrinamos IFA metodu, kol atrenkamos stabilios antikūnus sekretojančios hibridomas. Toliau šios ląstelės arba kultivuojamos ir renkama augimo terpė, kurioje yra MAK, arba šaldomos ilgesniam saugojimui (pritaikyta pagal Loureiro et al., 2015).

1.7.1. Monokloniniai antikūnai prieš žuvų alergenų

1988 m. paskelbtoje publikacijoje buvo paminėti pirmieji pelės MAK (klonai 235, 239 ir 267), sukurti prieš išgrynintą karpio parvalbuminą, kurie kryžmiškai reagavo su pelės, žiurkės ir beždžionės parvalbuminiais (Celio et al., 1988). Keletas pelės MAK buvo sukurtas prieš australinio tuno parvalbuminą, kurie taip pat atpažino ir paprastojo karpio parvalbuminą (Kawase et al., 2001). MAK 3F1 yra pelės antikūnas, sukurtas prieš termiškai

apdorotą šamažuvės raumenų ekstraktą, kuris skirtingų žuvų rūšių (pvz., Ramiojo vandenyno ešerio, tilapijos, mėlynosios menkės) ekstraktuose aptiko žuvų parvalbuminus ir nesąveikavo su kitų gyvūnų ekstraktais (pvz., varlės, vištos, kiaulės ir t. t.) (Gajewski and Hsieh, 2009). Taip pat pelės MAk prieš termiškai apdorotą karibinio rifešerio ekstraktą (2A4, 3F5 ir 8F5) pasižymėjo plačiu reaktyvumu su skirtingų žuvų rūšių ekstraktais. MAk 2A4 ir 3F5 kryžmiškai reagavo su kitų gyvūnų raumenų ekstraktais (pvz., varlės, žiurkės), kai tuo tarpu MAk 8F5 sąveikavo tik su žuvų mėginiais (Chen and Hsieh, 2021). Pasitelkus fagų raiškos (angl. *phage display*) technologiją buvo sukurti du rekombinantiniai antikūnai (vienos grandinės kintatieji fragmentai (angl. *single chain variable fragment (scFv)*)), prieš žuvų parvalbuminus, kurių vienas klonas (scFv-gco9) sąveikavo su visais tirtais parvalbuminiais (Gad m 1, Cyp c 1 ir Onc m 1), o kitas klonas (scFv-goo8) – tik su Gad m 1 (Bublin et al., 2015). Iš visų paminėtų MAk prieš žuvų parvalbuminus, MAk prieš karpio parvalbuminą (PV 235, Swant, Šveicarija) yra komercinis (Lee et al., 2011). Buvo sukurti ir PAK prieš žuvų alergenų. Buvo parodyta, kad triušio PAK prieš išgrynintą menkės parvalbuminą ir triušio PAK prieš rekombinantinį japoninės skumbrės parvalbuminą irgi reaguoja su įvairių žuvų (pvz., silkės, sardinės, upėtakio) ekstraktuose esančiais parvalbuminiais (Lee et al., 2011; Shibahara et al., 2013). Triušio PAK prieš išgrynintus parvalbuminus (baltojo baramundžio, plačiakaktės pangasijos, rytinės sardinės ir atlantinės lašišos) irgi pasižymėjo kryžminiu reaktyvumu ir sąveikavo su skirtingų žuvų rūšių ekstraktais. Manoma, kad šie antikūnai galėtų būti pritaikyti žuvų parvalbuminų aptikimui maisto produktuose (Sharp et al., 2015).

Įvairiems parvalbuminų tyrimams dažniausiai naudojamas komercinis MAk PARV-19, skirtas žuvų parvalbuminams aptikti tiriamuose mėginiuose. PARV-19 (Merck, Vokietija) yra pelės MAk, sukurtas prieš varlės raumens parvalbuminą. Atliektais eksperimentais buvo parodyta, kad šis antikūnas atpažino žuvų parvalbuminus daugelyje tirtų žuvų ekstraktuose (pvz., karpio, menkės, šamo, sardinės ir t. t.) (Chen et al., 2006; Lim et al., 2008).

Apie sukurtus MAk ir PAK prieš kitus žuvų alergenų (β -enolazę, aldolazę A, tropomioziną, kolageną ir vitelogeniną) kol kas nėra duomenų.

1.8. Alergenų ekstraktai

Alergenų ekstraktas yra alergenų ir kitų junginių (baltymų, lipidų, angliavandenių) mišinys, išskirtas iš natūralaus alergenų šaltinio (Kleine-Tebbe and Jakob, 2017). Ekstraktai yra plačiai naudojami taikant alergenų specifinę imunoterapiją ir alergijų diagnostikoje, atliekant odos dūrio mėginių

tyrimus, tačiau jie turi keletą trūkumų. Pirmiausia, alergenų ekstraktuose gali pasitaikyti proteazių, kurios gali suskaldyti alergeną, arba jie gali būti užteršti pašaliniais junginiais. Antra, juose gali būti nepakankamas kiekis tam tikro alergeno komponento arba jo iš viso gali nebūti, o tai gali lemti klaidingus atliktų testų rezultatus. Alergeno komponentas – tai alergenų šaltinyje esantis, dažniausiai baltyminės struktūros, atskiras alergenas. Pavyzdžiui, β -parvalbuminas yra alergeno komponentas, išskirtas iš žuvies raumens (alergenų šaltinio). Palyginus tarpusavyje tos pačios žuvies rūšies alergenų ekstraktus, paruoštus kelių skirtingų gamintojų, buvo nustatyta, kad tam tikrų alergenų komponentų kiekis juose skiriasi (pvz., parvalbuminas buvo aptiktas tik 1 iš 4 tirtų skirtingų gamintojų tuno ekstraktų). Taip pat ruošiant ekstraktus reikia laikytis protokoluose nurodytų sąlygų, nes bet koks pakeitimas (pvz., naudojamų reagentų, temperatūros) gali lemti tam tikrus alergenų struktūros pokyčius, pakeisti galutinį jų kiekį ekstrakto. Ruošiant maisto alergenų ekstraktus, svarbu atkreipti dėmesį, ar naudojamas maisto alergenų šaltinis yra tinkamas (pvz., ar vaisius nėra pernokęs, ar šviežia žuvis) (Ruethers et al., 2019; Valenta et al., 2018; Tuppo et al., 2022; Lorenz et al., 2001). Manoma, kad prieš alergenų komponentą sukurti MAk galėtų būti pritaikyti išsamesniam alergenų ekstraktų standartizavimui, t. y. aptiktų ir nustatytų tiriamo alergeno komponento kiekį ekstrakto (Aden et al., 1999; Lombardero et al., 1992; Chapman, 1988; Jeong et al., 2017; Kiyota et al., 2016). Tokiu būdu būtų pagerinama alergenų ekstraktų kokybė ir užtikrinamas atliekamų alergijos testų patikimumas.

1.9. Žuvies alergenų nustatymo metodai

Pacientams, kuriems yra nustatyta alergija žuviai ir kurie vengia valgyti žuvį ir jos produktus, vistiek gali pasireikšti alergijos simptomai. Taip gali nutikti, jei jie vartoja maisto produktus, kurie galėjo būti užteršti žuvies alergenais jų ruošimo metu (per alergenais užterštus peilius ir kitus virtuvėje esančius įrankius), arba dėl produkto etiketėje nenurodytų galimų alergenų. Be to, įvairios medžiagos, gautos iš įvairių žuvies organų ir audinių (oda, plaukimo pūslė), yra plačiai naudojamos maisto pramonėje ir farmacijoje. Pavyzdžiui, žuvies želatina yra naudojama kaip tirštiklis, stabilizatorius įvairių gėrimų (sulčių, alaus, vyno), maisto produktų (guminukų) ir vaistinių preparatų (kapsulių) gamyboje. Siekiant apsaugoti alergija sergančius pacientus nuo nepageidaujamų organizmo reakcijų, kuriami įvairūs metodai, skirti žuvų parvalbuminų aptikimui maisto produktuose: realaus laiko polimerazės grandininė reakcija (PGR), imunoblotas, imunofermentinė analizė (IFA), imunochromatografija, biosensoriai ir kiti. Maisto pramonėje

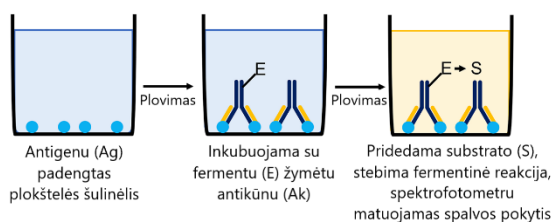
vienas dažniausiai naudojamų metodų yra IFA, kuris užtikrina greitą, specifiską, didelio jautrumo maisto alergenų analizę (van der Ventel at al., 2011; Weber et al., 2009; Fernandes et al., 2015; Zhang et al., 2021; Liang et al., 2022).

Imunocheminių analizės metodų patikimumą lemia tiksliniam antigenui specifiskų antikūnų kokybė. Žuvų parvalbuminams specifiskų MAK ir PAK kūrimui buvo naudojami iš įvairių žuvų rūšių (šamo, sardinės, baltojo plačiakakčio, atlantinės lašišos, atlantinės menkės) paruošti ekstraktai arba išgryninti parvalbuminai. Šie antikūnai buvo pritaikyti kuriant imunocheminius metodus, skirtus žuvų parvalbuminų aptikimui maisto mėginiuose (Gajewski and Hsieh, 2009; Sharp et al., 2015; van der Ventel et al., 2011; Zhang et al., 2021; Koppelman et al., 2012). Triušio PAK prieš išgrynintą atlantinės menkės parvalbuminą ir PAK prieš rekombinantinę japoninę skumbrę buvo pritaikyti kuriant dviepitopės IFA metodus, kuriuos būtų galima pritaikyti parvalbuminų aptikimui analizuojamuose maisto produktuose (Faeste and Plassen, 2008; Shibahara et al., 2013). Taikant konkurencinės IFA metodą ir naudojant MAK prieš išgrynintą baltąjį plačiakaktį, parvalbuminai buvo nustatyti skirtingų žuvų rūšių (tilapijos, raudonojo karoso, baltojo amūro, unгурio) mėginiuose (Cai et al., 2013). Taip pat sukurtu dviepitopės IFA metodu, naudojant triušio ir ožkos PAK prieš jūros ešerio ekstraktą, buvo galima aptikti skirtingų žuvų rūšių baltymus įvairiuose maisto mėginiuose (pvz., žuvies padaže, jūros gėrybėse) (Dasanayaka et al., 2021).

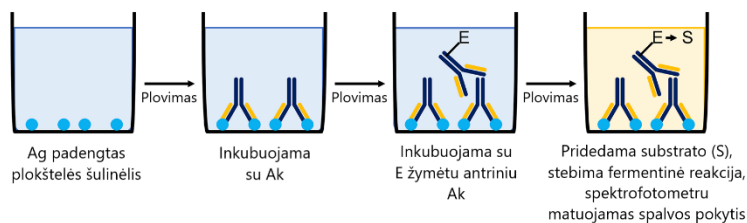
IFA yra vienas iš imunodiagnostikos metodų, pagrįstų antikūno ir antigeno sąveika, kuri yra įvertinama pagal fermento aktyvumą (fermentas būna prijungtas prie vieno iš reakcijos komponentų). Šis metodas pasižymi dideliu jautrumu, todėl plačiai naudojamas įvairių molekulių kokybiniam ir kiekybiniam nustatymui tiriamuosiuose mėginiuose, taip pat kuriant įvairius diagnostinius testus (pvz., nėštumo, virusų sukeltų infekcijų, vėžio žymenų ir t. t.). IFA gali būti skirtingų tipų: netiesioginė, tiesioginė, konkurencinė ir dviepitopė (1.12 pav.). Dviepitopė IFA yra vienas dažniausiai naudojamų metodų, kuriant įvairias analitines sistemas, kadangi šiuo metodu galima analizuojamame mėginyje kiekybiškai nustatyti tiriamąjį antigeną. Jos metu naudojami du antikūnai, kurie sąveikauja su tuo pačiu baltymu, tik atpažįsta skirtingas jo sritis. Pirmasis antikūnas, kuriuo padengiama IFA plokštelė, naudojamas antigeno atpažinimui ir prijungimui prie plokštelės. Antrasis antikūnas pažymimas fermentu ir naudojamas spalviniam signalui gauti (Alhajj and Farhana, 2022; Sakamoto et al., 2018). Taigi, siekiant sukurti alergenų kiekybinio nustatymo sistemas, būtina turėti 2 nekonkuruojančius MAK, kurie atpažintų skirtingas alergenų molekulių sritis.

Yra žinomi keli komerciniai IFA ir greitųjų testų rinkiniai, skirti žuvų baltymų aptikimui maisto produktuose: „3M™ Fish Protein ELISA Kit“ (3M Science. Applied to Life, JAV), „The AgraQuant® Fish“ (Romer Labs Division Holding GmbH, Austrija) ir „Agitest Food Allergen Rapid Test Fish“ (Rega Biotechnology Inc, Taivanas) (Fernandes et al., 2015; Yuk et al., 2021).

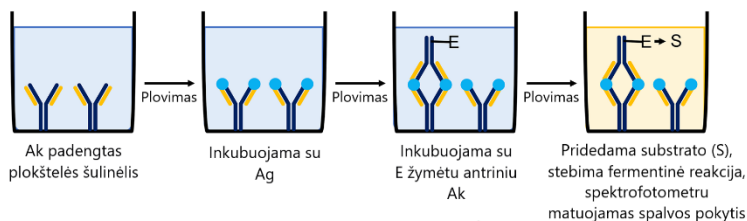
Tiesioginė IFA



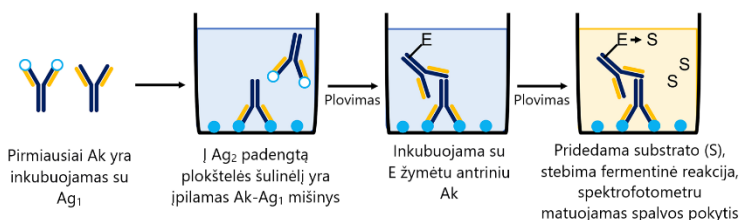
Netiesioginė IFA



Dviepitopė IFA



Konkurencinė IFA



1.12 pav. Imunofermentinės analizės (IFA) tipai (pritaikyta pagal Boguszewska et al., 2019).

Be IFA, MAk prieš baltojo plačiakakčio parvalbuminą buvo pritaikyti kuriant dviepitopį imunochromatografijos metodą, skirtą aptikti parvalbuminus analizuojamuose mėginiuose. Sukurtas metodas pasižymėjo ne tik kryžminiu reaktyvumu (parvalbuminai buvo aptikti keliose skirtingose žuvų rūšyse), bet ir greitumu, t. y. mėginių analizė atliekama per 15 min. Optimizavus ir atlikus papildomus tyrimus, šis metodas galėtų būti pritaikytas greitam parvalbuminų nustatymui maisto produktuose (Zhang et al., 2020). Šio metodo pagrindu buvo sukurtas komercinis rinkinys „Fish Protein Rapid Test“ (FISH-1014, Elution Technologies, JAV), kuriuo per 10 min. galima aptikti žuvies baltymus maisto produktuose (Fernandes et al., 2017).

Nors šiuo metu jau sukurta nemažai skirtingų IFA rinkinių, skirtų aptikti žuvų alergenų tiriamuosiuose mėginiuose, tačiau jų taikymo galimybės gana ribotos, kadangi šiais rinkiniais aptinkami tik tam tikrų žuvies rūšių alergenai. Taigi, kiekvienam alergenui reikalingi skirtingi analitiniai testai. Pasaulyje kasmet atrandama ir apibūdinama vis daugiau skirtingų žuvų rūšių alergenų, todėl yra didelis poreikis sukurti kuo universalesnes analitines sistemas (Kalic et al., 2021). Tokiems testams sukurti reikalingi aukšto giminingumo ir plataus specifiškumo antikūnai, gebantys atpažinti konservatyvius žuvų alergenų epitopus, esančius skirtingų žuvų rūšių alergenuose.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

Ruošiant visus tirpalus, jei nėra įvardijamas konkretus tirpiklis, buvo naudojamas distiliuotas vanduo. Reagentai, jei nėra nurodytas gamintojas, buvo įsigyti iš Carl Roth (Vokietija) arba Merck Group (Sigma-Aldrich, Millipore) (Vokietija).

2.1.1. Bakterijų kamienai ir vektoriai

Rekombinantinių baltymų ir persiklojančių fragmentų sintezei naudotas pET28-MBP-TEV vektorius gautas iš Zita Balklava ir Thomas Wassmer (plasmid #69929, Addgene, <http://n2t.net/addgene:69929>) ir *Escherichia coli* (*E. coli*) DH10B, BL21 (DE3), BL21 (DE3) Star, Tuner (DE3) kamienai, gauti iš dr. Mildos Plečkaitytės (VU GMC BTI ILS).

Alergenus koduojančių genų sekos, su BamHI ir XhoI restrikcijos endonukleazių (RE) atpažinimo sritimis, buvo susintetintos ir įterptos į pMA-RQ vektorių ir gautos iš Invitrogen (JAV). Sekos buvo paimtos iš WHO/IUIS alergenų nomenklatūros (<http://www.allergen.org/>) ir Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) duomenų bazių (3.1 lentelė).

2.1.2. Terpės

Buvo naudojamos šios terpės:

Darbui su bakterijomis: agarizuota mitybinė *Luria-Bertani* (LB) terpė ir skysta LB mitybinė terpė.

Darbui su žinduolių ląstelėmis:

Ląstelių augimo terpė be serumo: *Dulbecco* modifikuota *Eagle* terpė (DMEM), 0,002 mol/L L-glutamino, 300 µg/mL gentamicino;

Ląstelių augimo terpė su serumu: DMEM, 0,002 mol/L L-glutamino, 200 µg/mL gentamicino ir 9–15 % fetalinio veršiuko serumo (FBS) (Biochrom, JK);

Ląstelių šaldymo terpė: 90 % FBS, 10 % dimetilsulfoksido (DMSO).

2.1.3. Tirpalai

„50 x Tris-acetate-EDTA (TAE)“ buferinis tirpalas (Thermo Fisher Scientific, JAV);

1 mol/L Tris-HCl buferinis tirpalas, pH 8;

12 % skiriamasis gelis (4,9 mL 1 geliui): 2 mL akrilamido-bisakrilamido, 1,25 mL Tris-HCl (pH 8,8), 50 µL 10 % natrio dodecilsulfato (NDS), 1,6 mL distiliuoto H₂O, 25 µL 10 % amonio persulfato (APS), 2,5 mL µL N,N',N'-tetrametiletano-1,2-diamino (TEMED);

4 % koncentruojantis gelis (2,3 mL 1 geliui): 335 µL akrilamido-bisakrilamido, 625 µL Tris-HCl (pH 6,8), 25 µL 10 % NDS, 1,5 mL distiliuoto H₂O, 12,5 µL 10 % APS, 2,5 µL TEMED;

Akrilamido/bisakrilamido tirpalas: 30 % akrilamido ir 0,8 % N,N'-metilenbisakrilamido tirpalas;

Bakterijų biomasės ardymo buferinis tirpalas: 0,02 mol/L Tris-HCl, 0,2 mol/L NaCl, 0,001 mol/L fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF), pH 7,4;

Bakterijų biomasės praplovimo buferinis tirpalas: 0,02 mol/L Tris-HCl, 0,2 mol/L NaCl, pH 7,4;

Bakterijų transformacijos CaCl₂ buferinis tirpalas: 0,005 mol/L Tris-HCl, 0,005 mol/L MgCl₂, 0,1 mol/L CaCl₂, pH 8;

Bakterijų transformacijos NaCl buferinis tirpalas: 0,005 mol/L Tris-HCl, 0,005 mol/L MgCl₂, 0,1 mol/L NaCl, pH 8;

Baltymų elektroforezės buferinis tirpalas: 0,025 mol/L Tris, 0,2 mol/L glicino, 0,0035 mol/L NDS.

Baltymų pernešimo buferinis tirpalas: 0,01 mol/L Tris, 0,057 mol/L glicino, 10 % metanolio;

Ca²⁺/Mg²⁺-IMBT: imobilizacijos buferinis tirpalas su 20 x skiestu tirpalu (0,018 mol/L CaCl₂, 0,07 mol/L KCl, 0,018 mol/L MgCl₂, 2,74 mol/L NaCl);

Eliucijos buferinis tirpalas: 0,1 mol/L glicino, pH 3,0;

Etidžio bromido tirpalas (galutinė koncentracija 0,5 µg/mL);

Fosfatinis buferinis tirpalas (PBS): 0,137 mol/L NaCl, 0,0081 mol/L Na₂HPO₄, 0,0027 mol/L KCl, 0,0015 mol/L KH₂PO₄, pH 7,4;

I užnešimo ir praplovimo buferinis tirpalas: 1,5 mol/L glicino, 3 mol/L NaCl, pH 8,9;

II užnešimo ir praplovimo buferinis tirpalas: 0,1 mol/L Tris-HCl, pH 8;

Imobilizacijos buferinis tirpalas (IMBT): 0,05 mol/L NaHCO₃, pH 9,5;

Imunobloto blokavimo tirpalas: PBS su 2 % pieno milteliais;

Natrio karbonatinis tirpalas antikūnų žymėjimui su HRP: 0,2 mol/L NaHCO₃, 0,2 mol/L Na₂CO₃, pH 9,5;

PBS-T tirpalas: PBS su 0,1 % Tween-20;

Rekombinantinių baltymų gryninimo eliucijos tirpalas: rekombinantinių baltymų gryninimo užnešimo buferinis tirpalas su 0,01 mol/L maltozės;

Rekombinantinių baltymų gryninimo užnešimo buferinis tirpalas: 0,02 mol/L Tris-HCl, 0,2 mol/L NaCl, 0,001 mol/L EDTA, 0,001 mol/L ditiotreitolio (DTT) (Thermo Fisher Scientific, JAV), pH 7,4;

Taškinių bloto blokavimo tirpalas: PBS-T su 2 % BSA.

2.1.4. Rinkiniai

DNR fragmentų klonavimui į vektorių „Rapid DNA Ligation Kit“ (Thermo Fisher Scientific, JAV);

DNR grynimui iš agarozės gelio „GeneJET™ Gel Extraction Kit“ (Thermo Fisher Scientific, JAV);

Kopijinės DNR (kDNR) sintezei „RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Thermo Fisher Scientific, JAV).

Pelės imunoglobulinų klasės ir poklasio nustatymui „Mouse Immunoglobulin Isotyping ELISA Kit“ (BD Biosciences, JAV);

PGR produktų klonavimui į vektorių „CloneJET™ PCR Cloning Kit“ (Thermo Fisher Scientific, JAV);

Plazmidinės DNR grynimui iš bakterijų kultūros „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ (Thermo Fisher Scientific, JAV);

RNR išskyrimui iš audinio „Quick-RNA Miniprep Kit“ (Zymo Research, JAV).

2.1.5. Reagentai

„10 x ROTI®Block“ blokavimo tirpalas;

„2 x DreamTaq PCR Master Mix“ (Thermo Fisher Scientific, JAV);

„2 x Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix“ (Thermo Fisher Scientific, JAV);

„Antifoam 204“ reagentas nuo putojimo;

„Micro test plate PS, 96 wells, 0,3ml, F-shape, SLAS/ANSI 1 & 4, highly transparent, np pcr ready“ (10-121-0000, Nerbe plus, Vokietija) – polistireno plokštelė, naudota optimizuojant dviepitopės IFA metodą.

„Nunc MaxiSorp® flat-bottom“ (44-2404, Thermo Fisher Scientific, JAV) polistireno plokštelė, naudota atlikti netiesioginę, konkurencinę, tiesioginę ir dviepitopę IFA.

1 mL „HiTrap Protein A HP“ kolonėlė (Cytiva, JAV);

1 mL „MBPTrap™ HP“ kolonėlė (Cytiva, JAV);

45 % amonio sulfato tirpalas;

95–98 % sieros rūgštis (H₂SO₄);

96 % maistinis rektifikuotas etilo alkoholis (Vilniaus degtinė, Lietuva);

Agarozė (Thermo Fisher Scientific, JAV);

Baltymų mėginius redukuojantis agentas „Pierce™ Lane Marker Reducing Sample Buffer“ (Thermo Fisher Scientific, JAV);

Baltymų molekulinės masės standartas „PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa“ (Thermo Fisher Scientific, JAV);

Bradfordo reagentas „Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit“ (Thermo Fisher Scientific, JAV);

DNR fragmentų ilgio standartas „GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, JAV);

DNR fragmentų ilgio standartas „GeneRuler™ 50 bp Plus DNA Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, JAV);

Fenilmetilsulfonilchloridas (PMSF);

Glicerolis;

Hipoksantino ir timidino (HT) mišinys;

Hipoksantino, aminopterino ir timidino (HAT) mišinys;

Izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas (IPTG);

Jaučio serumo albuminas (BSA) (PAA Laboratories, Austrija);

Jaučio serumo albuminas standartas (2 mg/mL) baltymų koncentracijos nustatymui Bradfordo metodu (Thermo Fisher Scientific, JAV);

Kanamicinas;

Krienų peroksidazė (HRP);

Metanolis;

Natrio ampicilino druska;

Natrio borohidridas (NaBH₄);

Natrio perjodatas (NaIO₄);

Natrio šarmas (NaOH) (Chempur, Lenkija);

Nepilnas Freundo adjuvantas (Thermo Fisher Scientific, JAV);

Nitroceliuliozinė membrana;

Nudruskinimo kolonėlė „Sephadex G-25 in PD-10“ (Cytiva, JAV);

Pilnas Freundo adjuvantas (Thermo Fisher Scientific, JAV);

Polietilenglikolio tirpalas (PEG-1500);

Polivinildifluorido (PVDF) membrana;

Restrikcijos endonukleazės: BglII, SalI, BamHI, XhoI (Thermo Fisher Scientific, JAV);

TMB imunoblotui „NeA-Blue Precip Tetramethylbenzidine Substrate“ (Clinical Science Products, JAV);

TMB imunofermentinei analizei „NeA-Blue Tetramethylbenzidine Substrate“ (Clinical Science Products, JAV);

Tripano mėlio tirpalas (Thermo Fisher Scientific, JAV).

2.1.6. Alergenų ekstraktai ir maisto produktai

Atlantinė lašišos ekstraktas (Ef41-11.17101, DST, Vokietija).

Atlantinės menkės ekstraktas (Ef3-10.14091, DST, Vokietija).

Atlantinės silkės ekstraktas (Ef21-6.14093, DST, Vokietija).

Paprastąjį karpį ekstraktas (Ef233-3.14064-2, DST, Vokietija).

Paprastasis karpis buvo įsigytas iš Lietuvos valstybinio žuvininkystės ir žuvininkystės tyrimų centro filialas "Šilavoto karpinių žuvų veislynas", Mikalinės kaimas, Šilavoto seniūnija, Prienų rajonas.

Kuoja, karšis, stinta, ešerys ir pūgžlys buvo sugauti Lietuvos ežeruose.

Visos kitos žuvų rūšys, vištiena, kiauliena ir kepimo mielės įsigytos parduotuvėse.

2.1.7. Antigenai, antikūnai ir rekombinantiniai baltymai

Natūralus atlantinės menkės β -parvalbuminas (nGad m 1-601, DST, Vokietija).

Ožkos antikūnai prieš pelės IgG, konjuguoti su krienų peroksidaze „Goat Anti-Mouse IgG (H + L)-HRP“ (#1706516, Biorad, JAV).

Pelės antikūnai prieš žmogaus IgE Fc, konjuguoti su krienų peroksidaze (klonas B3102E8, SouthernBiotech, JAV).

Rekombinantinis maltozę surišantis baltymas (MBP), rekombinantinė *Alternaria alternata* enolazė, sulieta su MBP (MBP-Alt a 6), rekombinantinis *Anisakis simplex* cisteino proteazės inhibitorius, sulietas su MBP (MBP-Ani s 4), susintetinti ir išgryninti VU GMC BTI ILS.

Rekombinantinė TEV proteazė, susintetinta ir išgryninta VU GMC BTI EGIS.

MAk 19C19 prieš rekombinantinį MBP baltymą, sukurtas ir išgrynintas VU GMC BTI ILS.

2.1.8. Eksperimentiniai gyvūnai

Eksperimentams buvo naudojamos BALB/c linijos pelės. Pelės užaugintos VU GMC Biochemijos instituto vivariume ir buvo sveikos, neužkrėtos bakterinėmis arba virusinėmis infekcijomis. Eksperimentus su gyvūnais atliko VU GMC BTI ILS darbuotojai (dr. Martynas Simanavičius, Aistė Sližienė), turintys VU GMC centro išduodą pažymėjimą, suteikiantį teisę darbu su laboratoriniais gyvūnais Lietuvos Respublikoje.

2.1.9. Biologiniai žmogaus kraujo mėginiai

Tyrimai atlikti su 25 žmogaus kraujo serumo mėginiais, įsigytais iš „PlasmaLab International“ (JAV).

2.1.10. Pradmenys ir sintetiniai genai

Oligonukleotidiniai pradmenys buvo susintetinti „Metabion International AG“ (Vokietija).

Pradmenys, skirti pagausinti paprastojo karpio β -parvalbuminą ir β -enolazę koduojančias genų sekas (2.1 lentelė).

2.1 lentelė. Pradmenų sekos. Restrikcijos endonukleazių hidrolizės sritys pabrauktos.

Alergenas	Pradmuo ir jo seka		Restrikcijos endonukleazė
<i>Cyp c 1</i>	Tiesioginis	5'- <u>CGGATCC</u> ATGGCATT GCTGGAATTCTGAATG	BamHI
	Atvirkštinis	5'-GCTCGAGTTATGCCTT GACCAGGGCAGC	XhoI
<i>Cyp c 2</i>	Tiesioginis	5'-GAGATCTATGTCCATC AGTAAGATTCACGCTCG	BglII
	Atvirkštinis	5'-CGT <u>CGACT</u> CAGAGTTT GGGGTGGCGGAA	SalI

Pradmenys, skirti transformacijos klonų atrankai ir įklonuotų fragmentų sekoskaitai (2.2 lentelė).

2.2 lentelė. Klonavimo vektorių sekoskaitai skirtų pradmenų sekos.

Vektorius	Pradmuo ir jo seka	
<i>pJET1.2/blunt</i>	pJET1.2_F	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
	pJET1.2_R	5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG
<i>pET28-MBP-TEV</i>	MBP-F	5'-GATGAAGCCCTGAAAGACGCGCAG
	T7 Term	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG

Susintetintos DNR sekos, skirtos persiklojančių paprastojo karpio β -enolazės fragmentų kūrimui (2.3 lentelė).

2.3 lentelė. Fragmentas ir jo kūrimui naudota DNR seka. Nurodytos restrikcijos endonukleazės, su kuriomis buvo įkirptas pET28-MBP-TEV-Cyp c 2 vektorius.

Fragmentas	Seka	Restrikcijos endonukleazė
<i>MBP-Cyp c 2-C1</i>	5'-TCGAGTAAGCGGCCGCTT	XhoI
<i>MBP-Cyp c 2-C2</i>	5'-GATCCATAAGCGGCCGCT	BamHI

Trečiamjam paprastojo karpio β -enolazės fragmentui (MBP-Cyp c 2-C3) kūrimui buvo naudojama susintetinta Cyp c 2 alergeno seka (nuo 1 iki 435 bazių poros (bp)), kuri buvo įterpta į pMA-RQ vektorių ir gauta iš Invitrogen (JAV).

Pradmenys, skirti pagausinti atlantinės menkės β -parvalbumino ir paprastojo karpio β -parvalbumino persiklojančius fragmentus, kurie buvo sukurti su BamHI ir XhoI restrikcijos endonukleazių atpažinimo sritimis (2.4 lentelė).

2.4 lentelė. Pradmenys alergenų fragmentų kūrimui. Restrikcijos endonukleazių hidrolizės sritys pabrauktos.

Alergenas	Fragmentas	Pradmuo ir jo seka		Restrikcijos endonukleazė
<i>Gad m 1</i>	# 1	Tiesioginis	5'- <u>GGATCCGCATTT</u> GCAGGTATTCTG	BamHI
		Atvirkštinis	5'- <u>CTCGAGTTAGGT</u> TTCTGCATCGGT	XhoI
	# 2	Tiesioginis	5'- <u>GGATCCGAAGCA</u> GCAGAAAGCTTTAG	BamHI
		Atvirkštinis	5'- <u>CTCGAGTTAGGC</u> TTTAACCAGAACTG	XhoI
<i>Cyp c 1</i>	# 3	Tiesioginis	5'- <u>GGATCCATGGCA</u> TTCGCTGG	BamHI
		Atvirkštinis	5'- <u>CTCGAGTTAGAA</u> GTTCTGCAGGA	XhoI
	# 4	Tiesioginis	5'- <u>GGATCCAAGAGC</u> TTCTTCGC	BamHI
		Atvirkštinis	5'- <u>CTCGAGTTACTC</u> ATCAACTCCAATCT	XhoI

2.2. Metodai

2.2.1. Rekombinantinių alergenų kūrimas

2.2.1.1. Informacinės RNR išskyrimas iš paprastojo karpio raumens ir kopijinės DNR sintezė

Paprastasis karpis (lot. *Cyprinus carpio*) buvo įsigytas iš „Šilavoto karpinių žuvų veislyno“ (Prienuj rajonas). Gyvūnas buvo paaukotas pagal Europos Parlamento ir Europos Sąjungos Tarybo priimtą direktyvą 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos, susijusį su

gyvūnų gerove ir gyvūnų apsauga eksperimentuose ir kituose moksliniuose tyrimuose. Informacinė RNR (iRNR) buvo išskirta iš karpio raumens naudojant „Quick-RNA Miniprep Kit“ (Zymo Research) rinkinį, pagal gamintojo rekomendacijas ir saugoma $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

Kopijinė DNR (kDNR) nuo iRNR buvo paruošta naudojant „RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Thermo Fisher Scientific) rinkinį, pagal gamintojo rekomendacijas ir saugoma $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

RNR ir DNR koncentracijos buvo išmatuotos naudojant spektrofotometrą „Nanodrop“ (Thermo Fisher Scientific, JAV).

2.2.1.2. Polimerazės grandininė reakcija

Polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu buvo pagausintos paprastojo karpio β -parvalbuminą ir β -enolazę koduojančios genų sekos. Taip pat pagausintos į raiškos vektorius įterptos alergenus arba jų fragmentus koduojančios genų sekos ir vykdoma teigiamų klonų atranka. Reakcija (25 μL) buvo vykdoma naudojant „2x Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix“ (Thermo Fisher Scientific) arba „2x DreamTaq PCR Master Mix“ (Thermo Fisher Scientific), 0,5 $\mu\text{mol/L}$ galutinės koncentracijos tiesioginių ir atvirkštinių pradmenų ir įnešama arba 2 μL kDNR, arba vektoriaus su įterptais genais, arba nedidelį kiekį transformuotų bakterijų. Reakcija atliekama DNR amplifikatoriuje (Applied Biosystems, JAV) pagal tam tikrą temperatūrų režimą: $95\text{ }^{\circ}\text{C} - 7\text{ min}$; 35 ciklai ($95\text{ }^{\circ}\text{C} - 30\text{ s}$; $50\text{ }^{\circ}\text{C} - 30\text{ s}$; $72\text{ }^{\circ}\text{C} - 30\text{ s}$) ir $72\text{ }^{\circ}\text{C} - 10\text{ min}$.

2.2.1.3. DNR elektroforezė

PGR produktai, restrikcijos endonukleazėmis hidrolizuoti DNR fragmentai arba vektoriai, buvo analizuojami 1–2 % agarozės gelyje. Agarozė (Thermo Fisher Scientific) buvo tirpinama 1 x TAE buferiniame tirpale (Thermo Fisher Scientific) kaitinant. Gelio tirpalui atvėsus iki $50\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$, jis buvo supiltas į paruoštą specialų gelio lovelį, su įstatytomis pasirinkto dydžio specialiomis šukutės šulinėlių formavimuisi. Sustingus geliui, jis buvo įdėtas į 1 x TAE buferiniu tirpalu užpildytą elektroforezės aparatą ir į gelio šulinėlius suleisti analizuojami DNR mėginiai ir DNR fragmentų ilgio standartas (Thermo Fisher Scientific). Elektroforezė buvo vykdoma esant 10 V/cm įtampai 30–60 min. Po to gelis 5–10 min inkubuotas etidžio bromido tirpale ir analizuotas ultravioleto šviesoje naudojant transiliumatorių „MiniBIS Pro“ (DNR Bio-Imaging Systems Ltd, Izraelis).

2.2.1.4. DNR gryninimas iš agarozės gelio

DNR buvo gryninama iš agarozės gelio naudojant „GeneJET™ Gel Extraction Kit“ (Thermo Fisher Scientific) rinkinį, pagal gamintojo rekomendacijas. Išgryninti DNR mėginiai saugomi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. DNR koncentracijos buvo išmatuotos naudojant spektrofotometrą „Nanodrop“ (Thermo Fisher Scientific).

2.2.1.5. Vektorių hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis

pET28-MBP-TEV vektorius, sukonstruotas pET28-MBP-TEV-Cyp c 2 vektorius, alergenų koduojančios DNR sekos iš pMA-RQ vektoriaus ir iš pJET1.2/blunt vektoriaus buvo hidrolizuotos „FastDigest“ restrikcijos endonukleazėmis (RE) (Thermo Fisher Scientific), pagal gamintojo rekomendacijas. Hidrolizuoti 1–5 μg vektoriaus buvo naudojama 1–5 μL vienos RE, o supilstytas mišinys buvo inkubuojama 15 min $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ir po to 5 min $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Gauti reakcijos produktai analizuoti DNR elektroforezės metodu, o pasirinkti DNR fragmentai buvo išskirti iš agarozės gelio ir naudojami klonavimo darbams.

2.2.1.6. DNR fragmentų klonavimas į vektorius

Atlikus PGR ir DNR elektroforezę, išgryninti DNR produktai arba RE hidrolizuoti DNR fragmentai buvo įterpti į pJET1.2/blunt vektorius naudojant „CloneJET PCR Cloning Kit“ (Thermo Fisher Scientific) rinkinį, arba įterpti į RE hidrolizuotą pET28-MBP-TEV arba įkirptą pET28-MBP-TEV-Cyp c 2 vektorius naudojant „Rapid DNA ligation Kit“ (Thermo Fisher Scientific), pagal gamintojo rekomendacijas. Paruošti reakcijos mišiniai naudoti bakterijų transformacijai.

2.2.1.7. Bakterijų transformacija CaCl_2 metodu

Pirmiausiai buvo pasiruošiamos *E. coli* DH10B, BL21 (DE3), BL21 (DE3) Star, Tuner (DE3) kamienų kompetentinės ląstelės. Į 5 mL sterilios skystos LB terpės buvo užsėjama pasirinkto kamieno bakterijų kolonija ir per naktį auginama $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje purtant (220 rpm). Ryte (praėjus 14–16 h) į naują sterilų 5 mL mėgintuvėlį su skysta LB terpe buvo perkeliama 50 μL naktinės bakterijų kultūros ir toliau auginama 2–2,5 h $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje purtant. Tada centrifuguojama 3 min esant $300 \times g$ greičiui $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Toliau darbai su ląstelėmis buvo atliekami lede. Supernatantas nupilamas ir

ląstelės praplaunamos su 3 mL atšaldytu bakterijų transformacijos NaCl buferiniu tirpalu, švelniai suspenduojamos ir vėl centrifuguojamos. Nupilus tirpalą, ląstelės buvo švelniai sumaišomos su 3 mL atšaldyto bakterijų transformacijos CaCl₂ buferiniu tirpalu ir 30 min inkubuojamos lede. Toliau centrifuguojama, supernatantas nupilamas, ląstelės suspenduojamos likusiame tirpalo laše ir taip paruošiamos transformacijai.

Bakterijų transformacijos metu, į sterilų 1,5 mL mėgintuvėlį buvo įpilama 50 µL paruoštų kompetentinių ląstelių ir 5 µL ligavimo mišinio arba 1 µg išgrynintos plazmidės, švelniai sumaišoma ir 30 min inkubuojama lede. Po to mišinys 2 min buvo inkubuojamas 42 °C temperatūroje ir 1,5 min atšaldomas lede. Užpilama 1 ml skystos LB terpės ir 40–60 min inkubuojama 37 °C temperatūroje. Tuomet mėginys buvo centrifuguojamas 5 min esant 300 x g greičiui, supernatantas nupilamas, ląstelės švelniai suspenduojamos likusiame terpės laše ir išsėjamos ant agarizuotos LB terpės su antibiotiku (100 µg/mL ampicilinu, jeigu DNR fragmentai buvo įterpti į pJET1.2/blunt vektorių, arba 30 µg/mL kanamicinu, jeigu į pET28-MBP-TEV ir pET28-MBP-TEV-Cyp c 2 vektorius). Lėkštelės inkubuojamos per naktį 37 °C, o ryte buvo išimamos ir laikomos 4 °C temperatūroje. Užaugusios transformuotų ląstelių kolonijos buvo tikrinamos PGR metodu ir persėjamos į naują lėkštelę, kur per naktį laikomos 37 °C, o vėliau, jei transformacija pavyko, saugomos 4 °C temperatūroje.

2.2.1.8. Plazmidinės DNR gryninimas

Plazmidinė DNR iš *E. coli* bakterijų buvo gryninama naudojant „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ rinkinį (Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo rekomendacijas. Į 5 mL sterilios skystos LB terpės, kurioje buvo pridėta antibiotiko (100 µg/mL ampicilino arba 30 µg/mL kanamicino), užsėjama pasirinkta bakterijų kolonija ir 14–16 h auginama 37 °C temperatūroje purtant. Po to centrifuguojama 3 min esant 300 x g greičiui, supernatantas nupiltas ir toliau viskas atliekama kaip rekomenduoja gamintojas. Išskirta plazmidinė DNR saugomos –20 °C temperatūroje. DNR koncentracijos buvo išmatuotos naudojant spektrofotometrą „Nanodrop“ (Thermo Fisher Scientific).

2.2.1.9. Rekombinantinių baltymų sintezė *E. coli* bakterijose

E. coli BL21 (DE3), BL21 (DE3) Star ir Tuner (DE3) kamienų bakterijos buvo transformuotos sukonstruotais vektoriais: į hidrolizuotą pET28-MBP-TEV vektorių buvo įklonuotos alergenų ir jų fragmentus koduojančios DNR

sekos; į pET28-MBP-TEV-Cyp c 2 vektorių įklonuotos DNR sekos, skirtos β-enolazės fragmentų kūrimui (2.3 lentelė).

Į 5 mL sterilios skystos LB terpės buvo užsėjama transformuotų bakterijų kolonija, kuri 14–16 h auginama 37 °C temperatūroje purtant. Tuomet į naują sterilų 5 mL mėgintuvėlį su skysta LB terpe buvo įpilama naktinės bakterijų kultūros (skiedžiama 50 kartų), kuri auginama 2–2,5 h 37 °C temperatūroje purtant, kol pasiekiamas reikiamas optinis tankis (OT) ($A_{600} = 0,8–0,9$). Baltymų sintezės indukcija buvo vykdoma į bakterijų kultūrą įnešant 0,1 mmol/L IPTG ir toliau auginant ląsteles 4 h 25 °C (Tuner (DE3) kamieno bakterijas) arba 3 h 37 °C temperatūroje (BL21 (DE3) ir BL21 (DE3) Star kamieno bakterijas). Prieš ir po indukcijos buvo renkami 0,5 mL mėginiai, kurie centrifuguojami 5 min esant 300 x g greičiui, supernatantas nupilamas ir saugomi –20 °C temperatūroje.

Auginant biomasę baltymų gryninimui (100–300 mL), viskas atliekama kaip parašyta aukščiau, tik po indukcijos ir tolimesnio auginimo, ląstelės buvo surenkamos ir centrifuguojamos 15 min esant 4000 x g greičiui 4 °C temperatūroje. Supernatantas nupilamas ir ląstelės praplaunamos su biomasės praplovimo buferiniu tirpalu ir dar kartą centrifuguojamos 15 min esant 3000 x g greičiu 4 °C temperatūroje. Supernatantas buvo nupilamas ir biomasė saugoma –20 °C temperatūroje.

2.2.1.10. Bakterijų ardymas ultragarsiniu dezintegratoriumi

Rekombinantinius alergenų sintetinančių bakterijų biomasė buvo ardoma su ultragarsiniu dezintegratoriumi (Bandelin Sonoplus, Vokietija). 1 g biomasės buvo švelniai suspenduojama 5 mL atšaldytame biomasės ardymo buferiniame tirpale (darbai atliekami lede), pridodant 1 mmol/L PMSF proteazių inhibitoriaus, 5 μl „Antifoam 204“ reagento nuo putojimo, ir mechaniškai suardoma ultragarsu (programos ciklas: 15 s ardymas, 15 s pauzė, 4 min). Po ardymo ląstelių suspensija buvo centrifuguojama 30 min esant 15000 x g greičiui 4 °C temperatūroje. Supernatantas surenkamas (tirpūs baltymai), sumaišomas santykiu (1:6) su biomasės ardymo buferiniu tirpalu ir filtruojamas per 0,45 μm hidrofilinį polivinilideno fluorida (PVDF) filtrą ir toliau naudojamas baltymų gryninimui.

2.2.1.11. Rekombinantinių baltymų gryninimas

Rekombinantiniai baltymai buvo gryninami afininės chromatografijos metodu su „AKTA purifier 100“ (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Švedija) chromatografijos sistema. Nufiltruotas ir darbui paruoštas suardytų bakterijų

ląstelių tirpus supernatantas buvo užnešamas ant 1 mL „MBPTrap™ HP“ kolonėles, užpildytos „Dextrin Sapharose™ High Performance“ sorbentu (Cytiva), kuri prieš tai buvo praplauta su 10 mL užnešimo buferiniu tirpalu. Pro kolonėlę pratekėjęs supernatantas buvo surenkamas į atskirą naują mėgintuvėlį, o kolonėlė dar kartą praplaunama su 10 mL užnešimo buferiniu tirpalu. Eliucijos metu į kolonėlę buvo užnešama 5 mL eliucijos buferinio tirpalo ir į atskirus naujus mėgintuvėlius renkamos eliuotų baltymų frakcijos (po 500 µL). Po to kolonėlė buvo regeneruojama ją praplaunama su 10 mL užnešimo buferiniu tirpalu ir gali būti naudojama arba kito baltymo grynimui, arba praplaunama su distiliuotu vandeniu, užpildoma 20 % etanolio tirpalu ir saugoma 4 °C temperatūroje.

Frakcijos, kuriose buvo didžiausias kiekis išgryninto baltymo buvo apjungtos. Baltymo koncentracija išmatuota naudojant spektrofotometrą „Nanodrop“ (Thermo Fisher Scientific) ir mėginys saugomas 4 °C temperatūroje.

2.2.2. Monokloninių antikūnų kūrimas

2.2.2.1. Pelių imunizacija

MAk kūrimui buvo naudotos BALB/c linijos pelės (6–8 savaičių amžiaus patelės), kurioms į nugaros podį buvo suleidžiamas antigeno tirpalas, t. y. vykdoma imunizacija. Kiekvienu antigenu buvo imunizuojama po tris peles. Iš viso buvo vykdomos trys imunizacijos, kas 28 dienas. Pirmos imunizacijos metu pelėms buvo suleidžiama po 50 µg antigeno, ištirpinto PBS ir sumašyto santykiu 1:1 su pilnu Freund'o adjuvantu (Thermo Fisher Scientific). Antros imunizacijos metu toms pačioms pelėms po odą vėl buvo suleidžiama 50 µg antigeno, ištirpinto PBS ir sumašyto santykiu 1:1 su nepilnu Freund'o adjuvantu (Thermo Fisher Scientific). Trečios imunizacijos metu pelėms buvo suleidžiama po 50 µg antigeno, ištirpinto PBS.

2.2.2.2. Pelių atranka hibridinių ląstelių gavimui

Prieš kiekvieną imunizaciją ir po jos buvo surenkami pelių kraujo mėginiai, kurie vėliau buvo analizuojami netiesioginės imunofermentinės analizės (IFA) metodu. Metodo pagalba buvo nustatoma, kurioje pelėje susidarė didžiausias antigenui specifinių antikūnų titras. Titras tai yra nustatytas kraujo mėginio skiedimas, kuriam esant optinio tankio reikšmė lygi 1. Likus trims dienoms iki hibridizacijos, pasirinktai pelei buvo suleidžiama

50 µg antigeno, ištirpinto PBS, siekiant sustiprinti imuninį atsaką prieš antigeną.

2.2.2.3. Makrofagų surinkimas ir kultivavimas

Makrofagai buvo surenkami iš pelės pilvo ertmės, į kurią suleidus 2–3 mL terpės be serumo, ląstelės buvo suspenduojamos ir surenkamos į sterilų mėgintuvėlį. Tokiu būdu pelės pilvo ertmė buvo iš viso praplaunama su 10 mL terpės. Surinkti makrofagai centrifuguojami 5 min esant 200 x g greičiui, suskaičiuojami ir išsėjami į pasirinkto dydžio sterilius ląstelių augimo indus (ląstelių tankis nuo 1000 ląst./cm²). Makrofagai reikalingi kultivuoti pelės Sp2/0 mielomos ir hibridinėms ląstelėms.

2.2.2.4. Mielomos ląstelių kultivavimas

Pelės Sp2/0 mielomos ląstelės buvo atgaivinamos (kaip aprašyta 2.2.2.9 skyriuje) prieš hibridizaciją ir kultivuojamos ląstelių augimo terpėje su 9 % FBS 75 cm² ląstelių auginimo induose, kuriuose buvo išsėti makrofagai (100 000 ląst./indui).

2.2.2.5. Ląstelių skaičiavimas

10 µL ląstelių suspensijos buvo sumaišoma su 10 µL tripano mėlio tirpalu (Thermo Fisher Scientific), kuris nudažo tik tas ląsteles, kurių membrana yra pažeista (žuvusias), ir 10 µL mėginio supilama ant specialios „Bürker“ kameros po dengiamuoju stikliuku. Analizuojama šviesiniu mikroskopu ir skaičiuojama nudažytų ląstelių skaičius pasirinktuose kameros langeliuose. Ląstelių skaičius apskaičiuojamas pagal formulę:

$$n = a * 2 * b * 10^4$$

n – apskaičiuotas bendras ląstelių skaičius; a – ląstelių skaičius, apskaičiuotas kameros langelyje; b – ląstelių tūris mL, iš kurio buvo paimtos skaičiuoti ląstelės.

2.2.2.6. Hibridizacija

Pirmiausiai Sp2/0 mielomos ląstelės buvo suspenduojamos ląstelių augimo terpėje, surenkamos į mėgintuvėlius ir centrifuguojamos 5 min esant 200 x g greičiui. Terpė surenkama į atskirą butelį, ląstelės suspenduojamos 25 mL augimo terpės be serumo ir suskaičiuojamos. Tuomet iš hibridizacijai pasirinktos pelės, kuri buvo ketvirtą kartą imunizuota, buvo išimama blužnis,

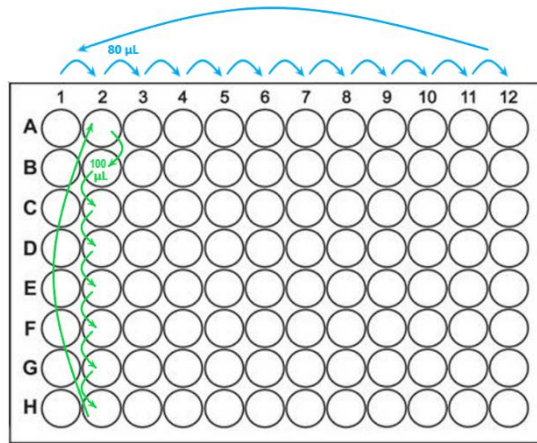
kuri su plokščiu pincetu terpėje be serumo buvo sutraiškoma. Gauta ląstelių suspensija centrifuguojama 7 min esant 200 x g greičiui. Terpė nupilama, blužnies ląstelės suspenduojamos 10 mL augimo terpės be serumo ir suskaičiuojamos. Tada pelės blužnies ląstelės buvo sumaišomos su mielomos ląstelėmis santykiu 1:4,5 (mielomos ląstelės:blužnies ląstelės) ir centrifuguojamos 5 min esant 200 x g greičiui. Supernatantas nupilamas ir švelniai purtant ląsteles, per 1 min ant jų sulašinamas 1 mL ląstelių suliejimo agento PEG–1500. Lėtai sukant mėgintuvėlį ląstelės 2 min buvo inkubuojamos, o per kitas 2 min jos praskiedžiamos lėtai sulašinant 10 mL terpės be serumo. Po to terpės pripilama iki galutinio 50 ml tūrio ir centrifuguojama 5 min esant 200 x g greičiui. Supernatantas nupilamas, ląstelės suspenduojamos ląstelių augimo terpė su serumu (15 % FBS), pridedama HAT reagento (skiedžiamas 50 kartų), ir viskas yra išpilstoma į sterilias 96 šulinėlių plokšteles su jau tenais išsėtais makrofagais (1000 ląst./šulinėlių), po 30–40 tūkst. ląstelių į šulinėlį. Ląstelės kultivuojamos 37 °C temperatūroje, atmosferoje esant 5 % CO₂, kol susiformuoja ląstelių kolonijos. Po hibridizacijos praėjus 7 dienom ir po to dar 3 dienom, buvo keičiama ląstelių augimo terpė su 15 % FBS ir pridedant hipoksantino ir timidino reagento (HT) (skiesdžiama 50 kartų).

2.2.2.7. Hibridinių ląstelių atranka, klonavimas ir kultivavimas

Praėjus 12 dienų po hibridizacijos, netiesioginės IFA metodu buvo vykdoma hibridinių ląstelių atranka, naudojant antigeną, su kuriuo buvo vykdoma pelių imunizacija. Hibridomų klonai, kurių augimo terpės stipriai sąveikavo su antigenu (OT < 1,5), buvo perkelti į naują 96 šulinėlių plokštelę, kad į vieną šulinėlį būtų perkelta po 1 kloną, ir klonuojami serijinių skiedimų metodu. Išklonuoti klonai buvo toliau auginami 7–10 dienų, kol vėl perklonuojami serijinių skiedimų metu.

Serijinio skiedimo metu buvo siekiama gauti hibridines ląsteles, kilusias iš vienos ląstelės. Klonavimai buvo atliekami specialiose 96 šulinėlių plokštelėse. Su vienkanaliu automatiniu dozatoriumi 100 µL klonuojamų ląstelių suspencijos buvo perkelti į B2 šulinėlį ir kelis kartus suspenduojama. Tuomet 100 µL terpės su ląstelėmis iš B2 perkeliama į C2 šulinėlį ir suspenduojama, taip ląstelės praskiedžiamos du kartus. Po to, iš C2 šulinėlio ląstelės perkeliama į D2 ir taip toliau į kitus stulpelio šulinėlius, o perteklinės ląstelės sugražinamos į B2 šulinėlį. Tada su aštuonkanaliu automatiniu dozatoriumi 80 µL terpės su ląstelėmis iš antrojo stulpelio buvo perkeliama į trečiąjį ir švelniai suspenduojamos kelis kartus. Toks ląstelių

skiedimas kartojamas per visus plokštelės stulpelius, o perteklinės ląstelės sugražinamos į antrąjį stulpelį (2.1 pav.).



2.1 pav. Serijinio skiedimo schema. Pirmiausiai hibridinės ląstelės klonuojamos išilgai 96 šulinėlių plokštelės stulpeliu (žalia spalva) pradedant nuo B2 šulinėlio (perkeliama po 100 µL terpės su ląstelėmis), o po to išilgai plokštele (žydra spalva) nuo 2 stulpelio (perkeliama po 80 µL terpės su ląstelėmis).

Po klonų perkėlimo praėjus 5–7 dienoms, hibridomų klonai buvo tikrinami netiesioginės IFA metodu su jiems specifisku antigenu. Klonai, kurie sąveikavo tik su antigenu buvo perkeliami į 24 šulinėlių plokšteles, kur ląstelės buvo padauginamos ir toliau kultivuojamos, bei renkama augimo terpė su antikūnais. Vėliau ląstelės buvo perkeliamos auginti į 25 cm², o po to į 75 cm² ląstelių auginimo indus, taip siekiant greičiau surinkti didesnę terpės kiekį antikūnų gryninimui. Surinkus reikiamą hibridomų terpės kiekį hibridinės ląstelės buvo užšaldomos ilgesniam saugojimui. Hibridinės ląstelės buvo klonuojamos ir kultivuojamos pasirinkto dydžio steriliuose ląstelių augimo induose, kuriuose prieš tai jau buvo išsėti makrofagai.

2.2.2.8. Ląstelių šaldymas ir saugojimas

Iš ląstelių augimo indų buvo surenkama ląstelių suspensija (keletą mikrolitų buvo atsipilta į atskirą mėgintuvėlį ląstelių skaičiavimui), buvo centrifuguojama 5 min esant 200 x g greičiui. Ląstelių augimo terpė nupilama, ląstelės suspenduojamos 700 µL šaltoje šaldymo terpėje ir išpilstomos į ląstelių šaldymo ampules (~ 1,5–2 mln. ląstelių/ampulėje). Ampulės dedamos į specialias dėžutes, parą buvo laikomos –70 °C šaldiklyje ir tada perkeliamos į skystą azotą ilgalaikiam saugojimui.

2.2.2.9. Ląstelių atšildymas

Užšaldytos ląstelės buvo atšildomos jas skiedžiant 10 mL augimo terpėje be serumo. Į užšalusią ampulę įpilama 1 mL terpės, kelis kartus suspenduojama ir ląstelės surenkamos į atskirą sterilų mėgintuvėlį. Procesas kartojamas tol, kol iš ampulės surenkamos visos ląstelės. Tuomet ląstelės centrifuguojama 5 min esant 200 x g greičiui. Supernatantas nupilamas, ląstelės suspenduojamos 1 mL augimo terpėje su serumu (9 % arba 15 % FBS), suskaičiuojamos ir išsėjamos į pasirinktus ląstelių augimo indus, kuriuose prieš tai jau buvo išsėti makrofagai.

2.2.3. Polikloninių antikūnų surinkimas

Surinkus makrofagus ir išėmus blužnį iš imunizuotos pelės buvo renkami polikloniniai antikūnai (PAK). Šie antikūnai buvo surinkti iš pelės krūtinės ląstos ertmės, į kurią suleidžiama 2 mL PBS tirpalo, suspenduojama keletą kartų ir viskas surenkama į mėgintuvėlį, kuris buvo centrifuguojamas 10 min esant 200 x g greičiui. Supernatantas buvo perkeliamas į 10 ml talpos mėgintuvėlį, kur sumaišomas santykiu 1:1 su 45 % amonio sulfato tirpalu ir inkubuojamas per naktį 4 °C temperatūroje. Tokiu būdu iš supernatanto išsodinami PAK. Kitą dieną mišinys centrifuguojama 5 min esant 200 x g greičiui, supernatantas nupilamas, nuosėdos tirpinamos PBS ir po to sumaišoma su 45 % amonio sulfato tirpalo santykiu 1:1. Paruošti PAK saugomi 4 °C temperatūroje.

2.2.4. Antikūnų gryninimas iš hibridomų augimo terpės

Sukurti MAk buvo gryninami iš surinktos hibridomų augimo terpės afininės chromatografijos būdu. Gryninimas atliktas su „AKTA purifier 100“ (GE Healthcare Bio-Sciences AB) chromatografijos sistema, naudojant 1 mL kolonėlę, užpildytą sefaroze su baltymu A (Cytiva). Surinkta hibridomų augimo terpė buvo centrifuguojama 10 min esant 1000 x g greičiui, tada sumaišoma su užnešimo ir praplovimo buferiniu tirpalu santykiu 1:2 (terpė:užnešimo ir praplovimo buferinis tirpalas) ir paruoštas tirpalas filtruotas naudojant 0,45 µm PVDF filtrą. Prieš gryninimą atpilama 50 µl praskiestos terpės, kuri bus tikrinama IFA metodu. Jei gryninami IgG1 poklasio antikūnai, tuomet darbui naudojamas I užnešimo ir praplovimo buferiniu tirpalas, o jei IgG2a arba IgG2b, tada II užnešimo ir praplovimo buferiniu tirpalas. Paruoštas terpės tirpalas užnešamas ant kolonėlės, kuri prieš

tai buvo sukalibruota ją praplaunant su 10 mL užnešimo ir praplovimo buferiniu tirpalu. Pro kolonėlę pratekėjęs tirpalas buvo surenkamas į švarų mėgintuvėlį, o pati kolonėlė praplaunama su 10 mL užnešimo ir praplovimo buferiniu tirpalu. Eliucijos metu ant kolonėlės buvo užnešama 10 mL eliucijos buferinio tirpalo ir renkamos gryninimo frakcijos (po 500 μ L). Į surinktus mėginius pridedama po 10 μ L 0,1 mol/L Tris-HCl tirpalo (pH 8), viskas išmaišoma ir su spektrofotometru „NanoDrop“ (Thermo Fisher Scientific) išmatuojamos baltymų koncentracijos. Tos gryninimo frakcijos, kuriose nustatyta didžiausia baltymų koncentracija, buvo apjungtos ir dializuotos prieš PBS tirpalą (100 μ L mėginio reikia 100 mL PBS) per naktį 4 °C temperatūroje. Ryte buvo surenkami mėginiai, išmatuojamos antikūnų koncentracijos su spektrofotometru „NanoDrop“ (Thermo Fisher Scientific), filtruojami naudojant 0,45 μ m PVDF filtrą ir saugomi 4 °C temperatūroje. Tuo tarpu kolonėlė po eliucijos buvo praplaunama su 10 mL užnešimo ir praplovimo buferiniu tirpalu, tada su distiliuotu vandeniu ir užpildoma 20 % etanolio tirpalu, saugoma 4 °C temperatūroje.

2.2.5. Antikūnų žymėjimas krienų peroksidaze

Išgryninti MAk (1 mg) dializuojami prieš natrio karbonatinį buferinį tirpalą (pH 9,5) per naktį 4 °C temperatūroje. Ryte 1 mg krienų peroksidazės (HRP) buvo ištirpinama 0,2 mL distiliuoto vandens, sumaišoma su 50 μ L 0,2 mol/L NaIO₄ tirpalu ir 20 min inkubuojama kambario temperatūroje (RT), maišant tamsoje. Po to aktyvuotas peroksidazės tirpalas buvo nudruskinamas per Sephadex G-25 kolonėlę (Cytiva), kuri prieš tai buvo praplauta 1 mmol/L natrio acetatinu buferiniu tirpalu. Nudruskinta peroksidazė buvo sumaišoma su antikūnų tirpalu ir pridedama 1/10 tūrio 0,2 mol/L natrio karbonato buferinio tirpalo, kad tirpalo pH būtų apie 9,5. Viskas gerai išmaišoma ir 2 h inkubuojama RT ant purtyklės. Tada į tirpalą pridedama NaBH₄ (iki galutinės koncentracijos 0,4 mg/mL) ir toliau inkubuojamas 2 h 4° C temperatūroje, ant purtyklės tamsoje. Vėliau peroksidazės ir antikūno tirpalas buvo dializuojamas prieš PBS tirpalą per naktį 4° C temperatūroje. Ryte mėginys buvo surenkamas ir pridedama BSA (iki galutinės koncentracijos 2 %) ir glicerolio (iki galutinės koncentracijos 50 %), viskas gerai išmaišoma ir saugojama –20 °C temperatūroje.

2.2.6. Metodai, skirti rekombinantinių alergenų ir antikūnų tyrimams

2.2.6.1. Netiesioginė imunofermeninė analizė

Imobilizacijos buferiniame tirpale (IMBT) ištirpintu antigenu, t. y. natūraliu arba rekombinantiniu baltymu (galutinė koncentracija 5 µg/mL) arba alergenų ekstraktu (galutinė koncentracija 10 µg/mL), buvo padengiama 96 šulinėlių plokštelė (50 µL tirpalo į šulinėlį (µL/šul.)) ir per naktį inkubuojama 4 °C temperatūroje. Ryte plokštelė išpurtoma, blokuojama su blokavimo buferiniu tirpalu 1 x „Roti®-Block“ tirpalu (skiestu su distiliuotu vandeniu) (po 200 µL/šul.) ir inkubuojama 1 h RT ant purtyklės. Plokštelė išpurtoma, du kartus plaunama su distiliuotu vandeniu ir inkubuojama 1 h RT ant purtyklės arba su pelių kraujo mėginiais, skiestais su PBS-T tirpalu santykiu 1:200–1:145800, arba su neskiesta hibridomų augimo terpe, arba su išgrynintais MAk (galutinė koncentracija 5 µg/ml, ištirpintais PBS-T) (50 µL/šul.). Po to plokštelė išpurtoma, plaunama penkis kartus su PBS-T tirpalu, skiestu santykiu 1:1 su distiliuotu vandeniu, ir du kartus su distiliuotu vandeniu. Tada pilama po 50 µL/šul. ožkos antikūnų prieš pelės IgG, konjuguotų su HRP „Goat Anti-Mouse IgG (H + L)-HRP“ (Biorad), 5000 kartų skiestų su PBS-T tirpalu, ir inkubuojama 1 h RT ant purtyklės. Išpurčius plokštelę ir ją praplovus penkis kartus su skiestu PBS-T tirpalu ir du kartus su distiliuotu vandeniu, įpilama po 50 µL/šul. 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidinas (TMB) substrato ir 10–15 min inkubuojama tamsoje. Fermentinė reakcija sustabdoma įpylus 25 µL/šul. 3,6 % H₂SO₄ tirpalo. Su spektrofotometru „Multiskan GO“ (Thermo Fisher Scientific, JAV) buvo išmatuojamas optinis tankis (OT) esant 450 nm ir palyginamajam 620 nm bangos ilgiams, o rezultatai analizuojami naudojant „ScanIt“ (Thermo Fisher Scientific, JAV) ir „Origin Pro 8.0“ (OriginLab) kompiuterines programas.

Norėdami įvertinti, ar su rekombinantiniai alergenai sąveikauja žuviai alergiškų pacientų serumuose esantys IgE, 96 šulinėlių plokštelė buvo inkubuojama per naktį 4 °C temperatūroje su rekombinantiniai baltymais (50 µL/šul.), ištirpintais IMBT (galutinė koncentracija 5 µg/mL). Po blokavimo plokštelės buvo išpurtoma, praplaunama su distiliuotu vandeniu ir inkubuojama su žmogaus serumo mėginiais, kuriems buvo patvirtinta alergija žuviai (PlasmaLab International, JAV). Mėginiai buvo skiedžiami santykiu 1:10–1:90 su RotiBlock-T (1 x „Roti®-Block“ su 0,1 % Tween-20) tirpalu, išpilstomi į plokštelės šulinėlius (50 µL/šul.) ir viskas 2 h purtoma ant purtyklės RT. Po to plokštelė buvo išpurtoma ir praplaunama su skiestu PBS-T tirpalu ir tada su distiliuotu vandeniu. Į plokštelės šulinėlius buvo pilama po 50 µL/šul. pelės antikūnų prieš žmogaus IgE Fc, konjuguotų su HRP

(SouthernBiotech), 1000 kartų skiestų su RotiBlock-T tirpalu, ir toliau inkubuojama 1 h RT ant purtyklės. Plokštelės plovimas ir fermentinė reakcija buvo atlikta kaip aprašyta aukščiau.

Norėdami iširti kalcio ir magnio jonų įtaką MAk prisijungimui prie parvalbuminų, 96 šulinėlių plokštelė buvo padengiama (50 μ L/šul.) rekombinantiniais baltymais (galutinė koncentracija 5 μ g/mL), ištirpintais IMBT arba Ca^{2+} -IMBT (turinčio kalcio ir magnio jonų), ir per naktį inkubuojama 4 °C temperatūroje. Po blokavimo plokštelės buvo išpurtoma, praplaunama su distiliuotu vandeniu ir inkubuojama 1 h RT ant purtyklės su PBS-T skiestais išgrynintais MAk (galutinė koncentracija 5 μ g/mL). Inkubacija su ožkos antikūnais prieš pelės IgG, konjuguotais su HRP, ir fermentinė reakcija buvo atliktos kaip aprašyta aukščiau.

2.2.6.2. Antikūnų poklasio ir tariamosios giminingumo konstantos (K_d) nustatymas

MAk klasės ir poklasiai buvo nustatyti netiesioginės IFA metodu, naudojant komercinį rinkinį „BD Mouse Immunoglobulin Isotyping ELISA Kit“ (BD Biosciences) pagal gamintojo rekomendacijas.

MAk tariamoji giminingumo konstanta (K_d) irgi buvo nustatoma netiesioginės IFA metodu. 96 šulinėlių plokštelė buvo inkubuojama per naktį 4 °C temperatūroje su natūraliu arba rekombinantiniu baltymu (50 μ L/šul.), ištirpintu IMBT (galutinė koncentracija 5 μ g/mL). Po blokavimo plokštelės buvo išpurtoma, praplaunama su distiliuotu vandeniu ir į šulinėlius pridedama po 150 μ L išgrynintų MAk, skiestų su PBS-T tirpalu, kurie buvo titruojami išilgai plokštelės eilute (nuo $3,3 \times 10^{-8}$ mol/L iki $1,863 \times 10^{-13}$ mol/L koncentracijos) ir inkubuojama 1 h RT ant purtyklės. Inkubacija su ožkos antikūnais prieš pelės IgG, konjuguotais su HRP, ir fermentinė reakcija buvo atliktos kaip aprašyta 2.2.6.1. skyriuje.

2.2.6.3. Tiesioginė imunofermentinė analizė

Siekdami įvertinti, ar krienų peroksidaze žymėti MAk sąveikauja su antigenais, atlikome tiesioginę IFA. IMBT ištirpintu natūraliu arba rekombinantiniu baltymu (galutinė koncentracija 5 μ g/mL) yra padengiama 96 šulinėlių plokštelės šulinėliai (50 μ L/šul.) ir inkubuojama per naktį 4 °C temperatūroje. Po blokavimo plokštelės buvo išpurtoma, praplaunama su distiliuotu vandeniu ir į šulinėlius pridedama HRP žymėto MAk, skiesto su PBS-T tirpalu santykiu 1:100–1:12800, ir inkubuojama 1 h RT ant purtyklės.

Plokštelės plovimas ir fermentinė reakcija buvo atlikta kaip aprašyta 2.2.6.1. skyriuje.

2.2.6.4. Konkurencinė imunofermentinė analizė

Norėdami nustatyti, ar sukurti MAK tarpusavyje konkuruoja dėl prisijungimo prie antigeno ar atpažįsta skirtingas antigeno sritis, buvo atlikta konkurencinė IFA. 96 šulinėlių plokštelės šulinėliai (50 $\mu\text{L}/\text{šul.}$) buvo padengti IMBT ištirpintu natūraliu arba rekombinantiniu baltymu (galutinė koncentracija 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ir inkubuojama per naktį 4 $^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Atlikus blokavimą ir praplovus plokšteles su distiliuotu vandeniu, į šulinėlius buvo pridėdama po 50 μL neskiestos hibridomų augimo terpės ir inkubuojama 1 h RT ant purtyklės. Po to plokštelė neišpurtoma, ant šulinėliuose esančios terpės pilama po 50 $\mu\text{L}/\text{šul.}$ HRP žymėtų MAK, skiestų su PBS-T tirpalu santykiu, kuris buvo nustatytas tiesioginės IFA metodu, ir toliau inkubuojama 1 h RT ant purtyklės. Plokštelės plovimas ir fermentinė reakcija buvo atlikta kaip aprašyta 2.2.6.1. skyriuje.

2.2.6.5. Dviepitopė imunofermentinė analizė

Nustatyti MAK porai, sudarytai iš dviejų antikūnų, atpažįstančių tą patį antigeną, bet prisijungiančių prie skirtingų jo epitopų, buvo atlikta dviepitopė IFA. PBS buferiniame tirpale ištirpintu išgrynintu MAK₁ (galutinė koncentracija 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) yra padengiama 96 šulinėlių plokštelės šulinėliai (50 $\mu\text{L}/\text{šul.}$) ir inkubuojama per naktį 4 $^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Po blokavimo plokštelė buvo išpurtoma, praplaunama su distiliuotu vandeniu ir į šulinėlius pridėdama po 150 μL rekombinantinio baltymo, skiesto su PBS-T tirpalu, kuris buvo titruojami išilgai plokštelės eilute (nuo 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ iki $6,86 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ koncentracijos) ir inkubuojama 1 h RT ant purtyklės. Tada plokštelė buvo išpurtoma ir praplaunama su skiestu PBS-T tirpalu ir distiliuotu vandeniu. Į plokštelės šulinėlius buvo pilama po 50 $\mu\text{L}/\text{šul.}$ HRP žymėto MAK₂ (HRP-MAK₂), skiesto su PBS-T tirpalu santykiu, kuris buvo nustatytas tiesioginės IFA metodu, ir toliau inkubuojama 1 h RT ant purtyklės. Plokštelės plovimas ir fermentinė reakcija buvo atlikta kaip aprašyta 2.2.6.1 skyriuje.

Pasirinkus MAK porą buvo vykdomas dviepitopės IFA metodo optimizavimas. Metodas atliekamas pagal pateiktą protokolą, tik keičiant įvairius parametrus yra parenkamos optimaliausios sąlygos:

- 1) skirtingos IFA 96 šulinėlių plokštelės, kurios skiriasi savo gebėjimu surišti baltymus: 600–650 ng/cm^2 (Thermo Fisher Scientific) ir 250 ng/cm^2 (Nerbe plus).

- 2) MAk₁ tirpinamas PBS arba IMBT;
- 3) skirtinga galutinė ištirpinto MAk₁ koncentracija plokštelėje (3, 5 arba 8 µg/mL);
- 4) skirtingi blokavimo buferiniai tirpalai (1 x „Roti®-Block“, 2 % BSA (tirpintas PBS), 4 % pieno milteliai (tirpinti PBS));
- 5) skirtingi HRP-MAk₂ skiedimai (nuo 1:50 iki 1:1000).

Atlikus dviepitopės IFA optimizavimą, metodas buvo pritaikytas parvalbuminų nustatymui įvairiuose alergenų ekstraktuose. Plokštelę padengus MAk₁ (galutinė koncentracija 5 µg/mL) ir po to ją užblokavus 1 x „Roti®-Block“ tirpalu, išilgai plokštele buvo titruojamas rekombinantinis baltymas (nuo 8 µg/mL iki $1,35 \times 10^{-4}$ µg/mL koncentracijos), kuriuo remiantis buvo brėžiama kalibracinė kreivė. Kartu su rekombinantiniu baltymu buvo inkubuojami alergenų ekstraktai (50 µL/šul., galutinė koncentracija 15 µg/mL). Plokštelę praplovus, ji buvo inkubuojama su HRP-MAk₂, skiesto su PBS-T tirpalu santykiu 1:80 arba 1:800. Gauti rezultatai analizuoti programomis nurodytomis 2.2.6.1. skyriuje, o sukurtos dviepitopės IFA jautrumas apskaičiuotas remiantis pateikta metodika (Armbruster and Pry, 2008; Shrivastava, 2011). Parvalbuminų kiekiai analizuotuose ekstraktuose apskaičiuoti statistinės analizės programa „Origin Pro 8“ (OriginLab).

2.2.6.6. Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis

Baltymų elektroforezė buvo atlikta poliakrilamidiniame gelyje, sudarytame iš viršutinio 4 % koncentruojamo gelio ir apatinio 12 % skiriamąjo gelio. Pirmiausia buvo paruošiamas apatinis skiriamasis gelis, kuriam sustingus buvo supilamas koncentruojamo gelio tirpalas, įstatomos „šukos“, reikalingos šulinėlių formavimuisi, ir laukiama kol gelis sustings. Tuo buvo paruošti mėginiai: baltymų (1 µg), alergenų ekstraktų (10 µg) arba 10 µL bakterijų lizato, buvo sumaišomi su 5 x „Reducing Sample Buffer“ (Thermo Fisher Scientific) ir kaitinami 10 min 100 °C temperatūroje. Sustingę geliai buvo įstatomi į elektroforezės aparatą, pripilama baltymų elektroforezės buferinio tirpalo ir atsargiai išimamos „šukos“. Į susiformavusius šulinėlius suleidžiami mėginiai ir molekulinės masės standartas (Thermo Fisher Scientific). Baltymų elektroforezė buvo vykdoma 80 V įtampoje, kol baltymai perėjo į koncentruojamą gelį, o vėliau tęsiama esant 110–150 V įtampai. Pasibaigus elektroforezei skiriamasis poliakrilamido gelis buvo atskiriamas nuo koncentruojamo, plaunamas su distiliuotu vandeniu ir dažomas

„PageBlue™ Protein Staining Solution” (Thermo Fisher Scientific) baltymų dažymo tirpalu per naktį RT, o vėliau atplaunamas su distiliuotu vandeniu.

2.2.6.7. Imunoblotas

Po baltymų elektroforezės, skiriamasis poliakrilamidinis gelis buvo atskiriamas nuo koncentruojamo ir įmerkiamas į indą su baltymų pernešimo buferiniu tirpalu. Atsikerpami keli reikiamo dydžio filtrinio popieriaus lakštai ir PVDF membrana, kuri yra suvilgoma metanoliumi, o tada viskas perkeliama į indą su baltymų pernešimo buferiniu tirpalu ir inkubuojama ant purtyklės kelias minutes. Ant imunobloto aparato teigiamo elektrodo buvo dedamas vienas filtrinis popieriaus lakštas, ant jo membrana, tada gelis, o ant jo uždedamas antras filtrinio popieriaus lakštas. Naudojant stiklinę lazdelę buvo išstumiami susidarę oro burbulai. Viskas suslegiama su imunobloto aparato neigiamu elektrodu ir parenkamas elektros srovės stipris ($1 \text{ cm}^2-1 \text{ mA}$). Baltymų pernešimas ant membranas buvo vykdomas 60 min. Po pernašos membrana praplaunama su PBS-T tirpalu ir tada blokuojama su blokavimo tirpalu per naktį $4 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje. Tuo tarpu poliakrilamidinis gelis buvo praplaunamas su distiliuotu vandeniu ir dažomas baltymų dažymo tirpalu per naktį RT, o vėliau atplaunamas distiliuotu vandeniu.

Po blokavimo membrana praplaunama du kartus su PBS-T tirpalu ir inkubuojama arba su hibridomų augimo terpe (skiesta du kartus), arba su išgrynintais MAk (galutinė koncentracija $5 \text{ } \mu\text{g/mL}$), arba su HRP žymėtais MAk (skiestais 500 kartų), arba su PAK (skiestais 1000 kartų) 1 h RT ant purtyklės. Terpės ir antikūnai skiedžiami su blokavimo tirpalu, turinčių 0,1 % Tween-20. Membrana praplaunama 5 kartus su PBS-T ir po to inkubuojama su ožkos antikūnais prieš pelės IgG, konjuguotais su HRP (Biorad), skiestais 4000 kartų su blokavimo tirpalu, turinčių 0,1 % Tween-20, ir inkubuojama 1 h RT ant purtyklės. Membrana praplaunama 5 kartus su PBS-T ir ryškinama su TMB substratu, skirtu imunoblotui „NeA-Blue Precipitating Substrate” (Clinical Science Products), inkubuojant 5 min ant purtyklės. Reakcija sustabdoma membraną plaunant kelias minutes su distiliuotu vandeniu. Išdžiovinus membraną ji yra nuskenuojama.

Tiriant žuviai alergiškų pacientų kraujo serumuose esančių IgE sąveiką su žuvų ekstraktais, po blokavimo membrana buvo inkubuojama 1 h RT ant purtyklės su serumais skiestais santykiu 1:50 su blokavimo tirpalu, turinčių 0,1 % Tween-20. Praplovus membraną, kaip aprašyta aukščiau, ji buvo inkubuojama 1 h RT ant purtyklės su pelės antikūnais prieš žmogaus IgE Fc-HRP (SouthernBiotech) skiestais santykiu 1:1000 su blokavimo tirpalu,

turinčių 0,1 % Tween-20. Praplovimai ir membranos ryškinimas atliktas kaip aprašyta aukščiau.

2.2.6.8. Taškinis blotas

Ant atkirptos PVDF membranos juostelės (5 x 0,5 cm), suvilgytos metanoliu, buvo lašinami mėginiai: po 2 μ L rekombinantinių baltymų ir po 5 μ L alergenų ekstraktų (galutinė koncentracija 1 μ g/ μ L, skiedžiama su PBS). Membrana buvo džiovinama ~5 min RT ir po to blokuojama su imunobloto blokavimo tirpalu per naktį 4 °C temperatūroje. Tada membrana praplaunama du kartus su PBS-T tirpalu ir inkubuojama 1 h RT ant purtyklės su išgrynintais MAk (galutinė koncentracija 5 μ g/mL) skiestais su blokavimo tirpalu, turinčių 0,1 % Tween-20. Praplovimai, inkubacija su ožkos antikūnais prieš pelės IgG, konjuguotais su HRP (Biorad), ir membranos ryškinimas atliktas kaip aprašyta 2.2.6.7. skyriuje.

Atliekant taškinį blotą su žuviai alergiškų pacientų serumo mėginiais, ant nitroceliuliozinės membranos juostelių (5 x 0,5 cm) buvo lašinami mėginiai: po 2 μ L išgrynintų rekombinantinių MBP-Cyp c 2 ir MBP baltymų (galutinė koncentracija 1 μ g/mL) ir po 2 μ L denatūruoto (virto 10 min 100 °C) rekombinantinio MBP-Cyp c 2 baltymo (galutinė koncentracija 0,1, 0,5 ir 1 μ g/mL). Mėginiai buvo skiedžiami su PBS. Išdžiovinus membraną (20–30 min RT), ji buvo blokuojama su blokavimo tirpalu 2 h RT ant purtyklės. Po to membrana inkubuojama 2 h RT ant purtyklės su pacientų serumo mėginiais skiestas santykiu 1:30 su PBS-T tirpalu, turinčiu 2 % BSA. Po kelių plovimų su PBS-T, membrana buvo inkubuojama 1 h RT ant purtyklės su pelės antikūnais prieš žmogaus IgE Fc-HRP (SouthernBiotech) skiestais santykiu 1:1000 su PBS-T tirpalu, turinčiu 2 % BSA. Atlikus plovimą su PBS-T, membranos ryškinimas atliktas kaip aprašyta 2.2.6.7. skyriuje.

2.2.6.9. Imunoprecipitacija

100 μ L sefrozės sorbento „rProtein A Sepharose Fast Flow“ (Cytiva) buvo plaunama 5 kartus su 0,1 mol/L Tris-HCl buferiniu tirpalu. Tarp plovimų centrifuguojama 2 min esant 3000 x g greičiui. Po paskutinio plovimo sefrozė suspenduojama 200 μ L 0,1 mol/L Tris-HCl buferiniame tirpale, sumaišoma su 0,5 mg išgryninto MAk ir 1,5 h inkubuojama ant purtyklės RT. Po inkubacijos mėginys centrifuguojamas 5 min esant 3000 x g greičiui, supernatantas nupilamas ir nuosėdos 4 kartus praplaunamos su 1 mL PBS tirpalu, centrifuguojant 5 min esant 3000 x g greičiui. Po paskutinio plovimo nuosėdos suspenduojamos 200 μ L PBS, po lygiai išdalinamos į

mėgintuvėlius, kuriuose yra išspilstyti alergenu ekstraktai (po 50 μL), ir viskas inkubuojama per naktį 4 °C temperatūroje purtant. Po to mėginiai centrifuguojami 5 min esant 3000 x g greičiui 4 °C temperatūroje, supernatantai nupilami ir nuosėdos 4 kartus plaunamos su PBS. Po paskutinio plovimo nuosėdos suspenduojamos 100 μL PBS. Paruošti mėginiai analizuojami baltymų elektroforezės ir imunobloto metodais.

2.2.7. Rekombinantinių alergenu hidrolizė TEV proteaze

8 μg rekombinantinio alergenu buvo sumaišoma su TEV proteaze (santykiu 1:20) ir inkubuojama per naktį RT. Paruoštas mišinys analizuojamas baltymų elektroforezės ir imunoblotingo metodais.

2.2.8. Alergenų ekstraktų ruošimas laboratorijos sąlygomis

Skirtingų žuvų rūšių, vištienos ir kiaulienos alergenu ekstraktai buvo ruošiami iš raumens audinio. 1–3 g raumens audinio buvo homogenizuota atšaldytame PBS tirpale, turinčiame 0,15 mol/L NaCl, naudojant stiklinį Daunco homogenizatorių (galutinis mėginio tūris buvo 15 mL). Gautas mėginys centrifuguojamas 15 min esant 4000 x g greičiui, supernatantas surenkamas ir saugomas ~ 1 mėn. 4 °C temperatūroje, o ilgesniam saugojimui laikomas –20 °C temperatūroje.

Kepimo mielių mišinys buvo paruoštas ištirpinus 300 mg mielių 1 mL PBS tirpale, turinčiame 0,15 mol/L NaCl. Paruoštas mišinys saugomas irgi ~ 1 mėn. 4 °C temperatūroje, o ilgesniam saugojimui –20 °C temperatūroje.

Virtos ir keptos žuvies (karpio ir argentininės jūrų lydekos) ekstraktai buvo paruošti kaip aprašyta aukščiau, tik buvo ruošiami iš 5 min virtos arba 5 min keptos žuvies.

Baltymų koncentracijos paruoštuose ekstraktuose buvo nustatytos Bradfordo metodu.

2.2.9. Baltymų koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu

Pirmiausiai buvo paruošti skirtingos koncentracijos BSA standarto mėginiai (2; 1,5; 1; 0,75; 0,5 ir 0,2 mg/mL) ir tada tiriamieji mėginiai, kurie buvo skiesti 2, 4 arba daugiau kartų su PBS tirpalu, turinčiu 0,15 mol/L NaCl. Paruošti mėginiai buvo įnešami į IFA plokštelės šulinėlius (po 5 μL /šul.) ir tada įpilama po 250 μL „Bradfordo“ reagento (Thermo Fisher Scientific). Plokštelė inkubuojama 5 min purtant RT ir su spektrofotometru „Multiskan GO“ (Thermo Fisher Scientific) buvo išmatuojamas OT esant 595 nm bangos ilgiui. Gauti rezultatai analizuoti programa „Origin Pro 8.0“ (OriginLab), kurios

pagalba remiantis BSA standarto mėginių gautais OT rezultatais buvo brėžiama kalibracinė kreivė ir nustatomos baltymų koncentracijos mėginiuose. Matavimai atlikti su pakartojimais.

2.2.10. Bioinformatiniai metodai

Align (<https://www.uniprot.org/align>) – įrankis baltymų aminorūgščių sekų palyginimui.

Benchling (<https://www.benchling.com/>) – internetinis įrankis vektorių ir į juos įklonuoatų DNR fragmentų analizei.

ExpASy compute pI/Mw tool (https://web.expasy.org/compute_pi/) – internetinis įrankis apskaičiuoti teorinei baltymų molekulinei masei (MW) ir įvertinti izoelektrinį tašką (pI).

ExpASy translate tool (https://web.expasy.org/compute_pi/) – internetinis įrankis nukleotidų (DNR/RNR) sekos vertimui į baltymo aminorūgščių seką.

GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) – duomenų bazė informacijai apie alergenų koduojančias DNR sekas.

GraphPad Prism 9 (GraphPad Software) – programinė įranga statistinei analizei, duomenų apdorojimui ir vaizdavimui.

Microsoft Excel 2016 (Microsoft Office) – programa statistinei analizei, duomenų apdorojimui ir vaizdavimui.

Multiple Primer Analyzer (<https://www.thermofisher.com>) – įrankis pradmenų kūrimui ir analizei.

Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) – įrankis nukleorūgščių sekų palyginimui.

Origin Pro 8.0 (OriginLab) – programa statistinei analizei, duomenų apdorojimui ir vaizdavimui.

Paint 3D (Microsoft) – programinė įranga paveikslėlių vizualizavimui ir schemų kūrimui.

SoftMax Pro 4.0 (Molecular Devices) – programinė įranga duomenų apdorojimui ir vaizdavimui.

WHO/IUIS alergenų nomenklatūra (<http://www.allergen.org/>) ir Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) – duomenų bazės informacijai apie alergenų ir jų aminorūgščių sekas.

Įvertinti, ar kalcio ir magnio jonai turėjo įtakos MAk prisijungimui prie antigeno, analizuotos mėginių grupės buvo lyginamos naudojant *Stjudento t* testą. Jeigu $p < 0,05$, skirtumas tarp mėginių grupių yra statistiškai reikšmingas. Duomenys analizuoti naudojantis „GraphPad Prism 9” programine įranga.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Žuvis yra vienas iš maisto alergenų šaltinių, galinčių pacientams sukelti įvairius alergijos simptomus (pvz., alerginę slogą, viduriavimą, dilgėlinę) ar net anafilaksinį šoką. Alergiją žuviai gali sukelti žuvies mėsoje, kauluose, odoje, ikruose aptikami įvairūs alergenai: β -parvalbuminas, β -enolazė, aldolazė A, tropomiozinas, kolagenas ir vitelogeninas. Šio darbo metu *E. coli* bakterijose buvo susintetinta kolekcija rekombinantinių alergenų, sulietų su maltozę surišančiu baltymu (MBP): 11 skirtingų žuvų rūšių β -parvalbuminų, paprastojo karpio β -enolazė, Kaliforninio šakadančio ryklio α -parvalbuminas ir vištos α -parvalbuminas. Išgrynintų naujų rekombinantinių alergenų alergeniškumas buvo įvertintas naudojant žuviai alergiškų pacientų serumo mėginius.

Įsijautrinusiems žuviai pacientams patariama visiškai vengti žuvies ir jos produktų. Deja, kartais tai sunku padaryti, nes žuvies baltymais gali būti užteršti kiti maisto produktai jų gamybos metu, todėl pacientus gali ištikti nepageidaujamos alerginės reakcijos. Siekiant jų išvengti, kuriamos įvairios analitinės sistemos, skirtos aptikti žuvų alergenams analizuojamuose mėginiuose. Tokių sistemų kūrimui gali būti naudojami rekombinantiniai žuvies alergenai ir jiems specifiški MAk. Šio darbo metu, pasitelkus hibridomų technologiją buvo sukurti MAk prieš atlantinės menkės β -parvalbuminą, paprastojo karpio β -parvalbuminą ir β -enolazę. Sukurti MAk buvo apibūdinti taikant įvairius imunocheminius metodus. MAk prieš žuvų parvalbuminus kryžminis reaktyvumas buvo įvertintas su skirtingų žuvų rūšių ir vištos rekombinantiniais alergenais. Naudojant komercinius ir laboratorijos sąlygomis paruoštus skirtingų žuvų rūšių ekstraktus, buvo įvertintas sukurtų MAk tinkamumas aptikti natūralius alergenų analizuojamuose žuvies ekstraktų mėginiuose, taip pat vištienos ir kiaulienos ekstraktuose. Kadangi MAk prieš žuvų parvalbuminus pasižymėjo plačiu kryžminiu reaktyvumu, buvo nuspręsta juos pritaikyti kuriant dviepitopę IFA, skirtą parvalbuminų aptikimui žuvų ekstraktuose.

3.1. Rekombinantinių alergenų sintezė ir gryninimas

Pirmiausia buvo susintetinti rekombinantiniai alergenai, skirti monokloninių antikūnų (MAk) kūrimui: paprastojo karpio β -parvalbuminas ir β -enolazė. Rekombinantinių alergenų sintezei buvo pasirinkta *E. coli* raiškos sistema ir pET28-MBP-TEV vektorius (Addgene), kur tikslinės alergenų aminorūgščių sekos buvo įterpiamos tarp TEV proteazės atpažinimo ir hidrolizės srities (angl. *TEV-site*) ir šešių histidinių uodegos (angl. *6xHis-tag*).

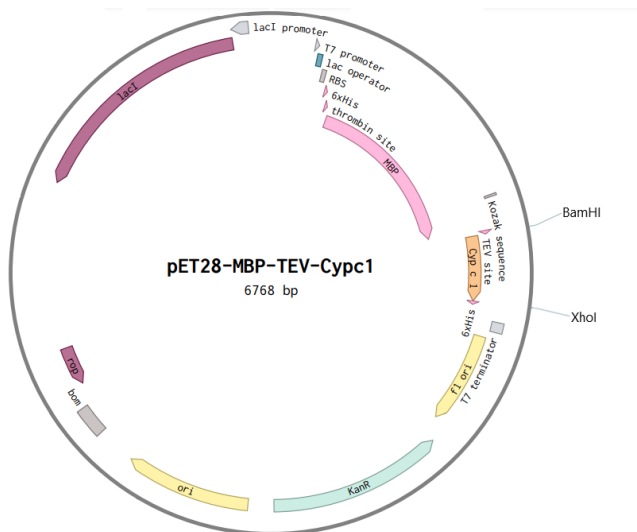
Tokiu būdu buvo susintetinami rekombinantiniai baltymai, turintys N-gale prijungtą maltozę surišantį baltymą (MBP). MBP baltymas yra vienas iš dažniausiai naudojamų suliejimo partnerių vykdant baltymų sintezę bakterijų raiškos sistemose. Pastebėta, kad suliejus norimą baltymą su MBP yra padidinamas jo tirpumas ir yra skatinamas tinkamas baltymo struktūros formavimas. Be to, sulietus baltymus galima gryninti afininės chromatografijos metodu naudojant amilozės sorbentą, su kuriuo sąveikauja MBP baltymas (Waugh, 2016; Terpe, 2003). Pavyzdžiui, rekombinantinių beržo žiedadulkių (Bet v 1), žemės riešuto (Ara h 2), brazilinio kaučiukmedžio (Hev b 1), gauruotosios sojos (Gly m 3) alergenų struktūros ir savybių tyrimams buvo susintetinti rekombinantiniai alergenai sulieti su MBP (van Neerven et al., 1998; Mueller et al., 2011; Yeang et al., 1996; Lorenz et al., 2001).

Iš paprastojo karpio raumens buvo išskirta iRNR, kuri buvo panaudota kopijinės DNR (kDNR) sintezei. Naudojant sukurtus pradmenis ir kDNR buvo susintetintos karpio β -parvalbuminą (342 bazių porų (bp) ilgio) ir β -enolazę (1317 bp ilgio) koduojančios DNR sekos, kurios po to buvo įterptos į pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific) vektorių. Tolimesniems darbams buvo pasirinktos tos rekombinantinės plazmidės, kuriose įterptos alergenų koduojančios DNR sekos sutapo arba su paprastojo karpio β -parvalbumino arba β -enolazės sekomis, t. y. sekos buvo palygintos su GenBank duomenų bazėje esančiomis paprastojo karpio viso genomo sekomis: LHQP01000860.1 ir LHQP01019434.1. Iš pasirinktų plazmidžių DNR fragmentai buvo iškirpti su restrikcijos endonukleazėmis (RE) ir įterpti į kirptą pET28-MBP-TEV vektorių, kad būtų susintetinti rekombinantiniai baltymai, sulieti su MBP (3.1 pav.). Rekombinantinių paprastojo karpio alergenų biosintezę atliko dr. Milda Plečkaitytė.

Rekombinantiniai kitų žuvų rūšių parvalbuminai ir vištos α -parvalbuminas buvo susintetinti kaip ir karpio alergenai, tik parvalbuminus koduojančios DNR sekos buvo gautos iš Invitrogen (JAV), t. y. jos buvo susintetintos pagal sekas, pateiktas WHO/IUIS alergenų nomenklatūros ir Uniprot duomenų bazėse. Šios susintetintos DNR sekos 5' gale turi BamHI, o 3' gale XhoI RE atpažinimo sritis, ir buvo įterptos į pMA-RQ vektorių. Naudojant RE DNR sekos buvo iškirptos iš pMA-RQ vektoriaus ir įterptos į pJET1.2 vektorių padauginimui, o tada įterptos į kirptą pET28-MBP-TEV vektorių, kad būtų susintetinti rekombinantiniai baltymai, turintys N-gale prijungtą MBP.

Sukonstruotų naujų pET28-MBP-TEV vektorių, su įterptomis alergenų sekomis, sekoskaita buvo atlikta VU GMC BTI Sekvenavimo centre. Išanalizavus gautas sekas, pasirinktais konstruktais buvo transformuotos *E. coli* BL21 (DE3), BL21 (DE3) Star arba Tuner (DE3) kamieno bakterijos,

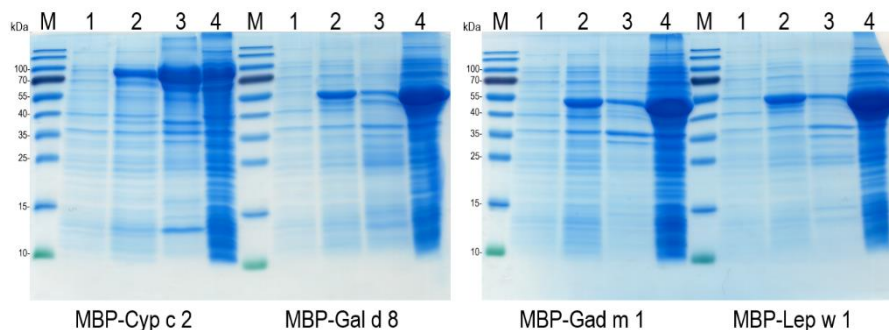
kuriuose buvo vykdoma tikslių baltymų raiškos indukcija (pridedant į terpę IPTG). Rekombinantinių alergenų sintezei naudojome trys skirtingus *E. coli* kamienus, siekdami pasižiūrėti, kuris lemia efektyvesnę alergenų sintezę. *E. coli* BL21 (DE3) ir BL21 (DE3) Star kamienai turi λDE3 (rekombinantinį fagą), kuris turi T7 RNR polimerazės geną, kontroliuojamą LacUV5 promotoriaus, ir yra naudojami vektoriams, kur baltymų sintezė vyksta nuo T7 promotoriaus. BL21 (DE3) Star kamienas nuo BL21 (DE3) skiriasi tuom, kad turi mutaciją *rne131* gene, kas manoma padidina iRNR stabilumą ir kartu dar padidina baltymų sintezės efektyvumą. Tuo tarpu *E. coli* Tuner (DE3) kamienas turi λDE3 ir laktozės permeazės (angl. *lac permease (lacY)*) geno deleciją. Be to, baltymų sintezė gali būti reguliuojama keičiant IPTG kiekį, kuomet yra vykdomas tikslių baltymų raiškos indukcija (Hayat et al., 2018).



3.1 pav. Sukonstruoto naujo pET28-MBP-TEV-Cypc1 vektoriaus, koduojančio rekombinantinį MBP-Cyp c 1 baltymą, schema. *TEV site* – TEV proteazės hidrolizės sritis; *MBP* – genas, koduojantis MBP baltymą; *Cyp c 1* – genas, koduojantis paprastojo karpio β-parvalbuminą (342 pb). Schema sukurta naudojantis „Benchling“ internetiniu įrankiu.

Atlikus indukciją, bakterijų lizatų mėginiai buvo analizuojami prieš ir po indukcijos baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis (SDS-PAGE) metodu (3.2 pav.). Siekiant įvertinti, ar bakterijose vyko tikslių baltymų raiška, teorinės rekombinantinių alergenų molekulinės masės (MW) buvo palygintos su nustatytomis MW iš baltymų elektroforezės gelių nuotraukų, pagal molekulinės masės standartą (Thermo Fisher Scientific). Gauti rezultatai parodė, kad visuose trijuose *E. coli* kamienuose po indukcijos

buvo sintetinami rekombinantiniai alergenai, sulieti su MBP, kurių MW masė sutapo su apskaičiuota teorine MW.



3.2 pav. Rekombinantinių alergenų sintezės skirtinguose *E. coli* kamienuose analizė ir baltymų tirpumo įvertinimas SDS-PAGE metodu. M – baltymų molekulinio svorio standartas (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa, Thermo Fisher Scientific); 1 – bakterijų lizatas prieš indukciją; 2 – bakterijų lizatas po indukcijos; 3 – suardytos bakterijų biomasės nuosėdos; 4 – suardytos bakterijų biomasės tirpus supernatantas. Rekombinantinių alergenų MBP-Cyp c 2 ir MBP-Gad m 1 sintezė vykdyta *E. coli* Tuner (DE3), MBP-Gal d 8 – *E. coli* BL21 (DE3) ir MBP-Lep w 1 – *E. coli* BL21 (DE3) Star kamiene.

Iš viso šio darbo metu buvo susintetinta 14 rekombinantinių alergenų, sulietų su MBP baltymu: paprastojo karpio β -enolazė, 11 skirtingų žuvų rūšių β -parvalbuminų ir du α -parvalbuminai: ryklio ir vištos (3.1 lentelė).

Pirmiausia buvo susintetinti rekombinantiniai paprastojo karpio β -parvalbuminas (MBP-Cyp c 1) ir β -enolazė (MBP-Cyp c 2), kurie buvo naudojami MAK kūrimui. Paprastas karpis yra viena iš dažniausiai vartojamų ir kartu tai yra viena iš plačiausiai tirtų žuvų rūšių pasaulyje. Ankstesniuose tyrimuose buvo parodyta, kad karpio β -parvalbuminas yra svarbus maisto alergenai, turintis IgE epitopus, būdingus ir kitų žuvų rūšių (pvz., tuno, menkės, lašišos) β -parvalbuminams, todėl šis alergenai galėtų būti pritaikyti diagnozuojant alergiją žuviai (Bugajska-Schretter et al., 2000). Siekiant pritaikyti šį žuvies alergeną tyrimams, buvo susintetintas rekombinantinis β -parvalbuminas (rCyp c 1) ir net buvo kūrimas hipoalerginis variantas imunoterapijai (Swoboda et al., 2002b, Swoboda et al., 2007). Tačiau iki šiol nebuvo atlikta jokių tyrimų, susijusių su karpio β -enolaze.

Po to buvo susintetinti įvairių žuvų rūšių β -parvalbuminai. Dauguma pasirinktų žuvų rūšių yra vienos iš labiausiai žinomų žuvų rūšių pasaulyje (pvz., atlantinė lašiša, vaivorykštinis upėtakis, siaminė pangasija). Be to,

3.1 lentelė. Sąrašas rekombinantinių alergenų, kurie buvo susintetinti ir analizuoti šiame darbe.

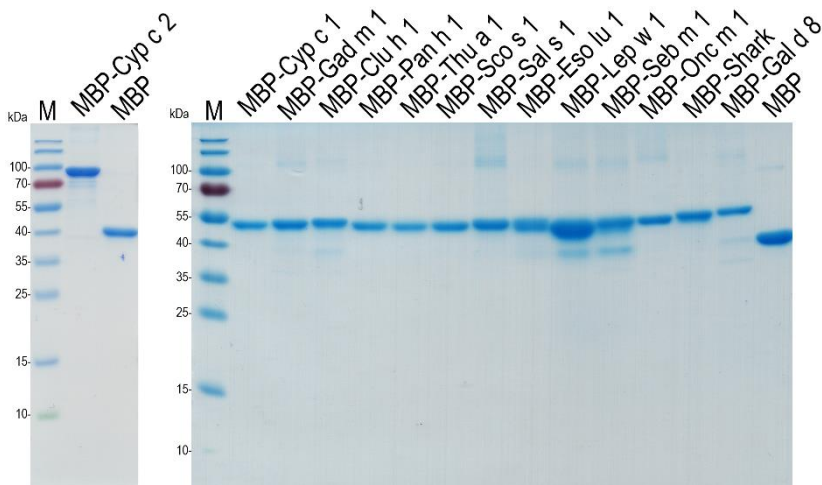
Rekombinantinis alergenai	MW ₁ (kDA)	Alergeno pavadinimas (IUIS)	MW ₂ (kDA)	Parvalbumino izoforma	Alergeno šaltinis	Rūšis	Būrys	<i>E.coli</i> kamienas baltymų sintezei	Duomenų bazė (alergeno seka)
MBP-Cyp c 2	91,7	Cyp c 2	47,5	β	Paprastasis karpis	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Cypriniformes</i>	Tuner (DE3)	WHO/IUIS (Cyp c 2.0101)
MBP-Cyp c 1	55,7	Cyp c 1	11,5	β	Paprastasis karpis	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Cypriniformes</i>	Tuner (DE3)	WHO/IUIS (Cyp c 1.0101)
MBP-Gad m 1	55,5	Gad m 1	11,3	β	Atlantinė menkė	<i>Gadus morhua</i>	<i>Gadiformes</i>	Tuner (DE3)	WHO/IUIS (Gad m 1.0101)
MBP-Sal s 1	56,1	Sal s 1	11,9	β	Atlantinė lašiša	<i>Salmo salar</i>	<i>Salmoniformes</i>	BL21 (DE3)	WHO/IUIS (Sal s 1.0101)
MBP-Onc m 1	56,1	Onc m 1	11,9	β	Vaivorykštinių upėtakis	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Salmoniformes</i>	BL21 (DE3) Star	WHO/IUIS (Gad m 1.0101)
MBP-Clu h 1	55,9	Clu h 1	11,7	β	Atlantinė silkė	<i>Clupea harengus</i>	<i>Clupeiformes</i>	Tuner (DE3)	WHO/IUIS (Clu h 1.0101)
MBP-Pan h 1	55,8	Pan h 1	11,6	β	Siaminė pangasija	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	<i>Siluriformes</i>	Tuner (DE3)	WHO/IUIS (Pan h 1.0101)
MBP-Thu a 1	55,7	Thu a 1	11,5	β	Gelsvauodegės tunas	<i>Thunnus albacares</i>	<i>Scombriformes</i>	Tuner (DE3)	WHO/IUIS (Thu a 1.0101)
MBP-Sco s 1	55,7	Sco s 1	11,5	β	Atlantinė skumburė	<i>Scomber scombrus</i>	<i>Scombriformes</i>	BL21 (DE3) Star	WHO/IUIS (Sco s 1.0101)
MBP-Eso lu 1	55,6	Eso lu 1	11,4	β	Europinė lydeka	<i>Esox lucius</i>	<i>Esociformes</i>	BL21 (DE3) Star	Uniprot (P02619)
MBP-Lep w 1	55,9	Lep w 1	11,7	β	Paprastasis megrimai	<i>Lepidorhombus whiffiagonis</i>	<i>Pleuronectiformes</i>	BL21 (DE3) Star	WHO/IUIS (Lep w 1.0101)
MBP-Seb m 1	55,6	Seb m 1	11,4	β	Didysis jūrinis ešeris	<i>Sebastes norvegicus</i>	<i>Scorpaeniformes</i>	BL21 (DE3) Star	WHO/IUIS (Seb m 1.0101)
MBP-Shark	56,1	-	11,9	α	Kaliforninis šakadantis ryklis	<i>Triakis semifasciata</i>	<i>Carcharhiniformes</i>	BL21 (DE3) Star	Uniprot (P30563)
MBP-Gal d 8	56,3	Gal d 8	12,1	α	Višta	<i>Gallus domesticus</i>	<i>Galliformes</i>	BL21 (DE3)	WHO/IUIS (Gal d 8.0101)

MW₁ – apskaičiuotas teorinės rekombinantinių alergenų, sulietų su MBP, molekulinės masės.

MW₂ – alergenų molekulinės masės, nurodytos WHO/IUIS ir Uniprot duomenų bazėse.

rekombinantiniai atlantinės laiššos, atlantinės menkės β -parvalbuminai buvo susintetinti ir aprašyti ankstesniuose tyrimuose (Lindstrøm et al., 1996; Van Do et al., 2003).

Į šią alergenų kolekciją taip pat įtraukėme ir Europinės lydekos ir Kaliforninio šakadančio ryklio parvalbuminus, kurie dar iki šiol nebuvo susintetinti. Kadangi skirtingų žuvų rūšių β -parvalbuminų aminorūgščių sekos tarpusavyje sutampa daugiau nei 60 %, norėjome turėti kaip įmanoma įvairesnę kolekciją rekombinantinių β -parvalbuminų, priklausančių skirtingų žuvų būriams. Šią kolekciją būtų galima pritaikyti sukurtų MAk apibūdinimui ir įvertinti galima jų kryžminį reaktyvumą su įvairiomis žuvų rūšimis, arba kaip tik nustatyti specifiškumą tik tam tikriems žuvų alergenams. Kadangi ankstesni tyrimai parodė, kad žuviai alergiškų pacientų serume esantys IgE kryžminiškai reagavo su vištos α -parvalbuminu, mes nusprendėme susintetinti ir šį parvalbuminą (González-de-Olano et al., 2012).



3.3 pav. Išgrynintų rekombinantinių alergenų analizė SDS-PAGE metodu. M – baltymų molekulinio svorio standartas (Thermo Fisher Scientific). MBP baltymas 44,2 kDa.

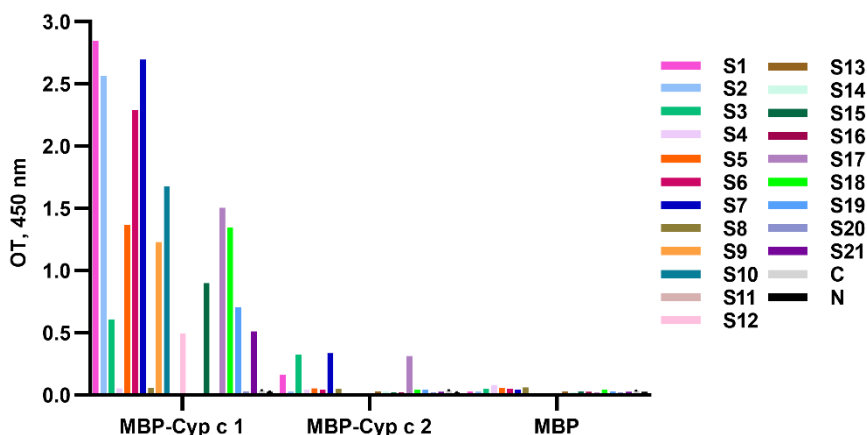
Tolimesniems darbams buvo reikalingi išgryninti rekombinantiniai alergenai. Kadangi baltymai buvo gryninami iš suardyto *E. coli* bakterijų biomasės tirpaus supernatanto, pirmiausia buvo įvertintas rekombinantinių baltymų tirpumas SDS-PAGE metodu, analizuojant supernatanto ir nuosėdų mėginius gautus ultragarsu suardžius bakterijų biomasės po indukcijos (3.2 pav.). Iš gautų rezultatų pastebėjome, kad visuose trijuose pasirinktuose *E. coli* kamienuose didžioji dalis tikslinių baltymų aptinkama bakterijų tirpioje frakcijoje ir jų kiekis yra pakankamas, kad būtų galima atlikti baltymų

gryninimą. Rekombinantinių alergenų gryninimą atliko dr. Mindaugas Zaveckas ir doktorantas Vytautas Rudokas.

Taikant afininės chromatografijos metodą ir 1 mL „MBPTrap™ HP“ kolonėlę, užpildytą „Dextrin Sepharose™ High Performance“ sorbentu (Cytiva), rekombinantiniai baltymai buvo gryninami iš suardyto bakterijų biomasės tirpaus supernatanto. Jų išėiga buvo apie 4–6 mg iš 300 mL bakterijų biomasės. Atliekant baltymų elektroforezę ir išanalizavimus išgrynintų baltymų frakcijas nustatėme, kad nors mėginiuose yra nedidelis kiekis pašalinių baltymų, tačiau pagrindinių alergenų kiekis ir grynumas yra pakankamas tolimesniems tyrimams (3.3 pav.).

3.2. Rekombinantinių alergenų alergenškumo tyrimai

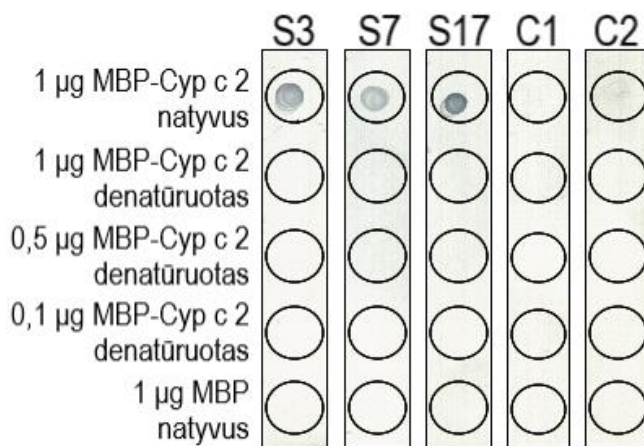
Svarbu įvertinti, ar sukurti rekombinantiniai alergenai pasižymi savybėmis, būdingomis natūraliems alergenams. Netiesioginės IFA metodu mes patikrinome, ar žuviai alergiškų pacientų serume esantys IgE sąveikauja su mūsų sukurtais alergenais. Pirmiausia kraujo serumo mėginius (PlasmaLab International, JAV) ištyrėme su rekombinantiniais paprastojo karpio alergenais. Nustatyta, kad iš 21 tirta mėginio su β -parvalbuminu sąveikavo 14, o su β -enolaze tik 4 mėginiai (S1, S3, S7 ir S17) (3.4 pav.).



3.4 pav. Žuviai alergiškų pacientų kraujo serumuose esančių IgE sąveikos su išgrynintais rekombinantiniais paprastojo karpio β -enolaze (MBP-Cyp c 2) ir β -parvalbuminu (MBP-Cyp c 1) analizė netiesioginės IFA metodu. S1–S21: serumo mėginiai pacientų, kuriems patvirtinta alergija žuviai; C: serumo mėginiai sveikų pacientų; N – neigiama kontrolė, inkubacija be serumo mėginio, tik su antikūnais prieš žmogaus IgE Fc-HRP (SouthernBiotech). Serumo mėginiai buvo skiesti su RotiBlock-T tirpalu santykiu 1:10. Žuviai alergiškų pacientų serumo mėginių matavimai atlikti su pakartojimų. C ir N mėginių matavimai atlikti su pakartojimais.

Be to, nė vienas kraujo serumo mėginys nereagavo su rekombinantiniu MBP baltymu, kuris buvo naudojamas kaip neigiama kontrolė. Gauti rezultatai parodė, kad keletas žuviai alergiškų pacientų yra įsijautrinę ne tik karpio β -parvalbuminui, kuris laikomas pagrindiniu karpio alergenu, bet taip pat reagavo ir su β -enolaze. Rekombinantinių paprastojo karpio baltymų sąveiką su komerciniais kraujo seruo mėginiais ištyrė doktorantė Karolina Bielskė.

Žuvų β -enolazės tampa vis svarbesniu žuvies alergenu. Jos aptinkamos daugelio skirtingų žuvų rūšių ekstraktuose (pvz., jūriniame unguryje, megrime) ir kelių žuvų β -enolazės (Gad m 2, Sal s 2, Pan h 2, Thu a 2) WHO/IUIS alergenų nomenklatūros duomenų bazėje yra pripažintos žuvies alergenais (Argiz et al., 2019; Haroun Díaz et al., 2023; Kuehn et al., 2013). Siekiant parodyti, kad paprastojo karpio β -enolazė yra potencialus žuvies alergenai, buvo atliktas taškinis blotas, kurio metu analizuota žuviai alergiškų pacientų serume esančių IgE sąveika su denatūruotu (virtu 10 min 100 °C) ir su natyviu rekombinantiniu MBP-Cyp c 2 baltymu. Nustatyta, kad 3 iš 21 kraujo serumo mėginių sąveikavo su natyvia baltymo forma (3.5 pav.).

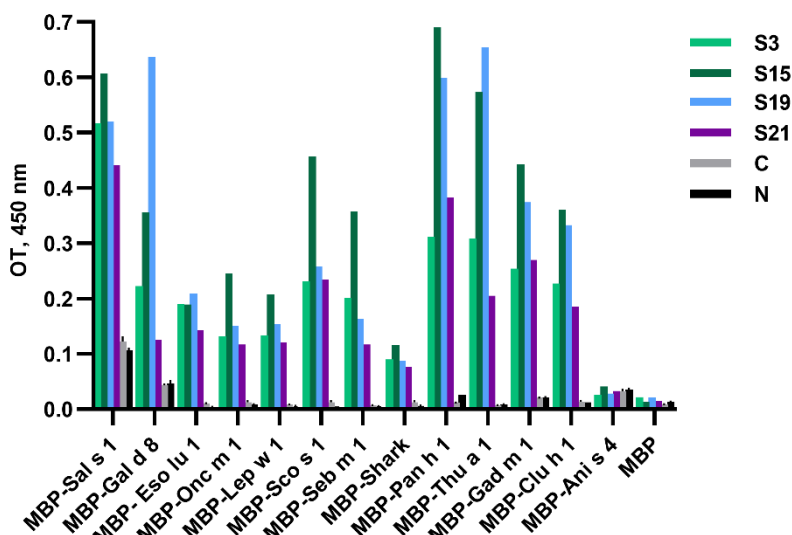


3.5 pav. Žuviai alergiškų pacientų kraujo serumuose esančių IgE sąveikos su išgryninta rekombinantine paprastojo karpio β -enolaze analizė taškinio bloto metodu. S3, S7 ir S17: serumo mėginiai pacientų, kuriems patvirtinta alergija žuviai; C1 – serumo mėginys paciento, kuriam nustatytos kitos alergijos; C2 – serumo mėginys sveiko paciento. Taškiniam blote buvo naudojamas išgrynintas natyvus ir skirtingi kiekiai denatūruoto MBP-Cyp c 2 baltymo, bei išgrynintas MBP baltymas. Serumo mėginiai buvo skiesti santykiu 1:30 su PBS-T tirpalu, turinčio 2 % BSA.

Apibendrinus gautus rezultatus buvo nustatyta, kad žuviai alergiški pacientai yra įsijautrinę ne tik paprastojo karpio β -parvalbuminui, bet taip pat ir kitam karpio alergenui – β -enolazei. 2020 m. remiantis mūsų grupės gautais

rezultatais, paprastojo karpio β -enolazė Pasaulio sveikatos organizacijos sukurtoje WHO/IUIS alergenu nomenklatūros duomenų bazės komiteto buvo pripažinta kaip žuvies alergenas ir įtraukta į duomenų bazę pavadinimu *Cyp c 2* (<http://www.allergen.org/viewallergen.php?aid=1045>).

Visos rekombinantinių parvalbuminų kolekcijos apibūdinimui IFA metodu buvo pasirinkti 4 pacientų kraujo serumo mėginiai (S3, S15, S19 ir S21). Iš gautų rezultatų nustatyta, kad pacientų kraujo serumuose esantys IgE sąveikavo su visais tirtais alergenais ir buvo stebimas kryžminis reaktyvumas ne tik tarp skirtingų žuvų rūšių, bet ir tarp žuvų ir vištos parvalbuminų (3.6 pav.). Be to, šie mėginiai nesąveikavo su rekombinantiniu *Anisakis simplex* alergenų (MBP-Ani s 4), kuris šio eksperimento metu buvo naudojamas kaip papildoma kontrolė siekiant patvirtinti, kad IgE atpažįstą prie MBP baltymo prijungtus parvalbuminus ir nesąveikauja su kitais alergenais. Taip pat visi serumo mėginiai nereagavo su rekombinantiniu MBP baltymu, kuris buvo naudojamas kaip neigiama kontrolė.



3.6 pav. Žuviai alergiškų pacientų kraujo serumuose esančių IgE sąveikos su išgrynintais rekombinantiniais alergenais analizė netiesioginės IFA metodu. S3, S15, S19 ir S21: serumo mėginiai pacientų, kuriems patvirtinta alergija žuviai; C: serumo mėginiai sveikų pacientų; N – neigiama kontrolė, inkubacija be serumo mėginio, tik su antikūnais prieš žmogaus IgE Fc-HRP (SouthernBiotech). Serumo mėginiai buvo skiesti su RotiBlock-T tirpalu santykiu 1:10. Žuviai alergiškų pacientų serumo mėginių matavimai atlikti be pakartojimų. C ir N mėginių matavimai atlikti su pakartojimais.

Atliktuose ankstesniuose tyrimuose taip pat buvo parodyta, kad žuviai alergiškų pacientų serume esantys IgE kryžmiškai reaguoja su įvairių žuvų β -

parvalbuminai (pvz., menkės, lašišos, silkės, vilkžuvės) (Van Do et al., 1999; Van Do et al., 2005b). Kuehn ir jos kolegų pateiktame straipsnyje buvo aprašyta, kad žuviai ir vištienai įsijautrinusių pacientų serume esantys IgE sąveikavo tiek su vištos, tiek su žuvies alergenais, todėl žuviai alergiški žmonės gali būti įsijautrinę ir vištienos alergenams, ir atvirkščiai (Kuehn et al., 2016).

Siekiant patvirtinti, kad šiame tyrime naudotuose žuviai alergiškų pacientų kraujo serumo mėginiuose esantys IgE reaguoja su natūraliais žuvų alergenais, IFA ir imunoblotu metodais ištyrėme 4 serumo mėginių (S3, S15, S19 ir S21) sąveiką su komerciniais karpio ir menkės ekstraktais (DST, Vokietija) (3 priedas). Visi tirti serumo mėginiai reagavo su alergenų ekstraktais IFA metodu, tačiau tik du serumo mėginiai aptiko β -parvalbuminus (MW ~11–12 kDa) imunoblotu metodu. Šiuo eksperimentu parodėme, kad naudoti žuviai alergiškų pacientų kraujo serumo mėginiuose esantys IgE sąveikauja tiek su natūraliais žuvų alergenais, tiek su mūsų susintetintais rekombinantiniais alergenais.

Apibendrinus šio tyrimo metu gautus rezultatus, galima teigti, kad mūsų naudota baltymų raiškos sistema, skirtingi *E. coli* bakterijų kamienai ir pasirinktas suliejimo partneris (MBP baltymas) buvo tinkami naujų rekombinantinių alergenų sintezei ir grynimui. Kadangi šie baltymai buvo atpažinti žuviai alergiškų pacientų kraujo serumuose esančių IgE, jie pasižymi antigeninėmis savybėmis, būdingomis natūraliems alergenams ir yra tinkami tolimesniems darbams, t. y. žuvų alergenams specifiskų MAK kūrimui ir apibūdinimui.

3.3. Monokloninių antikūnų prieš žuvies alergenų kūrimas

MAK buvo kuriami prieš tris skirtingus žuvų alergenų taikant hibridomų technologiją. BALB/c linijos pelės buvo imunizuotos arba natūraliu atlantinės menkės β -parvalbuminu (nGad m 1, DST, Vokietija), arba rekombinantiniu paprastojo karpio β -parvalbuminu, sulietu su MBP (MBP-Cyp c 1), arba rekombinantine paprastojo karpio β -enolaze, sulieta su MBP (MBP-Cyp c 2). Hibridinės ląstelės (hibridomos) buvo sukurtos suliejus pelės Sp2/0 mielomos ląsteles su pelės blužnies ląstelėmis, išskirtomis iš imunizuotos pelės, turėjusios didžiausią antikūnų titrą po visų atliktų imunizacijų (4 priedas). Patikrinus pelių kraujo mėginius po III imunizacijos netiesioginės IFA metodu nustatyta, kad MBP-Cyp c 1 baltymo atveju specifinių antikūnų titras siekė 1:88800, MBP-Cyp c 2 baltymo atveju 1:96000, o nGad m 1 1:27000. Gauti rezultatai rodo, kad pasirinktieji antigenai yra imunogeniški. Dalis antikūnų buvo susidarę prieš rekombinantinį MBP baltymą, todėl hibridizacijai buvo

atrinktos tos pelės, kurių antikūnų titras prieš rekombinantinius MBP-Cyp c 1 ir MBP-Cyp c 2 buvo didžiausi. Pelių imunizacijas nGad m 1 baltymu atliko dr. Martynas Simanavičius.

Hibridomų klonai, sekretuojantys antikūnus prieš tikslinį antigeną, buvo identifikuoti netiesioginės IFA metodu. MBP baltymas buvo naudojamas kaip neigiama kontrolė. Atrinkti hibridinių ląstelių klonai buvo perklonuoti serijinių skiedimų metodu ir vėliau dar kartą patikrinti netiesioginės IFA metodu, siekiant įvertinti jų specifiskumą antigenams. Iš viso pavyko sukurti 7 hibridinių ląstelių linijas, sekretuojančias antikūnus prieš žuvies alergenų: 2 MAK prieš karpio β -enolazę (klonai 14F3 ir 6E4), 1 MAK prieš karpio β -parvalbuminą (klonas 3F6) ir 4 MAK prieš atlantinės menkės β -parvalbuminą (klonai 7B2, 2C1, 18H3 ir 16B3).

Ankstesniuose tyrimuose triušio ir pelės PAK, sukurti prieš menkės, lašišos, baramudžio, pangasijos, sardinės parvalbuminus buvo naudojami aptikti parvalbuminams įvairiuose žuvų ekstraktuose ir tiriamuose mėginiuose (Lindstrøm et al., 1996; Faeste and Plassen, 2008; Sharp et al., 2015). Anksčiau sukurtieji MAK prieš įvairių žuvų parvalbuminus (pvz., paprastojo karpio, australinio tuno, baltojo plačiakakčio) arba prieš žuvų ekstraktus (šamažuvės, karibinio rifešerio) pasižymėjo kryžminiu reaktyvumu su įvairių žuvų rūšių parvalbuminiais ir net sąveikavo su kitų gyvūnų ekstraktais (pvz., pelės, varlės, žiurkės ir t. t.) (Celio et al., 1988; Kawase et al., 2001; Gajewski and Hsieh, 2009; Chen and Hsieh, 2021). Šiuo metu yra žinoma apie vieną komercinį MAK prieš karpio parvalbuminą (PV 235, Swant, Šveicarija) (Lee et al., 2011). Nors ir sukurta įvairių MAK prieš žuvų parvalbuminus, literatūroje daugiausia aprašyta eksperimentų naudojant universalų MAK PARV-19 (Merk, Vokietija). Tai pelės MAK prieš varlės raumens parvalbuminą. Šis MAK reaguoja su skirtingų žuvų rūšių parvalbuminiais (pvz., karpio, menkės, šamo, tilapijos, ryklio ir kitų). Nepaisant to, kad MAK PARV-19 pasižymi plačiu kryžminiu reaktyvumu, vieno tyrimo metu buvo parodyta, kad antikūnas nereaguoja su geltonpelekio tuno, o kito – su durklažuvės, ledjūrio menkės ir kitų žuvų ekstraktuose esančiais parvalbuminiais (Chen et al., 2006; Gajewski and Hsieh, 2009; Saptarshi et al., 2014). Tai rodo, kad yra poreikis naujų MAK prieš žuvų alergenų, kurie galėtų būti pritaikyti įvairių žuvų parvalbuminų aptikimui alergenų ekstraktuose. Šio darbo metu buvo sukurti nauji MAK prieš žuvų parvalbuminus: prieš natūralų atlantinės menkės β -parvalbuminą ir prieš rekombinantinį paprastojo karpio β -parvalbuminą. Pasirinkti šių žuvų rūšių parvalbuminai, kadangi tai vieni iš plačiausiai tirtų žuvų alergenų, kurių aminorūgščių sekos sutampa daugiau nei 60 % su kitų žuvų rūšių parvalbuminiais (pvz., lašišos, skumbrės, silkės ir t. t.). Dėl to buvo iškelta

prielaida, kad prieš šiuos parvalbuminus sukurti MAk galėtų pasižymėti plačiu kryžminiu reaktyvumu ir pritaikomumu.

Iki šiol nėra žinoma apie MAk prieš žuvų β -enolazes, todėl mūsų sukurtieji MAk prieš rekombinantinę paprastojo karpio β -enolazę suteiks naujos informacijos apie šį žuvų alergeną.

3.4. Monokloninių antikūnų apibūdinimas

Taikant netiesioginės IFA ir imunobloto metodus, buvo nustatomas antikūnų poklasis, tariamoji giminingumo konstanta (K_d) ir įvertinama, ar antikūnai sąveikauja su denatūruotu antigenu. Eksperimentų metu buvo naudojama arba hibridomų augimo terpė arba išgryninti MAk. Antikūnai buvo gryninami iš augimo terpės afininės chromatografijos metodu „AKTA purifier 100“ (GE Healthcare Bio-Sciences AB) chromatografijos sistema, naudojant sefarozę su baltymu A (Cytiva). Ląstelių augimo terpėje be antikūnų yra ir kitų priemaišų (pvz., veršiuo serumo albumino, žuvusių ląstelių), kurios gali turėti įtakos atliekamiems tyrimams. Be to, atlikus gryninimą darbams galima pasirošti žymiai didesnės koncentracijos antikūnų mėginius.

MAk poklasio nustatymas reikalingas tam, kad būtų parinktos tinkamos sąlygos antikūnų gryninimui iš hibridomų augimo terpės. Taikant netiesioginę IFA metodą ir pelės imunoglobulinų poklasio nustatymui skirtą komercinį rinkinį „BD Mouse Immunoglobulin Isotyping ELISA Kit“ (BD Biosciences) buvo nustatyti visų sukurtų MAk poklasiai ir lengvosios grandinės tipas. Nustatyta, kad MAk prieš karpio β -enolazę poklasis yra IgG2b, o visų kitų MAk – IgG1. Taip pat nustatyta, kad visi MAk turi κ lengvasias grandines. Remiantis šiais rezultatais, visiems antikūnams gryninti pasirinkta sefarozė su baltymu A, tačiau kiekvienam poklasiui buvo naudoti skirtingi užnešimo ir praplovimo buferiniai tirpalai.

Tariamoji giminingumo konstanta (K_d) parodo, kaip stipriai antikūnas sąveikauja su antigenu, t. y. kuo mažesnė K_d vertė, tuo didesnis antikūno giminingumas antigenui. Didelio giminingumo antikūnais laikomi tie, kurių K_d vertė yra intervale nuo 1×10^{-9} mol/L iki 1×10^{-12} mol/L. K_d lygi tokiai antikūno koncentracijai (mol/L), kuriai esant optinis tankis (OT) yra lygus pusei maksimalios OT vertės. Visų MAk K_d vertės buvo nustatytos netiesioginės IFA metodu, kai 96 šulinėlių plokštelės buvo padengtos MBP-Cyp c 2, MBP-Cyp c 1 arba nGad m 1 baltymais, priklausomai nuo tiriamo MAk. Nustatyta, kad visų MAk, išskyrus MAk 6E4, tariamųjų giminingumo konstantų vertės $< 1 \times 10^{-9}$ mol/L, t. y. visi MAk stipriai sąveikauja su tiksliniu antigenu (3.2 lentelė).

3.2 lentelė. MAk savybės.

MAk klonas	Poklasis	K _d vertė, mol/L	Sąveika su antigenu			
			MBP-Cyp c 2		MBP	
			IFA	IB	IFA	IB
<i>14F3</i>	IgG2b	3,04×10 ⁻¹⁰	+	-	-	-
<i>6E4</i>		7,64×10 ⁻⁸	+	+	-	-
MAk klonas	Poklasis	K _d vertė, mol/L	MBP-Cyp c 1		MBP	
			IFA	IB	IFA	IB
<i>3F6</i>	IgG1	6,99×10 ⁻¹¹	+	+	-	-
MAk klonas	Poklasis	K _d vertė, mol/L	<i>nGad m 1</i>			
			IFA		IB	
<i>7B2</i>	IgG1	1,021×10 ⁻¹⁰	+		+	
<i>2C1</i>		4,117×10 ⁻¹⁰	+		+	
<i>18H3</i>		3,113×10 ⁻¹⁰	+		+	
<i>16B3</i>		5,055×10 ⁻¹⁰	+		+	

IFA – imunofermentinė analizė; IB – imunoblotas.

„+“ – MAk sąveikavo su antigenu; „-“ – MAk nesąveikavo su antigenu.

Netiesioginės IFA metodu nustatyta, kad MAk sąveikauja su natyvia baltymo forma (5 priedas, A dalis). Atlikdami imunoblotą siekėme įvertinti, ar MAk atpažįstą denatūruotą antigeną ir jungiasi prie linijinio jo epitopo. Imunobloto metodu tikrinome visų hibridinių ląstelių augimo terpes su pasirinktais antigenais. Tikrindami MAk prieš paprastojo karpio β-enolazę ir β-parvalbuminą, kaip neigiamą kontrolę naudojome rekombinantinį MBP baltymą. Visi MAk, išskyrus MAk 14F3, atpažino linijinius antigeno epitopus (5 priedas, B dalis). Kadangi MAk 14F3 nesąveikavo su denatūruotu rekombinantiniu baltymu, tai rodo, kad šis antikūnas atpažįsta konformacinį antigeno epitopą.

Taigi, atlikę išsamų MAk apibūdinimą nustatėme, kad visi MAk stipriai sąveikauja su tiksliniais antigenais, atpažįsta skirtingos konformacijos antigeno epitopus, todėl toliau buvo įvertinta, ar jie pasižymi kryžminiu reaktyvumu su kitų žuvų rūšių alergenais.

3.5. Monokloninių antikūnų kryžminis specifiskumas

Ankstesni tyrimai parodė, kad MAk sukurti prieš vienos žuvies rūšies parvalbuminą gali pasižymėti kryžminiu reaktyvumu ir reaguoti su kitų žuvų rūšių parvalbuminiais (Kawase et al., 2001; Gajewski and Hsieh, 2009; Chen and Hsieh, 2021). Norėdami įvertinti, ar mūsų sukurtieji MAk prieš žuvų parvalbuminus gali sąveikauti su kitų žuvų rūšių parvalbuminiais, ištyrėme

3.3 lentelė. MAk prieš žuvų parvalbuminus sąveika su skirtingais rekombinantiniais parvalbuminiais IFA, imunobloto (IB) ir taškinio bloto (TB) metodais.

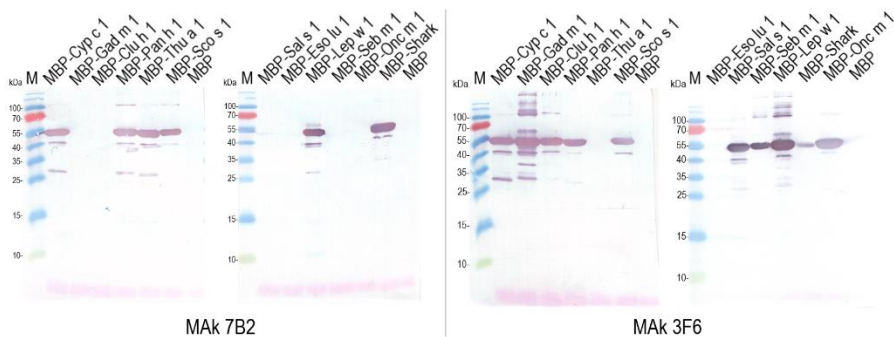
Būrys	Rekombinantinis parvalbuminas	MAk 7B2			MAk 2C1			MAk 18H3			MAk 16B3			MAk 3F6		
		IFA	IB	TB	IFA	IB	TB	IFA	IB	TB	IFA	IB	TB	IFA	IB	TB
<i>Cypriniformes</i>	MBP-Cyp c 1	+++	✓	✓	+++	✓	✓	++	✓	✓	++	✓	✓	+++	✓	✓
<i>Gadiformes</i>	MBP-Gad m 1	+		✓	+		✓	+++	✓	✓	++	✓	✓	+++	✓	✓
<i>Salmoniformes</i>	MBP-Sal s 1													++	✓	✓
<i>Salmoniformes</i>	MBP-Onc m 1										+			+++	✓	✓
<i>Clupeiformes</i>	MBP-Clu h 1	+		✓	+		✓	+	✓	✓	+		✓	+++	✓	✓
<i>Siluriformes</i>	MBP-Pan h 1	+++	✓	✓	+++	✓	✓	++	✓	✓	++	✓	✓	+++	✓	✓
<i>Scombriformes</i>	MBP-Thu a 1	+++	✓	✓	+++	✓	✓	++	✓	✓	++	✓	✓	+		✓
<i>Scombriformes</i>	MBP-SCO s 1	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	++	✓	✓	+++	✓	✓
<i>Esociformes</i>	MBP-Eso lu 1															
<i>Pleuronectiformes</i>	MBP-Lep w 1	+++	✓	✓	+++	✓	✓	++	✓	✓	++	✓	✓	+	✓	✓
<i>Scorpaeniformes</i>	MBP-Seb m 1													+	✓	✓
<i>Carcharhiniformes</i>	MBP-Shark	+++	✓	✓	+++	✓	✓	++	✓	✓	++	✓	✓	+	✓	✓
<i>Galliformes</i>	MBP-Gal d 8	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+	✓	✓	++	✓	✓	+	✓	✓

„✓“ – antikūnas reagavo su antigenu; tuščias langelis – antikūnas nereagavo.

IFA reaktyvumas: (+++) OT₄₅₀ > 1,5; (++) OT₄₅₀ 0,5–1,5; (+) OT₄₅₀ < 0,5.

MAk sąveiką su 12 šiame darbe susintetintų rekombinantinių žuvų parvalbuminų, sulietų su MBP. Tyrimai atlikti netiesioginės IFA, imunobloto ir taškinio bloto metodais (3.3 lentelė).

Visi MAk pasižymėjo kryžminių reaktyvumu ir reagavo su skirtingais rekombinantiniais parvalbuminiais (3.7 ir 3.9 pav., 6 ir 7 priedai).



3.7 pav. MAk 3F6 ir 7B2 sąveikos su rekombinantiniais parvalbuminiais analizė imunobloto metodu. M – baltymų molekulinio svorio standartas (Thermo Fisher Scientific).

MAk 3F6 sąveikavo su visais rekombinantiniais baltymais, išskyrus MBP-Eso lu 1. Tikėtina, kad šis antikūnas atpažįsta β -parvalbuminų konservatyvią aminorūgščių seką, kuri būdinga beveik visų žuvų rūšių β -parvalbuminams. Siekdami išsiaiškinti, kodėl antikūnas nereagavo su MBP-Eso lu 1, buvo palygintos Eso lu 1 ir Cyp c 1 alergenu aminorūgščių sekos naudojantis baltymų UniProt duomenų bazės „Align“ įrankiu. Nustatyta, kad sekos tarpusavyje sutampa 76 %. Kelių svarbių aminorūgščių nesutapimas gali lemti, kad MAk 3F6 neatpažįsta šio alergeno, nors buvo parodyta, kad su juo sąveikavo žuviai alergiškų pacientų serume esantys IgE.

MAk prieš nGad m 1 reagavo su dauguma alergenu, tačiau nereagavo su MBP-Eso lu 1, MBP-Sal s 1, MBP-Onc m 1 (išskyrus MAk 16B3) ir MBP-Seb m 1 baltymais (3.7 pav., 6 ir 7 priedai). Palyginus Gad m 1 aminorūgščių seką, kurią naudojome rekombinantinio MBP-Gad m 1 alergeno sintezei, su Eso lu 1, Sal s 1, Onc m 1 ir Seb m 1 alergenu sekomis, nustatėme 73 %, 65 %, 63 % ir 67 % sekų homologiją. Kaip ir MAk 3F6 atveju, vienos ar kelių aminorūgščių skirtumas žuvų parvalbuminų aminorūgščių sekose gali lemti, kad antikūnas nesąveikaus su analizuojamu alergenu.

Kadangi visi MAk nereagavo su MBP-Eso lu 1 baltymu, nusprendėme IFA ir imunobloto metodais patikrinti PAK prieš nGad m 1 sąveiką su visais rekombinantiniais alergenais (6 priedas). Gauti rezultatai parodė, kad PAK

reagavo su visais susintetintais rekombinantiniais alergenais, taip pat ir MBP-Eso lu 1. Tai rodo, kad dauguma epitopų yra bendri.

WHO/IUIS alergenų duomenų bazėje nurodytos keturios atlantinės menkės β -parvalbumino izoformos (Gad m 1.0101, Gad m 1.0102, Gad m 1.0201 ir Gad m 1.0202), kurios buvo aprašytos keliuose tyrimuose (Van Do et al., 2003; Ma et al., 2008). Rekombinantinio MBP-Gad m 1 sintezei mes pasirinkome Gad m 1.0101 baltymą koduojančią DNR seką, kadangi būtent šio alergeno aminorūgščių seka labiausiai sutapo su Cyp c 1 baltymo seka (81,65 % homologija). Tuo tarpu su Gad m 1.0102 izoforma Cyp c 1 baltymo seka sutapo 80,73 %, su Gad m 1.0201 80,73 %, o su Gad m 1.0202 tik 79,82 %. Atlikus netiesioginę IFA ir taškinį blotą nustatyta, kad MAK 7B2 ir 2C1 labai silpnai sąveikauja su MBP-Gad m 1 baltymu (OT vertė < 0,5) ir nereaguoja su šiuo alergenu analizuojant jų sąveiką imunobloto metodu. Kaip jau buvo minėta, šie MAK buvo sukurti prieš natūralų atlantinės menkės β -parvalbuminą, kuris buvo paruoštas iš žuvies raumens. Šiame natūraliame parvalbumine gali būti kelių β -parvalbumino izoformų mišinys, kadangi gamintojas nenurodė tikslios alergeno izoformos. Tikėtina, kad MAK 7B2 ir 2C1 galėjo susidaryti prieš tam tikrą atlantinės menkės β -parvalbumino izoformą ir dėl to stebima silpnesnė sąveika su rekombinantiniu MBP-Gad m 1 baltymu.

Šiame darbe susintetinti rekombinantiniai alergenai yra sulieti su MBP, todėl imunobloto metodu buvo tirta, ar MAK atpažįsta alergeną, kuris atskeltas nuo MBP baltymo TEV proteaze (8 priedas). Eksperimentui pasirinkome keletą alergenų, kurie buvo atpažinti visų MAK ir keletą, su kuriais reagavo tik dalis antikūnų. MAK 7B2, 2C1, 16B3 ir 3F6 pasižymėjo tokiu pat kryžminiu reaktyvumu, kaip ir aukščiau atlikto eksperimento metu, ir reagavo tiek su MBP turinčiais, tiek ir atskeltais baltymais. Vienintelis MAK 18H3 nereagavo su atskeltu Clu h 1, tačiau jis gana silpnai reagavo ir su MBP-Clu h 1 (OT < 0,5). Šiuo eksperimentu parodėme, kad pavyko susintetinti tinkamos struktūros rekombinantinius alergenų, kurie paveikus TEV proteaze ir atskelus nuo MBP baltymo yra atpažįstami MAK.

Nors žuvų α -parvalbuminai laikomi nealergeniškais baltymais, tačiau buvo nustatyta atvejų, kuomet pacientai buvo įsijautrinę tam tikroms kremzlinėms žuvims (Kalic et al., 2019). Vieno tyrimo metu buvo tiriama žuvims alergiškų pacientų serume esančių IgE sąveika su α -parvalbuminiais, išskirtais iš dygliuotosios rajos ir antarktinio kiauniarykliaus. Nustatyta, kad keli kaulinėms žuvims alergiški pacientai buvo įsijautrinę ir žuvų α -parvalbuminams (Sharp et al., 2015). Mes parodėme, kad ne tik pacientų serumo mėginiai sąveikavo su rekombinantiniu rykliaus α -parvalbuminu (MBP-Shark), bet ir visi sukurtieji MAK kryžmiškai reagavo su žuvies α -parvalbuminu. Palyginę šio

parvalbumino aminorūgščių seką su Gad m 1 ir Cyp c 1 baltymų aminorūgščių sekomis nustatėme, kad sekų homologija atitinkamai siekia tik 47 % ir 51 %. Tai rodo, kad MAk atpažįsta žuvų α -parvalbuminų sritis, kurios reikšmingai sutampa su β -parvalbuminų sritimis, dėl to stebimas kryžminis reaktyvumas.

Apibendrinus gautus rezultatus, galima teigti, kad sukurtieji MAk pasižymi plačiu kryžminiu reaktyvumu, nes atpažįsta skirtingų žuvų rūšių β -parvalbuminus ir sąveikauja su Kaliforninio šakadančio ryklio α -parvalbuminu.

3.6. Monokloninių antikūnų sąveika su žuvies ekstraktais

Nustačius, kad MAk prieš žuvų parvalbuminus geba atpažinti ir sąveikauti su rekombinantiniais alergenais, buvo svarbu įvertinti jų galimybę aptikti ir natūralius žuvies alergenus skirtingų žuvų rūšių ekstraktuose. Aprašyta keletas tyrimų, kuriuose paruošti įvairių kremzlinių ir kaulinių žuvų rūšių ekstraktai buvo analizuojami su žuvų parvalbuminams specifiniais antikūnais (Sharp et al., 2015; Faeste and Plassen, 2008). Šiame darbe MAk sąveiką tyrėme su įsigytais komerciniais paprastojo karpio, atlantinės menkės, atlantinės lašišos ir atlantinės silkės ekstraktais (DTS, Vokietija), bei su laboratorijos sąlygomis paruoštais 18 skirtingų žuvų rūšių ekstraktais netiesioginės IFA, imunobloto ir taškinio bloto metodais (3.4 lentelė).

Atlikus šiuos tyrimus, nustatėme, kad visi antikūnai atpažino β -parvalbuminus analizuotuose žuvų ekstraktuose taikant skirtingus metodus (3.8 ir 3.9 pav., 9–11 priedai).

Imunobloto atveju buvo stebimos 10–12 kDa dydžio baltymų juostos, kurios sutampa su pilno ilgio β -parvalbuminiais. Tik MAk 3F6 reagavo su visais ekstraktais. MAk 7B2 ir 2C1 neatpažino alergeno stintos ekstrakto, MAk 18H3 ir 16B3 – ešerio ir pūgžlio ekstraktuose. Be to, MAk 2C1 ir 18H3 nesąveikavo su parvalbuminiais komerciniame lašišos, bei laboratorijos sąlygomis paruoštuose lašišos ir upėtakio, o MAk 18H3 dar ir atlantinės argentinės ekstrakto. Siekiant išvengti galimų nespecifinių MAk reakcijų ir įrodyti, kad antikūnai sąveikauja tik su žuvų ekstraktuose esančiais β -parvalbuminiais, ištyrėme MAk 19C19, sukurto prieš rekombantinį MBP baltymą, sąveiką su visais alergenų ekstraktais. MAk 19C19 nereagavo su jokių ekstraktu. Tai patvirtina imunobloto specifiškumą (10 priedas, E dalis).

3.4 lentelė. MAK sąveika su įvairių žuvų rūšių ekstraktais IFA, imunobloto (IB) ir taškinio bloto (TB) metodais.

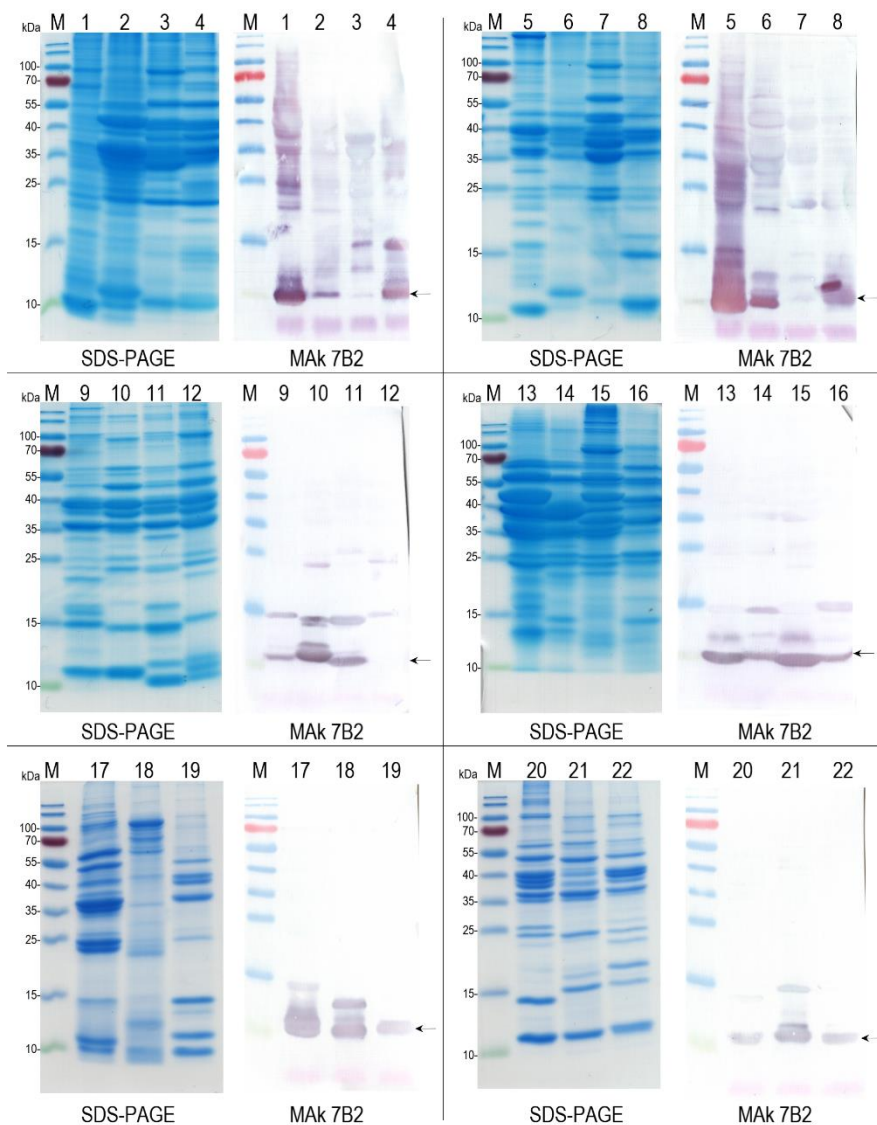
Būrys	Alergenų ekstraktai	MAK 7B2			MAK 2C1			MAK 18H3			MAK 16B3			MAK 3F6			MAK 6E4			MAK 14F3	
		IFA	IB	TB	IFA	IB	TB	IFA	IB	TB	IFA	IB	TB	IFA	IB	TB	IFA	IB	TB	IFA	TB
<i>Cypriniiformes</i>	Paprastojo karpio (DST)	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+	✓	✓		✓
<i>Cypriniiformes</i>	Paprastojo karpio	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+	✓	✓		
<i>Cypriniiformes</i>	Paprastosios kuojos	+++	✓	✓	+++	✓	✓	++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+	✓	✓		✓
<i>Cypriniiformes</i>	Paprastojo karšio	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	++	✓	✓		✓
<i>Clupeiformes</i>	Atlantinės silkės (DST)	++	✓	✓	++	✓	✓	+	✓	✓	++	✓	✓	+++	✓	✓	+	✓	✓		✓
<i>Clupeiformes</i>	Atlantinės silkės	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+	✓	✓	+	✓		+++	✓	✓	+	✓	✓		✓
<i>Salmoniformes</i>	Atlantinės lašišos (DST)	+	✓	✓	+		✓	+		✓	+	✓	✓	++	✓	✓	++	✓	✓	+	✓
<i>Salmoniformes</i>	Atlantinės lašišos	+	✓	✓	+		✓			✓	+	✓	✓	+++	✓	✓	+	✓	✓		
<i>Salmoniformes</i>	Vaivorykštinio upėtakio	+	✓	✓	+		✓			✓	+	✓	✓	+++	✓	✓	+	✓	✓		✓
<i>Gadiformes</i>	Atlantinės menkės (DST)	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	++	✓	✓	+	✓	✓		✓
<i>Gadiformes</i>	Ledjūrio menkės	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓		✓	✓		✓
<i>Gadiformes</i>	Aliaskinės rudagalvės menkės	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓		✓	✓		✓

<i>Gadiformes</i>	Argentīnīnēs jūrinēs lydekos	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓		✓	✓		✓
<i>Gadiformes</i>	Juodadēmēs menkēs	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+		✓		✓
<i>Gadiformes</i>	Didžiagalvēs menkēs	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	++	✓	✓	+	✓	✓		✓
<i>Esociformes</i>	Europīnēs lydekos	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓		✓	✓		
<i>Osmeriformes</i>	Europīnē stintos	+		✓	+		✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	++	✓			✓
<i>Osmeriformes</i>	Atlantīnēs argentinās	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+		✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+	✓	✓		✓
<i>Perciformes</i>	Paprastojo europīnio ešerīo	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+		✓	+		✓	+++	✓	✓		✓	✓		✓
<i>Perciformes</i>	Paprastojo pūgžlio	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+		✓	+		✓	+++	✓	✓	+	✓	✓		✓
<i>Perciformes</i>	Auksaspalvēs dorados	+++	✓	✓	+++	✓	✓	++	✓	✓	+++	✓	✓	++	✓	✓		✓	✓		✓
<i>Pleuonectiformes</i>	Gelsvapelekēs plekšnēs	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+	✓	✓	++	✓	✓		✓			✓	✓		✓

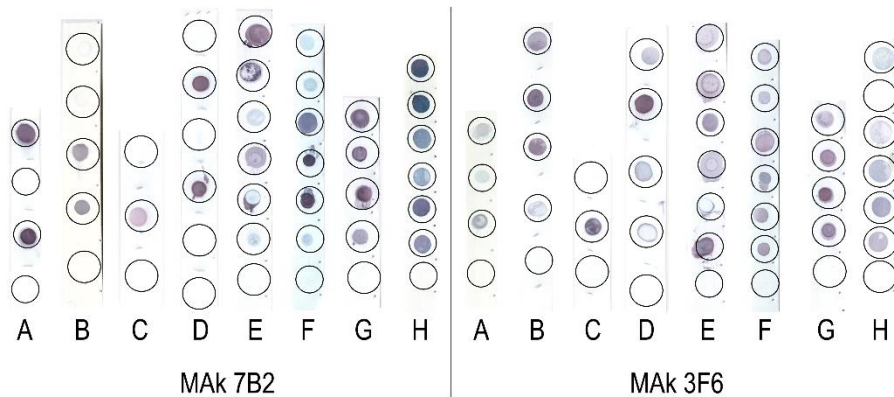
„✓” – antikūnas reagavo su antigenu; tuščias langelis – antikūnas neregavo.

IFA reaktyvumas: (+++) OT₄₅₀ > 1,5; (++) OT₄₅₀ 0,5–1,5; (+) OT₄₅₀ < 0,5.

DST – komercinis ekstraktas, kuris buvo įsigytas iš DST (Vokietijos). Kiti ekstraktai buvo paruošti laboratorijoje.



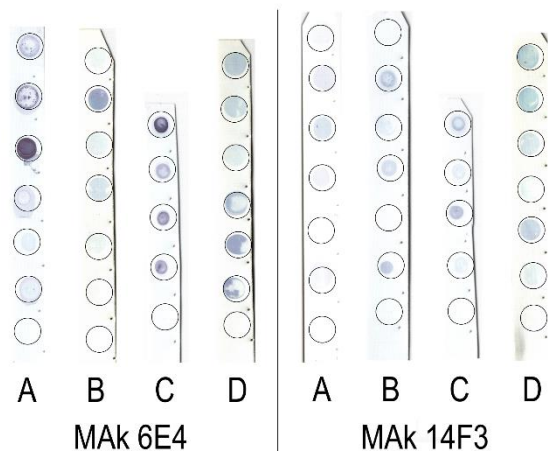
3.8 pav. MAK 7B2 sąveikos su skirtingų žuvų rūšių ekstraktais analizė imunobloto metodu. Kairėje – SDS-PAGE; dešinėje – imunoblotas su MAK 7B2. M – baltymų molekulinio svorio standartas (Thermo Fisher Scientific); 1 – paprastojo karpio (DST); 2 – atlantinės silkės (DST); 3 – atlantinės laišišos (DST); 4 – atlantinės menkės (DST); 5 – paprastojo karpio; 6 – atlantinės silkės; 7 – atlantinės laišišos; 8 – vaivorykštinio upėtakio; 9 – ledjūrio menkės; 10 – aliaskinės rudagalvės menkės; 11 – europinės lydekos; 12 – europinės stintos; 13 – paprastosios kuojos; 14 – paprastojo karšio; 15 – paprastojo europinio ešerio; 16 – paprastojo pūgžlio; 17 – auksaspalvės dorados; 18 – gelsvapelekės plekšnės; 19 – argentininės jūrinės lydekos; 20 – atlantinės argentinės; 21 – juodadėmės menkės; 22 – didžiagalvės menkės. K – komercinis ekstraktas, o kiti yra paruošti laboratorijoje. Rodykle nurodomas β -parvalbuminas.



3.9 pav. MAK 7B2 ir 3F6 sąveikos su skirtingais rekombinantiniais baltymais (A–D) ir alergenų ekstraktais (E–H) analizė taškinio bloto metodu. *A juotelė:* MBP-Cyp c 1; MBP-Sal s 1; MBP-Gal d 8; MBP. *B juotelė:* MBP-Gad m 1; MBP-Clu h 1; MBP-Pan h 1; MBP-Thu a 1; MBP. *C juotelė:* MBP-Eso lu 1; MBP-Lep w 1; MBP. *D juotelė:* MBP-Onc m 1; MBP-Sco s 1; MBP-Seb m 1; MBP-Shark; MBP. *E juotelė:* paprastojo karpio (DST); atlantinės silkės (DST); atlantinės lašišos (DST); atlantinės menkės (DST); paprastojo karpio; atlantinės silkės; MBP. *F juotelė:* atlantinės lašišos; vaivorykštinio upėtakio; ledjūrio menkės; aliaškinės rudagalvės menkės; MBP. *G juotelė:* europinės lydekos; europinė stintos; paprastosios kuojos; paprastojo europinio ešerio; paprastojo karšio; paprastojo pūgžlio; MBP. *H juotelė:* auksaspalvės dorados; gelsvapelekės plekšnės; argentininės jūrų lydekos; atlantinės argentinės; juodadėmės menkės; didžiagalvės menkės; MBP. DST – komercinis ekstraktas, kiti yra paruošti laboratorijoje.

Šis tyrimas parodė, kad MAK 3F6 yra tinkamiausias aptikti parvalbuminus lašišinių (lot. *Salmoniformes*) ekstraktuose. Tuo tarpu visi MAK prieš nGad m 1, išskyrus MAK 18H3, stipriai sąveikauja su karpžuvių (lot. *Cypriniiformes*) ir plekšniažuvių (lot. *Pleuronectiformes*) būriams priklausančių žuvų ekstraktais. Taip pat pastebime, kad MAK 7B2, 2C1 ir 3F6 galėtų būti pritaikyti tiriant ešeržuvių (lot. *Perciformes*), o MAK 16B3, kartu su MAK 3F6, stintžuvių (lot. *Osmeriformes*) ekstraktams. Taigi, sukurtieji MAK pasižymi skirtingu kryžminiu reaktyvumu ir geba atpažinti natūralų parvalbuminą įvairių žuvų rūšių ekstraktuose.

Taip pat siekėme įvertinti, ar MAK prieš karpio β -enolazę gali atpažinti karpio ir kitų žuvų rūšių ekstraktuose esančią β -enolazę taikant tuos pačius metodus. Netiesioginės IFA metodu nustatėme, kad abu MAK prieš karpio β -enolazę kryžmiškai reagavo su kitų žuvų rūšių ekstraktais: MAK 14F3 sąveikavo su lašišos β -enolaze, o MAK 6E4 aptiko β -enolazę daugumoje tirtų ekstraktų (3.4 lentelė, 3.10 ir 3.11 pav., 9 priedas).



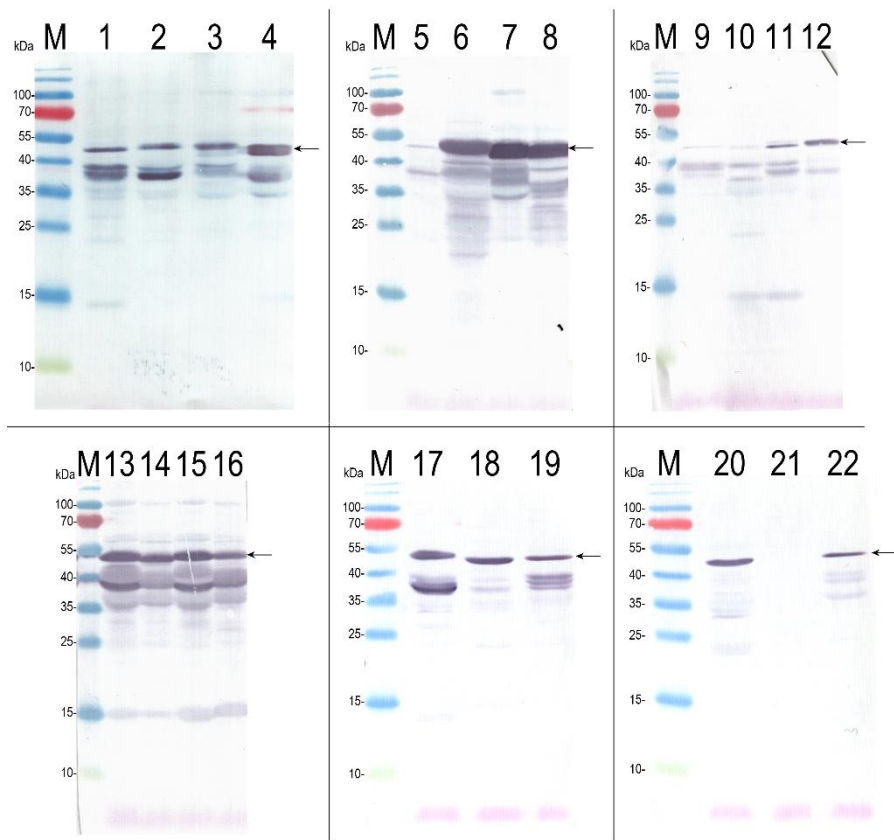
3.10 pav. MAK prieš paprastojo karpio β -enolazę sąveikos su skirtingais alergenu ekstraktais analizė taškinio bloto metodu. *A juotelė*: paprastojo karpio (DST); atlantinės silkės (DST); atlantinės lašišos (DST); atlantinės menkės (DST); paprastojo karpio; atlantinės silkės; MBP. *B juostelė*: atlantinės lašišos; vaivorykštinio upėtakio; ledjūrio menkės; aliaskinės rudagalvės menkės; europinės lydekos; europinė stintos; MBP. *C juostelė*: paprastosios kuojos; paprastojo europinio ešerio; paprastojo karšio; paprastojo pūgžlio; MBP. *D juostelė*: auksaspalvės dorados; gelsvapelekės plekšnės; argentininės jūrų lydekos; atlantinės argentinios; juodadėmės menkės; didžiagalvės menkės; MBP.

Imunobloto rezultatai patvirtino, kad MAK 6E4 visuose analizuotuose ekstraktuose, išskyrus juodadėmės menkės, atpažino ir sąveikavo su pilno ilgio β -enolaze ir su dalinai degradavusiomis jos formomis (3.11 pav.). Šie rezultatai rodo, kad skirtingų žuvų rūšių β -enolazės turi bendrus epitopus, kuriuos atpažįsta šis MAK.

Tiriant MAK sąveikas su įvairiais mėginiais, svarbu taikyti įvairius metodus. Taikydami taškinio bloto metodą mes galėjome įvertinti, ar MAK 14F3 pasižymi kryžminiu reaktyvumu ir reaguoja su žuvų ekstraktais. Iš gautų taškinio bloto rezultatų nustatyta, kad šis antikūnas atpažino β -enolazę visuose tirtuose ekstraktuose, išskyrus laboratorijos sąlygose paruoštų karpio, lašišos ir lydekos ekstraktus. Tačiau IFA metode parodėme, kad MAK 14F3 aptiko β -enolazę komerciniame lašišos ekstrakto. Tikėtina, kad laboratorijoje paruoštuose ekstraktuose yra nepakankamas alergeno kiekis, tad būtų tikslinga optimizuoti šių ekstraktų paruošimo protokolą.

Ankstesni tyrimai rodo, kad tarp žuvų β -enolazių gali būti stebimos kryžminės reakcijos (Tomm et al., 2013; Kuehn et al., 2013). Mūsų gauti rezultatai patvirtino, kad sukurtieji MAK prieš paprastojo karpio β -enolazę gali sąveikauti su skirtingų žuvų rūšių β -enolazėmis. Kadangi MAK pasižymi

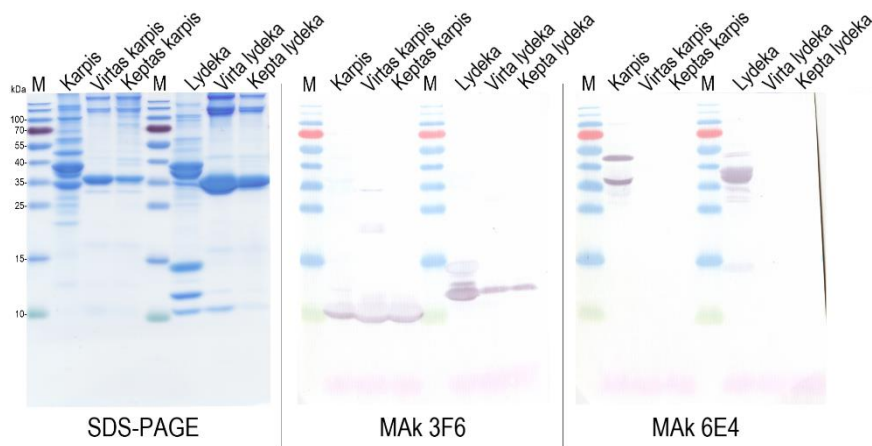
kryžminių reaktyvumu, jie gali būti pritaikyti β -enolazių nustatymui žuvų ekstraktuose ir taip pagerinti ekstraktų kokybę.



3.11 pav. MAk 6E4 sąveikos su skirtingų žuvų rūšių ekstraktais analizė imunobloto metodu. M – baltymų molekulinio svorio standartas (Thermo Fisher Scientific); 1 – paprastojo karpio (DST); 2 – atlantinės silkės (DST); 3 – atlantinės lašišos (DST); 4 – atlantinės menkės (DST); 5 – paprastojo karpio; 6 – atlantinės silkės; 7 – atlantinės lašišos; 8 – vaivorykštinio upėtakio; 9 – ledjūrio menkės; 10 – aliaskinės rudagalvės menkės; 11 – europinės lydekos; 12 – europinės stintos; 13 – paprastosios kuojos; 14 – paprastojo karšio; 15 – paprastojo europinio ešerio; 16 – paprastojo pūgžlio; 17 – auksaspalvės dorados; 18 – gelsvapelekės plekšnės; 19 – argentininės jūrinės lydekos; 20 – atlantinės argentinios; 21 – juodadėmės menkės; 22 – didžiagalvės menkės. DST – komercinis ekstraktas, o kiti yra paruošti laboratorijoje. Rodykle nurodoma β -enolazė.

Kadangi sukurtieji MAk atpažįsta alergenus žuvų ekstraktuose, paruoštuose iš termiškai neapdorotos (žalios) žuvies, buvo siekiama įvertinti, ar išvirus ir iškepus žuvį, MAk gebės joje aptikti alergenus. Šiam darbui buvo pasirinktos dvi žuvų rūšys: paprastasis karpis ir argentininė jūrinė lydeka.

Ekstraktai buvo paruošti iš žalios, virtos ir keptos žuvis. MAk 3F6 ir 6E4 sąveika su šiais ekstraktais buvo ištirta imunobloto metodu (3.12 pav.).



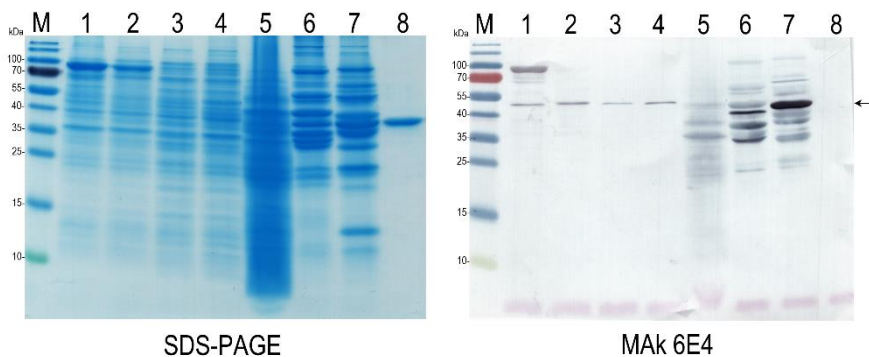
3.12 pav. MAk 3F6 ir 6E4 sąveikos su paprastojo karpio ir argentininės jūrinės lydekos ekstraktais, paruoštais iš žalios, virtos ir keptos žuvis, analizė imunobloto metodu. Kairėje – SDS-PAGE; dešinėje – imunoblotas su MAk 3F6 ir 6E4. M – baltymų molekulinio svorio standartas (Thermo Fisher Scientific).

MAk 3F6 aptiko β -parvalbuminus visuose analizuotuose ekstraktuose, o MAk 6E4 reagavo tik su β -enolaze, esančia termiškai neapdorotuose žuvų ekstraktuose. Literatūroje β -parvalbuminai aprašomi kaip termostabilūs, o β -enolazės – kaip termolabilūs žuvis alergeni (Dijkema et al., 2022; Klueber et al., 2019). Kuehn ir jos kolegų atliktame tyrime buvo parodyta, kad išgrynintos menkės ir tuno β -enolazės yra jautrios terminiam apdorojimui (kaitinimui 90 °C temperatūroje, > 1 min.) (Kuehn et al., 2013). Be to, terminis maisto apdorojimas (pvz., konservavimas, virimas, kepimas) gali lemti jame esančių alergenų struktūros pokyčius ir taip sunaikinti arba suformuoti naujus epitopus (Dasanayaka et al., 2020). Mūsų gauti rezultatai patvirtino, kad tiek keptoje, tiek virtoje žuvyje β -enolazė nėra aptinkama, kai tuo tarpu β -parvalbuminas yra nustatomas.

3.7. Monokloninių antikūnų sąveika su kitų organizmų tiksliniais baltymais

Enolazė aptinkama ne tik stuburiniuose gyvūnuose, bet ir bakterijose, augaluose, grybuose. Palyginus enolazės aminorūgščių seką tarp skirtingų organizmų grupių, nustatyta, kad enolazių panašumas tarp grybų yra $\geq 72\%$, tarp augalų $\geq 86\%$, o tarp gyvūnų $\geq 81\%$ (Morales-Amparano et al., 2021).

Anksčiau atliktais tyrimais parodyta, kad iš *Candida albicans* mielių išskirtos enolazės aminorūgščių seka panaši į *Saccharomyces cerevisiae* enolazės. Taip pat parodyta, kad rekombinantinei *Hevea* latekso enolazei (rHEV b 9) įsijautrinusių pacientų serume esantys IgE sąveikavo ir su rekombinantinėmis *Cladosporium herbarum* grybelio (rCla h 6) ir *Alternaria alternata* grybo (rAlt a 6) enolazėmis (Ito et al., 1995; Wagner et al., 2000). Kadangi skirtingų organizmų enolazės pasižymi didele aminorūgščių sekų homologija, buvo nuspręsta ištirti MAK 6E4 sąveiką su *E. coli* Tuner (DE3) ir DH10B bakterijų lizatais, rekombinantine *Alternaria alternata* enolaze, sulieta su MBP (MBP-Alt a 6), kepimo mielių tirpalu ir laboratorijos sąlygomis paruoštais vištienos ir kiaulienos ekstraktais imunobloto metodu (3.13 pav.).



3.13 pav. MAK 6E4 sąveikos su skirtingų organizmų enolazėmis analizė imunobloto metodu. Kairėje – SDS-PAGE; dešinėje – imunoblotas su MAK 6E4. M – baltymų molekulinio svorio standartas (Thermo Fisher Scientific); 1 – MBP-Cyp c 2 baltymas *E. coli* Tuner (DE3) bakterijų lizate; 2 – MBP-Alt a 6 baltymas *E. coli* Tuner (DE3) bakterijų lizate; 3 – *E. coli* DH10B bakterijų lizatas; 4 – *E. coli* Tuner (DE3) bakterijų lizatas; 5 – kepimo mielių tirpalas; 6 – vištienos ekstraktas; 7 – kiaulienos ekstraktas; 8 – rekombinantinis MBP baltymas. Rodykle nurodyta enolazių padėtis išanalizuotuose mėginiuose.

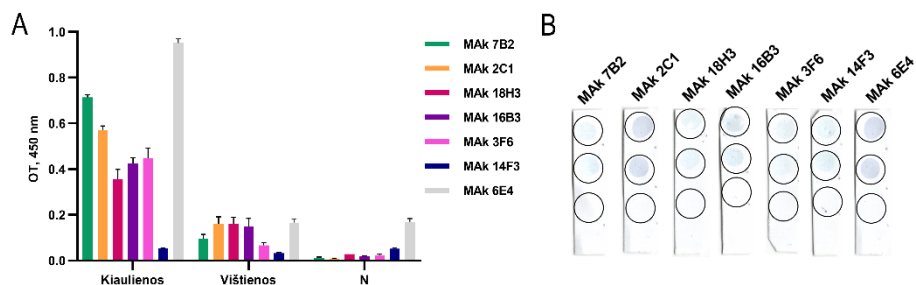
Siekiant išvengti galimų nespecifinių reakcijų, pasirinkti mėginiai buvo analizuojami ir su MAK 19C19 prieš MBP (neigiama kontrolė), kad įrodytume, jog MAK 6E4 sąveikauja tik su enolaze (12 priedas). Kaip teigiamą kontrolę naudojome MBP-Cyp c 2 baltymą *E. coli* Tuner (DE3) bakterijų lizate. Nustatyta, kad MAK 6E4 sąveikauja su visuose *E. coli* bakterijų lizatuose esančiu tiksliniu baltymu, kurio molekulinė masė ~ 46 kDa. Manoma, kad tai yra *E. coli* bakterijų enolazė (Spring and Wold, 1971). Taip pat MAK 6E4 atpažino tokio pat dydžio (~ 46 kDa) tikslinį baltymą paruoštame mielių

tirpale, bei vištienos ir kiaulienos ekstraktuose, kurie atitiktų *Saccharomyces cerevisiae* enolazę, bei vištos ir kiaulės β -enolazę (3.13 pav.).

Kontrolinis MAK 19C19 reagavo tik su rekombinantinius MBP-Cyp c 2, MBP-Alt a 6 ir MBP baltymais. Šis antikūnas taip pat atpažino *E. coli* lizatuose esantį natūralų *E. coli* bakterijose aptikamą MBP baltymą, tačiau nereagavo nei su mielių tirpalu, nei su paruoštais gyvūnų audinių ekstraktais, kas patvirtina eksperimento specifiskumą. *E. coli* bakterijose MBP baltymas dalyvauja maltozės ir maltodekstrinų pernešime (Costa et al., 2014).

Palyginus Cyp c 2 aminorūgščių seką su *E. coli* (P0A6P9, UniProtKB) ir *Saccharomyces cerevisiae* (P00924, UniProtKB) enolazių sekomis, buvo nustatyta 54 % ir 65 % sekų homologija. Tikėtina, kad MAK 6E4 atpažįsta konservatyvius antigeno regionus, būdingus ir šių organizmų enolazėms. Taip pat tarpusavyje palyginome Cyp c 2 ir *Alternaria alternata* grybo (Alt a 6) enolazių aminorūgščių sekas. Nors sekos tarpusavyje sutampa 64 %, tačiau tam tikrų aminorūgščių nesutapimas galėjo lemti, kad MAK 6E4 nesąveikavo su grybo enolaze.

Kadangi MAK 6E4 reagavo su vištienos ekstrakto esančiu tiksliniu baltymu, pagal molekulinę masę (~ 47 kDa) tai galėtų būti vištos β -enolazė (Gal d 9). Palyginus Cyp c 2 ir Gal d 9 aminorūgščių sekas nustatyta, kad sekos tarpusavyje sutampa 83 %. Literatūroje yra aprašytas kitas kryžminis reaktyvumas, kuris buvo stebimas tarp Gal d 9 ir atlantinės menkės β -enolazės (Gad m 2) (Kuehn et al., 2016). Be to, įvertinome MAK 6E4 ir 14F3 sąveiką su laboratorijos sąlygomis paruoštais vištienos ir kiaulienos ekstraktais netiesioginės IFA ir taškinio bloto metodais (3.14 pav.).

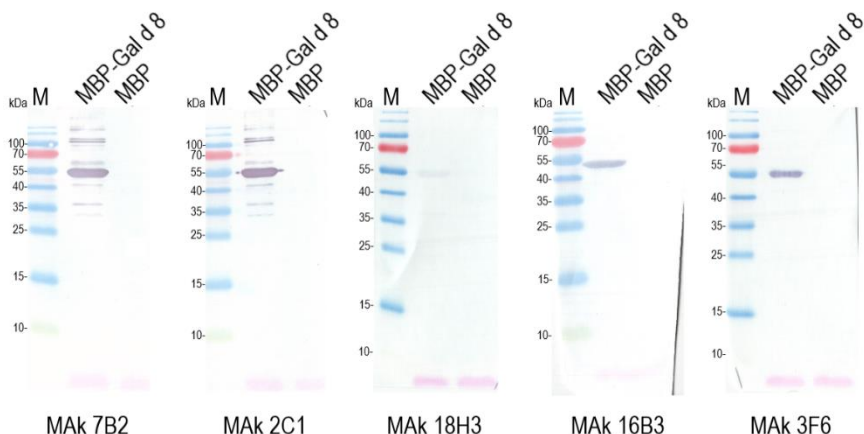


3.14 pav. MAK sąveikos su vištienos ir kiaulienos ekstraktais analizė netiesioginės IFA (A) ir taškinio bloto (B) metodais. A dalyje matavimai atlikti su pakartojimais. N – IFA plokštelė padengta tik imobilizacijos buferiniu tirpalu. B dalyje juostelė: kiaulienos ekstraktas; vištienos ekstraktas; MBP baltymas.

Abu MAK aptiko enolazes taškinio bloto metodu, tačiau tik MAK 6E4 reagavo su kiaulienos ekstraktu IFA metodu. Remiantis mūsų gautais

rezultatais ir anksčiau atliktu tyrimu galime teigti, kad Gal d 9 turi bendrus epitopus su žuvų β -enolazėmis. Nors šiuo metu nėra informacijos apie kiaulės β -enolazės alergeniškumą, tačiau šio darbo metu gauti rezultatai parodė, kad tikslinga išsamiau iširti šį baltymą ir jo galimą panašumą į žuvies ir vištos β -enolazes.

Sukurtieji MAk prieš žuvų parvalbuminus gali aptikti parvalbuminus analizuojamuose įvairių žuvų ekstraktuose, tačiau jų sąveikos su kitų gyvūnų parvalbuminiais nėra žinomos. Antikūnų kryžminis reaktyvumas su žuvų ir kitų gyvūnų (varlės, krokodilo ir vištienos) parvalbuminiais aptartas keliuose ankstesniuose tyrimuose (Kawase et al., 2001; Gajewski and Hsieh, 2009; Chen and Hsieh, 2021). Viename jų nustatyta, kad žuviai alergiškų pacientų serumo mėginiuose esantys IgE reagavo su menkės, krokodilo, vištienos ir varlės ekstraktuose esančiais parvalbuminiais (Haroun-Díaz et al., 2021). Kitame tyrime aprašoma, kad buvo nustatyti trys nauji vištienos alergenai (parvalbuminas, aldolazė ir enolazė), kurie buvo atpažinti pacientų, kuriems buvo nustatyta alergija žuviai ir vištienai, kraujo serumo mėginių (Kuehn et al., 2016). Šiame darbe tyrėme kryžminį reaktyvumą tarp žuvies ir vištos parvalbuminų ir parodėme, kad žuviai alergiškų pacientų kraujo serumo mėginiai taip pat sąveikauja su rekombinantiniu vištienos parvalbuminu, sulietu su MBP (MBP-Gal d 8). Netiesioginės IFA, imunobloto ir taškinio bloto metodais ištyrėme sukurtų MAk prieš žuvų parvalbuminus sąveiką su MBP-Gal d 8 ir su laboratorijos sąlygomis paruoštais vištienos ir kiaulienos ekstraktais (3.9, 3.14 ir 3.15 pav., 6 priedas).



3.15 pav. MAk prieš žuvų parvalbuminus sąveikos su rekombinantiniu vištos parvalbuminu, sulietu su MBP (MBP-Gal d 8), analizė imunobloto metodu. M – baltymų molekulinio svorio standartas (Thermo Fisher Scientific Baltics).

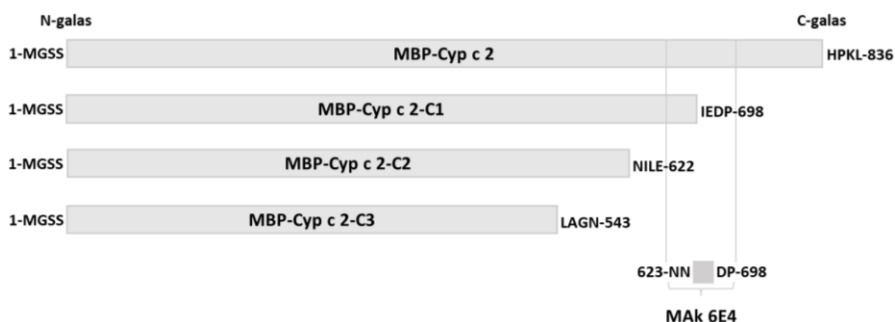
Visi sukurtieji MAK sąveikavo su Gal d 8, nors šio alergeno aminorūgščių sekos homologija su Cyp c 1 alergeno seka yra tik 56 %, su Gad m 1 – 54 %.

Ankstesniame tyrime buvo parodyta, kad sukurti triušio PAK prieš baltojo baramundžio, atlantinės laišos ir sardinės parvalbminus nesąveikavo su paruoštais vištienos ir kiaulienos ekstraktais, todėl šie ekstraktai tame tyrime buvo naudojami kaip neigiamos kontrolės (Sharp et al., 2015). Tuo tarpu mūsų sukurti MAK sąveikavo su ekstraktais netiesioginės IFA ir taškinio bloto metodais, tačiau neaptiko parvalbminų denatūruotuose ekstraktuose imunobloto metodu. Tikėtina, kad ekstraktuose yra per mažas parvalbminų kiekis, kad jie būtų aptikti su MAK.

Apibendrinus gautus rezultatus, galima teigti, kad MAK prieš žuvų parvalbminus atpažįsta konservatyvius alergenu regionus, būdingus tiek α -, tiek β - parvalbminams, ir gali būti pritaikyti parvalbminų nustatymui įvairių žuvų ir kitų gyvūnų ekstraktuose.

3.8. Monokloninių antikūnų epitopų analizė

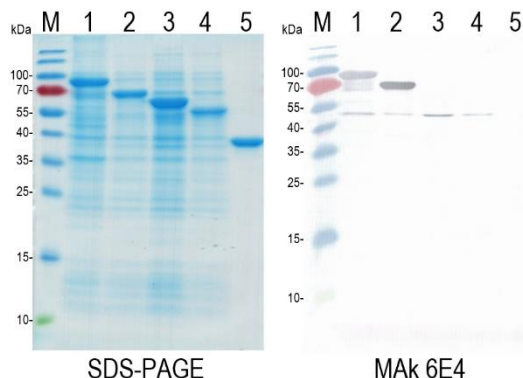
Vienas iš svarbių MAK apibūdinimo etapų yra jų epitopų nustatymas. Žinant antigeno sritį, kurią atpažįsta ir su kuria sąveikauja sukurtieji antikūnai, galima įvertinti jų taikymo galimybes. Atliekant MAK epitopų analizę, pirmiausia buvo sukonstruoti trys persiklojantys β -enolazės fragmentai, sulieti su MBP baltymu: MBP-Cyp c 2-C1 (1–698 aminorūgštis), MBP-Cyp c 2-C2 (1–622 aminorūgštis) ir MBP-Cyp c 2-C3 (1–543 aminorūgštis) (3.16 pav.).



3.16 pav. MAK 6E4 epitopo lokalizacija naudojant persidengiančius MBP-Cyp c 2 fragmentus: MBP-Cyp c 2-C1 (1–698 aminorūgštis), MBP-Cyp c 2-C2 (1–622 aminorūgštis) ir MBP-Cyp c 2-C3 (1–543 aminorūgštis). Pažymėta sritis, kurią atpažįsta MAK 6E4 (623–698 aminorūgštis).

MBP-Cyp c 2-C3 fragmentas buvo susintetintas kaip ir rekombinantiniai parvalbminai. Tuo tarpu MBP-Cyp c 2-C1 ir MBP-Cyp c 2-C2 fragmentų kūrimui, susintetintos DNR sekos (2.3 lentelė) buvo įterptos į pET28-MBP-

TEV-Cypc 2 vektorių, prieš tai įkirptą su BamHI arba su XhoI RE. Sukonstruotais naujais vektoriais buvo transformuotos *E. coli* Tuner (DE3) kamieno bakterijos. Susintetinti MBP-Cyp c 2 fragmentai buvo tirti baltymų elektroforezės metodu, analizuojant bakterijų lizatus prieš ir po indukcijos, ir tada imunobloto metu tiriant lizatus su MAk 6E4 terpė. Nustatyta, kad MAk 6E4 sąveikavo su pilno ilgio rekombinantiniu MBP-Cyp c 2 (91,7 kDa) ir su MBP-Cyp c 2-C1 (76,3 kDa) baltymais (3.17 pav.).



3.17 pav. MAk 6E4 sąveikos su rekombinantinius MBP-Cyp c 2 ir jo fragmentus sintetinančiais *E. coli* bakterijų lizatais analizė imunobloto metodu. Kairėje: SDS-PAGE; dešinėje imunoblotas su MAk 6E4. M – baltymų molekulinio svorio standartas (Thermo Fisher Scientific); 1 – MBP-Cyp c 2 baltymas *E. coli* Tuner (DE3) bakterijų lizate; 2 – MBP-Cyp c 2 -C1 baltymas *E. coli* Tuner (DE3) bakterijų lizate; 3 – MBP-Cyp c 2-C2 baltymas *E. coli* Tuner (DE3) bakterijų lizate; 4 – MBP-Cyp c 2-C3 baltymas *E. coli* Tuner (DE3) bakterijų lizate; 5 – išgrynintas MBP baltymas (neigiama kontrolė).

Palyginus sukonstruotų fragmentų aminorūgščių sekas, buvo nustatyta, kad MAk 6E4 atpažįsta 76 aminorūgščių ilgio fragmentą, esantį β -enolazės C-gale, t. y., seką nuo 623 iki 698 aminorūgšties (623-NNEALELLKSAIEKAGYDPKIIIGMDVAASEFFKNGKYDLDFKSPDDPKRHITGDQLGDLYKSFKNYPVQSIEDP-698) (3.16 pav.).

Paprastojo karpio β -enolazės sritis (623–698 aminorūgščių seka), kurią atpažįsta MAk 6E4, buvo palyginta su Uniprot duomenų bazėje esančiomis kitų žuvų rūšių (atlantinės menkės, atlantinės lašišos ir siaminės pangasijos), bei vištos ir kiaulės (Q1KYT0) β -enolazėmis. Nustatyta atitinkama 91 %, 92 %, 91 %, 70 % ir 84 % sekų homologija (3.18 pav.). Įdomu tai, kad karpio β -enolazės aminorūgščių seka sutampa > 90 % su kitų trijų žuvų rūšių β -enolazių sekomis. Tai gali paaiškinti, kodėl MAk 6E4 aptiko β -enolazės visuose mūsų tirtuose žuvų ekstraktuose. Palyginę karpio β -enolazės sritį su

vištos ir kiaulės β -enolazių sekomis, parodėme, kad irgi stebima didelė aminorūgščių homologija. Tikėtina, kad MAk 6E4 atpažįsta itin konservatyvią β -enolazės sritį, būdinga ir kitų gyvūnų β -enolazėms.

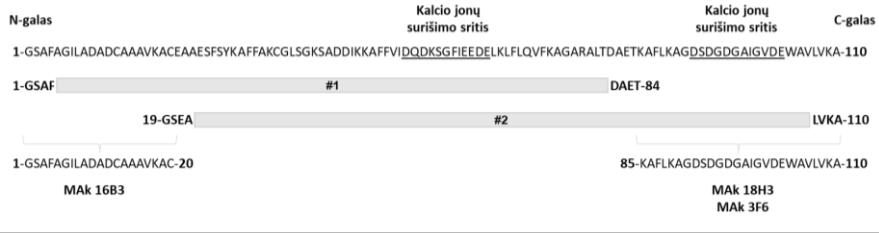
	623																													660												
Cyp c 2	N	N	E	A	L	E	L	L	K	S	A	I	E	K	A	G	Y	P	D	K	I	I	I	G	M	D	V	A	A	S	E	F	F	F	K	N	G	K	Y			
Gad m 2	N	N	E	A	L	E	L	L	K	S	A	I	E	K	A	G	Y	P	D	K	I	I	I	G	M	D	V	A	A	S	E	F	F	F	K	S	G	K	Y			
Sal s 2	N	N	E	A	L	E	L	L	K	T	A	I	E	K	A	G	Y	P	D	K	I	I	I	G	M	D	V	A	A	S	E	F	F	F	K	S	G	K	Y			
Pan h 2	N	N	E	A	L	E	L	L	K	S	A	I	E	K	A	G	Y	A	D	K	I	V	I	G	M	D	V	A	A	S	E	F	F	Y	R	S	G	K	Y			
Gal d 9	N	H	E	A	L	E	L	L	K	A	A	I	A	Q	A	G	Y	T	D	K	V	V	I	G	M	D	V	A	A	S	E	F	F	C	R	D	G	R	Y			
Kiaulės	N	N	E	A	L	E	L	L	K	T	A	I	Q	A	A	G	Y	P	D	K	V	V	I	G	M	D	V	A	A	S	E	F	F	Y	R	N	G	K	Y			
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

	661																													698											
Cyp c 2	D	L	D	F	K	S	P	D	D	P	K	R	H	I	T	G	D	Q	L	G	D	L	Y	K	S	F	I	K	N	Y	P	V	Q	S	I	E	D	P			
Gad m 2	D	L	D	F	K	S	P	D	D	P	K	R	P	I	T	G	E	Q	L	G	D	L	Y	K	x	x	x	x	N	Y	P	V	Q	S	I	E	D	P			
Sal s 2	D	L	D	F	K	S	P	D	D	P	A	R	Y	I	T	G	D	Q	L	G	D	L	Y	K	S	F	I	K	N	Y	P	V	Q	S	I	E	D	P			
Pan h 2	D	L	D	F	K	S	P	D	D	P	K	R	H	I	T	G	D	Q	L	A	D	L	Y	K	S	F	I	K	N	Y	P	V	L	S	I	E	D	P			
Gal d 9	H	L	D	F	K	S	P	P	H	T	K	R	Y	I	T	G	E	Q	L	G	E	I	Y	R	G	F	I	K	D	Y	P	V	V	S	I	E	D	P			
Kiaulės	D	L	D	F	K	S	P	D	D	P	S	R	H	I	T	G	E	K	L	G	E	L	Y	K	S	F	I	K	N	Y	P	V	Q	S	I	E	D	P			
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

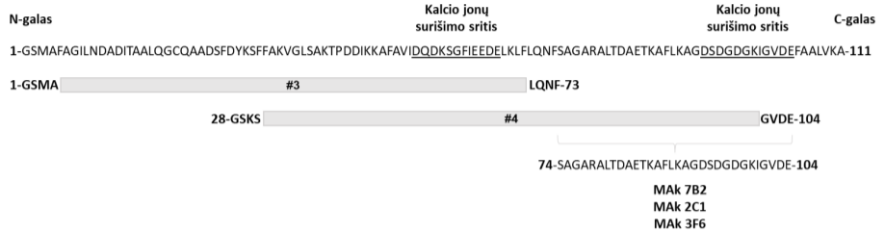
3.18 pav. Paprastojo karpio β -enolazės (Cyp c 2) C-galo sekos (623–698 aminorūgščių) palyginimas su atlantinės menkės (Gad m 2), atlantinės laiššos (Sal s 2), siaminės pangasijos (Pan h 2), vištos (Gal d 9) ir kiaulės (Q1KYT0, Uniprot) β -enolazėmis. „*“ – žymimos tos aminorūgštys, kurios sutampa tarp visų β -enolazių. Kuo tamsesnė violetinė spalva, tuo daugiau aminorūgščių sutampa tarp skirtingų β -enolazių.

MAk, sukurtų prieš žuvų parvalbuminus, epitopų lokalizacijai buvo sukonstruoti du persiklojantys Gad m 1 fragmentai, sulieti su MBP baltymu (#1 fragmentas, 1–84 aminorūgštis; #2 fragmentas, 21–110 aminorūgštis) ir du persiklojantys Cyp c 1 fragmentai, taip pat sulieti su MBP baltymu (#3 fragmentas, 1–73 aminorūgštis; #4 fragmentas, 30–104 aminorūgštis) (3.19 pav.). Visi tikslinių baltymų fragmentai buvo susintetinti *E. coli* Tuner (DE3) kamieno bakterijose. Paruošti bakterijų lizatai buvo išanalizuoti baltymų elektroforezės metodu, o jų sąveika su MAk ištirta imunobloto metodu (3.20 pav.). MAk 7B2 ir 2C1 sąveikavo su #4 fragmentu, t. y. su Cyp c 1 baltymo C-galine seka (30–104 aminorūgštis). Tuo tarpu MAk 18H3 reagavo su #2 fragmentu, esančiu Gad m 1 baltymo C-gale (21–110 aminorūgštis), o MAk 16B3 su #1 fragmentu ir atpažino Gad m 1 N-galinę seką (1–84 aminorūgštis). Vienintelis MAk 3F6 sąveikavo su dviem fragmentais, #2 ir #4, t. y. reagavo su Gad m 1 ir Cyp c 1 baltymų C-galinėmis sekomis. Išanalizavus gautus rezultatus buvo nustatyta, kad MAk 7B2 ir 2C1 epitopas yra išsidėstęs Cyp c 1 baltymo sekoje tarp 74 ir 104 aminorūgštis, MAk 18H3 epitopas yra Gad m 1 baltymo sekoje tarp 85 ir 110 aminorūgštis, MAk 16B3 epitopas – Gad m 1 baltymo sekoje tarp 1 ir 20 aminorūgštis, o MAk 3F6 epitopas – Cyp c 1 baltymo sekoje tarp 74 ir 104 aminorūgštis ir Gad m 1 baltymo sekoje tarp 85 ir 110 aminorūgštis (3.19 pav.).

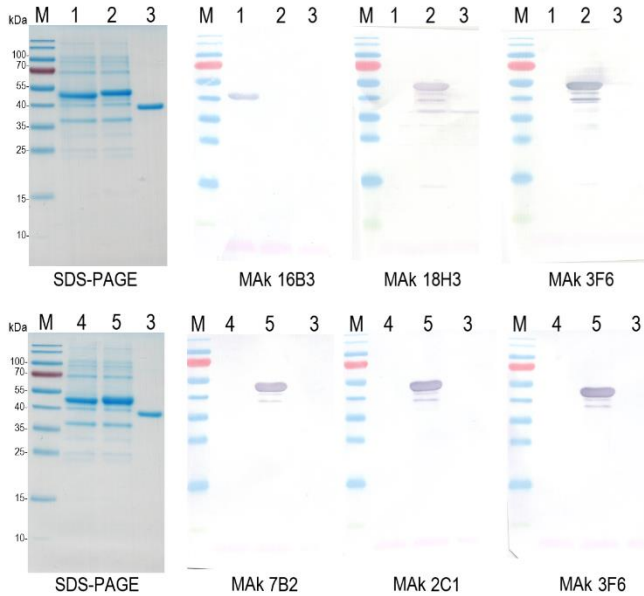
Gad m 1



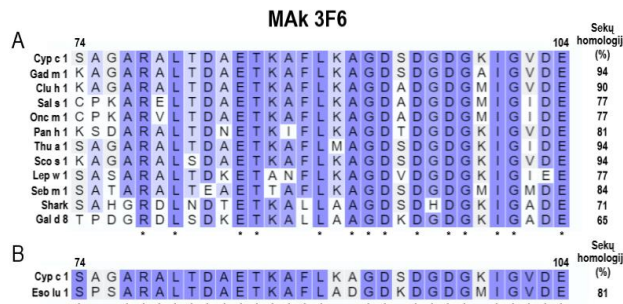
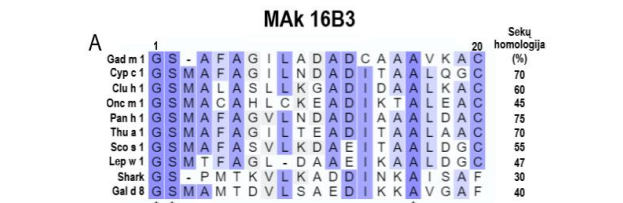
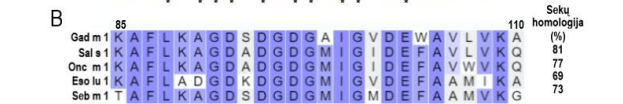
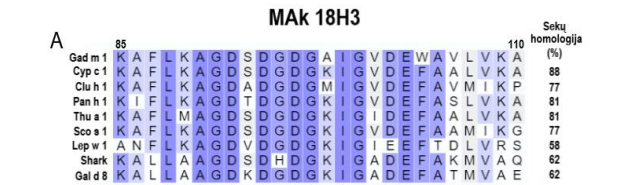
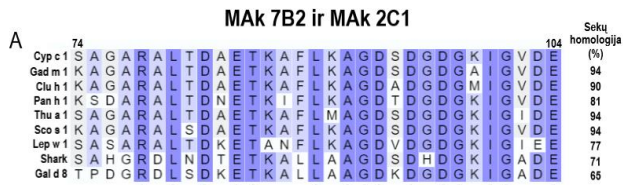
Cyp c 1



3.19 pav. MAk prieš žuvų parvalbūminus epitopų lokalizacijos nustatymas naudojant rekombinantinius persiklojančius Gad m 1 ir Cyp c 1 baltymų fragmentus, sulietus su MBP baltymu. Pažymėtos sekos, kurias atpažįsta MAk.



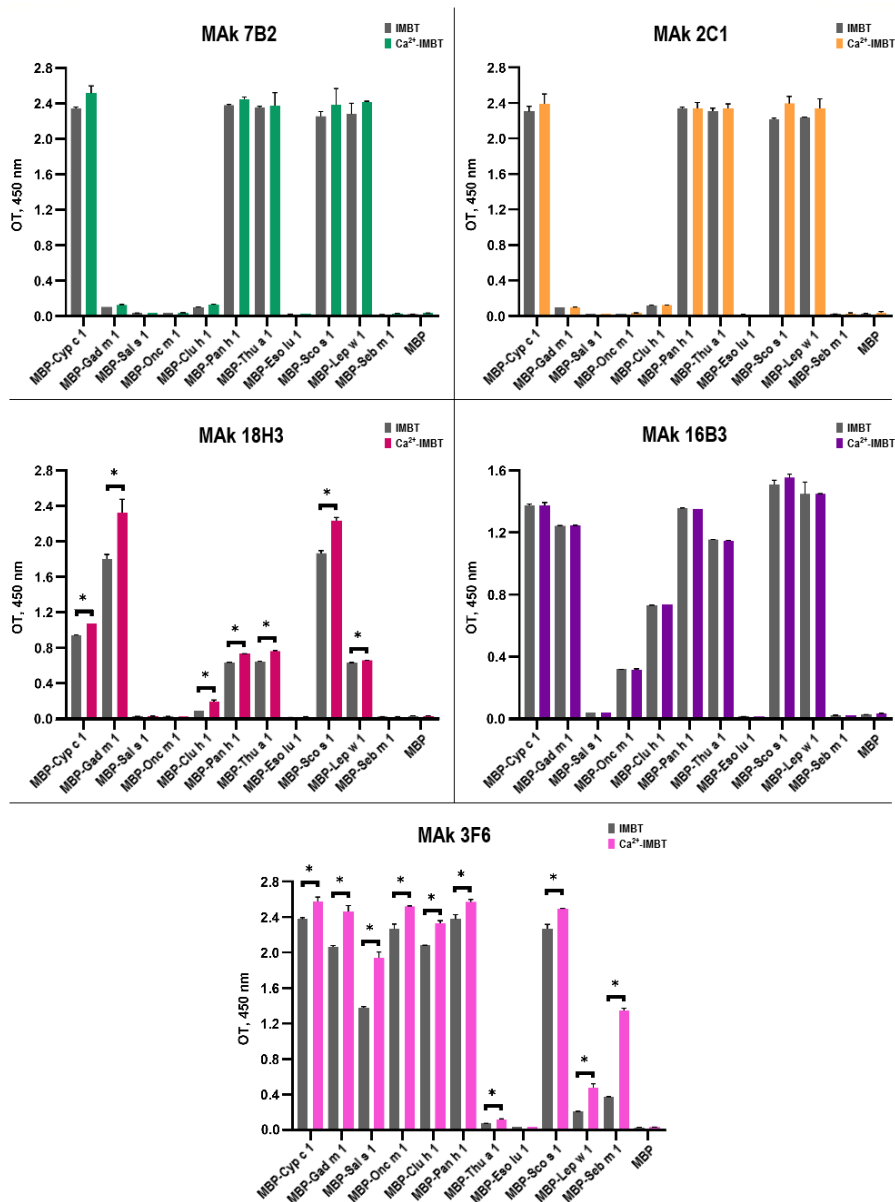
3.20 pav. MAk prieš žuvų parvalbūminus sąveikos su rekombinantinius Gad m 1 ir Cyp c 1 fragmentus sintetinančiais *E. coli* bakterijų lizatais analizė imunobloto metodu. Kairėje: SDS-PAGE; dešinėje: imunoblotas su MAk. M – baltymų molekulinio svorio standartas (Thermo Fisher Scientific); 1 – #1 fragmentas (52,9 kDa); 2 – #2 fragmentas (53,9 kDa); 3 – išgrynintas MBP baltymas (44,1 kDa, neigiama kontrolė); 4 – #3 fragmentas (51,9 kDa); 5 – #4 fragmentas (52,2 kDa).



3.21 pav. Nustatytų MAK prieš žuvų parvalbunus epitopų regionų aminorūgščių sekų palyginimas su rekombinantiniais parvalbunais, su kuriais MAK reagavo (A) ir nereagavo (B) imunobloto metodu. „*“ – žymimos tos aminorūgštys, kurios sutampa tarp visų lyginamų parvalbunų. Kuo tamsesnė violetinė spalva, tuo daugiau aminorūgščių sutampa tarp skirtingų parvalbunų.

Siekdami ištirti sukurtų MAk specifiškumą tam tikriems parvalbuminams, nustatytos aminorūgščių sekos, kurias atpažįsta kiekvienas MAk, buvo palygintos su šiame darbe susintetintų rekombinantinių žuvų ir vištos parvalbuminų sekomis, t. y. atskirai šios aminorūgščių sekos buvo lyginamos su sekomis parvalbuminų, su kuriais antikūnas sąveikavo imunobloto metodu ir su kuriais sąveikos nebuvo (3.21 pav.). Šis tyrimas parodė, kad visų MAk atveju, vienos ar kelių aminorūgščių skirtumas žuvų parvalbuminų aminorūgščių sekose gali lemti, kad antikūnas nesąveikaus su analizuojamu alergenu. Pavyzdžiui MAk 3F6 atveju, aminorūgščių sekų homologija tarp Cyp c 1 baltymo C-galinės sekos ir kitų parvalbuminų yra daugiau nei 65 %. Tikėtina, kad antikūnas atpažįsta parvalbumino aminorūgščių seką, būdingą daugelio gyvūnų parvalbuminams, o tai galėtų paaiškinti šio antikūno kryžminį reaktyvumą ne tik su skirtingų žuvų rūšių, bet ir vištos parvalbuminiais. Tačiau šis antikūnas nesąveikauja su Eso lu 1 alergenu, nors nustatyta daugiau nei 80 % sekų homologija. Tuo tarpu MAk 16B3 atveju, palyginus Gad m 1 baltymo N-galinę seką (1–20 aminorūgštis) su kitais parvalbuminiais nustatytas mažesnis sekų panašumas, ypač su α -parvalbuminiais (30–40 %), dėl to šis antikūnas yra tinkamesnis tam tikrų žuvų rūšių (pvz., siaminės pangasijos ar gelsvauodegio tuno) β -parvalbuminų tyrimams. Įdomu, kad palyginus Cyp c 1 ir Gad m 1 baltymų C-galines aminorūgščių sekas su Sal s 1, Onc m 1 ir Seb m 1 aminorūgščių sekomis, stebima daugiau nei 73 % sekų homologija, tačiau nei MAk 18H3, nei 7B2 ir 2C1 nereaguoja su šiais alergenais.

Atliktais ankstesniais tyrimais buvo parodyta, kad β -parvalbuminų struktūra gali pasikeisti jiems prisijungus arba netekus kalcio arba magnio jonų (Kuehn et al., 2014; Fernandes et al., 2015; Rodgers, 2011). Aprašyta keletas tyrimų, kurių metu IFA ir imunobloto metodais buvo siekiama išsiaiškinti kalcio jonų svarbą žuvims įsijautrinusių pacientų kraujo serume esančių IgE sąveikai su žuvų parvalbuminiais. Nustatyta, kad pašalinus kalcio jonus sumažėja IgE sąveikos su parvalbuminiais stiprumas. Manoma, kad taip galėjo nutikti dėl pasikeitusios parvalbuminų struktūros (Bugajska-Schretter et al., 1998; Swoboda et al., 2002b). Tuo tarpu kitame tyrime buvo parodyta, kad parvalbuminams specifiškų MAk 3E1 ir PARV-19 sąveika su skirtingų žuvų rūšių ekstraktais padidėjo pridėjus EGTA reagento, kuris suriša kalcio jonus ir taip sumažina jų kiekį analizuojamame tirpale. Šiuo atveju sąveikai irgi turėjo įtakos kalcio jonų pašalinamas, kuris lėmė užstotų MAk epitopų atidengimą (Gajewski and Hsieh, 2009).



3.22 pav. MAK prieš žuvų parvalbuminus sąveikos su rekombinantiniais parvalbuminiais analizė netiesioginės IFA metodu, kuomet IFA skirtos plokštelės buvo padengtos rekombinantiniais tiksliniais baltymais, ištirpintais arba IMBT (pilki stulpeliai), arba Ca²⁺-IMBT, turinčio kalcio ir magnio jonų (spalvoti stulpeliai). Matavimai atlikti su pakartojimais. Išmatuotos OT vertės rekombinantinių alergenų, ištirpintų IMBT be ir su metalo jonais, buvo tarpusavyje lyginamos naudojant *Stjudento t* testą. „*“ žymima ten, kur skirtumas tarp lyginamų grupių yra statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$).

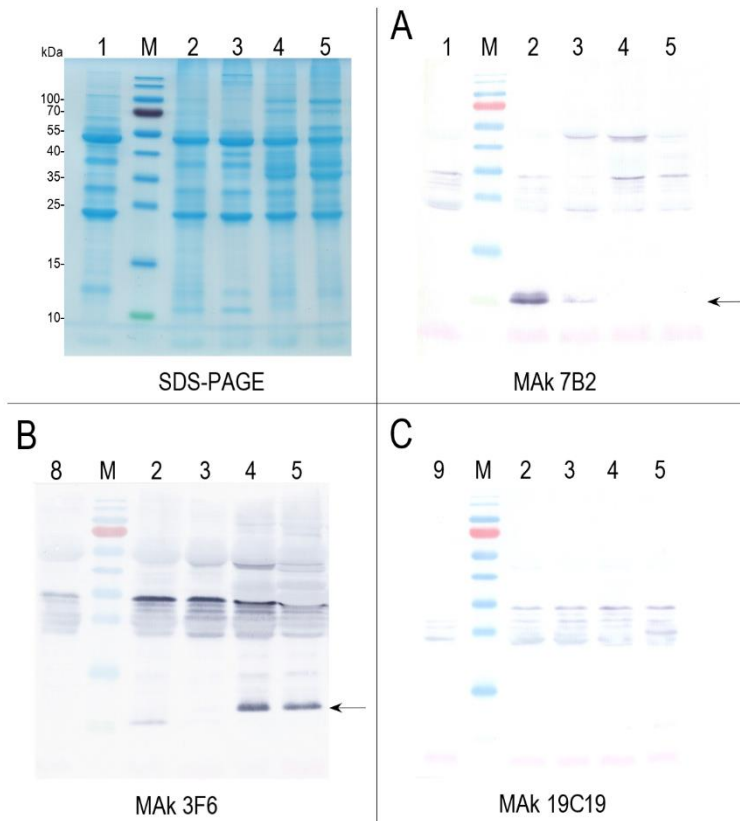
Nustačius alergenų sritis, kurias atpažįsta sukurti MAK prieš žuvų parvalbuminus, buvo pastebėta, kad visi antikūnai, išskyrus MAK 16B3, atpažino Gad m 1 ir Cyp c 1 baltymų regionus, turinčius kalcio jonų surišimo sritis. Siekiant įvertinti, ar MAK prisijungimui prie parvalbuminų gali turėti įtakos kalcio ir magnio jonai, IFA skirtos plokštelės buvo padengtos rekombinantiniais tiksliniais baltymais (galutinė koncentracija 5 µg/mL), ištirpintais arba IMBT, arba Ca²⁺-IMBT (turinčiame kalcio ir magnio jonų), kurios po blokavimo inkubotos su išgrynintais MAK (3.22 pav.). Gauti rezultatai parodė, kad kalcio ir magnio jonai turėjo įtakos MAK 18H3 ir MAK 3F6 antikūnų sąveikai su rekombinantiniais baltymais, t. y. buvo stebimas padidėjęs antikūnų aktyvumas su rekombinantiniais alergenais (padidėjo OT vertės). Tikėtina, kad parvalbuminų regionai, kuriuos atpažįsta šie du antikūnai, tapo jiems lengviau prieinami dėl įvykusių parvalbuminų struktūros pokyčių, kuriuos lėmė alergenų aplinkoje atsiradę metalo jonai. Tuo tarpu jokių reikšmingų MAK 7B2, 2C1 ir 16B3 sąveikos skirtumų su rekombinantiniais alergenais, ištirpintų IMBT be ir su metalo jonais, neužfiksuota.

3.9. Monokloninių antikūnų taikymas parvalbuminų išskyrimui iš alergenų ekstraktų

Buvo patikrintas MAK gebėjimas imunoprecipitacijos būdu iš alergenų ekstraktų išskirti parvalbuminus. Šiam tyrimui pasirinkome MAK 3F6 ir MAK 7B2, kurie taikant IFA metodą stipriai reagavo (OT > 1,5) su parvalbuminiais daugelyje tirtų žuvų ekstraktų. Buvo įvertintas jų gebėjimas iš karpio ir lašišos ekstraktų (komercinių ir iš laboratorijos sąlygomis paruoštų) „išgaudyti“ parvalbuminus. Pirmiausia MAK buvo inkubuojami su sefaroze „rProtein A Sepharose Fast Flow“ (Cytiva). Po to susidaręs antikūnų ir sefarozės kompleksas buvo inkubuojamas su pasirinktais ekstraktais, kad antikūnai galėtų prisijungti ekstraktuose esančius parvalbuminus. Po inkubacijos surinkti mėginiai buvo analizuojami baltymų elektroforezės ir imunobloto metodais. Naudojant krienų peroksidaze žymėtą MAK 3F6 (HRP-3F6) buvo aptiktos ~ 10–12 kDa dydžio baltymų juostelės, kurios atitinka β-parvalbuminus. MAK 3F6 aptiko parvalbuminus abiejų žuvų rūšių ekstraktuose, o MAK 7B2 išskyrė parvalbuminus tik iš karpio ekstraktų (3.23 pav. A ir B).

Siekiant patvirtinti, kad MAK 7B2 ir 3F6 iš alergenų ekstraktų imunoprecipitavo parvalbuminus, kaip neigiamą kontrolę naudojome MAK 19C19 (prieš MBP baltymą), kuris taip pat buvo pirmiausia inkubuojamas su sefaroze-baltymu A, tada su ekstraktais. Išanalizavus šio antikūno

imunoprecipitacijos mėginius buvo patvirtintas MAk 7B2 ir 3F6 specifiskumas parvalbuminams (3.23 pav. C).



3.23 pav. Parvalbuminų išskyrimas iš alergenu ekstraktų naudojant MAk 7B2 (A) ir 3F6 (B) ir jų nustatymas imunobloto metodu naudojant HRP žymėtą MAk 3F6. M – baltymų molekulinio svorio standartas (Thermo Fisher Scientific); 1 – MAk 7B2 ir sefarozės kompleksas (neigiama kontrolė); 2–3 – karpio ekstraktas; 4–5 – lašišos ekstraktas; 8 – MAk 3F6 ir sefarozės kompleksas (neigiama kontrolė). 2 ir 4 – komerciniai ekstraktai; 3 ir 5 – laboratorijos sąlygomis paruošti ekstraktai. MAk 19C19 prieš MBP baltymą buvo naudojamas kaip neigiama kontrolė (C). Rodykle nurodyta parvalbuminų padėtis išanalizuotuose mėginiuose.

Apibendrinus rezultatus, galima teigti, kad sukurtieji MAk prieš žuvų parvalbuminus atpažįsta ir natyvius parvalbuminus, tačiau tiek jų specifiskumas, tiek sąveikos stiprumas su tam tikrų žuvų rūšių parvalbuminams skiriasi. Abu MAk yra tinkami kandidatai alergenu ekstraktų standartizavimui, nes sąveikauja su daugybe skirtingų žuvų rūšių ekstraktų, bei atpažįsta tiek rekombinantinius, tiek natyvius parvalbuminus įvairių žuvų ekstraktuose.

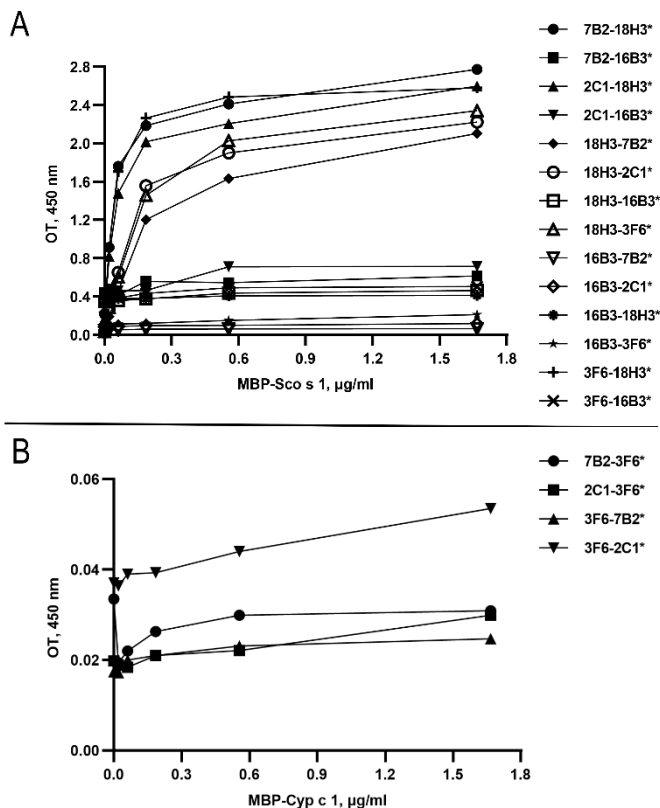
3.10. Monokloninių antikūnų taikymas parvalbūnų aptikimui žuvų ekstraktuose

Vienas iš pagrindinių metodų, naudojamų aptikti žuvies alergenų analizuojamuose mėginiuose yra IFA metodas, kuris pasižymintis dideliu jautrumu ir specifiskumu. Literatūroje aprašyta keletas įvairių IFA variantų, kur naudojant PAK prieš žuvų alergenų įvairiuose žuvų ar maisto mėginiuose yra aptinkami alergenai (Liang et al., 2022). Triušio PAK prieš menkės parvalbūninę buvo panaudoti kuriant dviepitopę IFA, kuri pasižymėjo specifiskumu tik žuvų parvalbūnams ir juos aptiko 32 skirtinguose žuvų ekstraktuose (Faeste and Plassen, 2008). Kitu atveju, dviepitopės IFA metodu, naudojant triušio PAK prieš japoninės skumbės parvalbūninę, žuvies baltymai buvo aptikti 22 skirtinguose žuvų mėginiuose ir 18 tirtų komerciškai apdorotuose maisto produktuose (pvz., žuvies padaže, žuvies dešrelėje, surime), į kurių sudėtį įeina žuvis (Shibahara et al., 2013). Taip pat dviepitopės IFA metodu, naudojant ožkos ir triušio PAK prieš jūros ešerio alergenų, žuvies baltymai buvo aptikti įvairiuose maisto produktuose (pvz., jūros gėrybių tofu, surime, žuvies piršteliuose ir t. t.) (Dasanayaka et al., 2021). Sukurta ir keletas komercinių IFA rinkinių, skirtų žuvų baltymų aptikimui analizuojamuose mėginiuose: „AgraQuant Fish ELISA kit“ (Romer Labs, Austrija) ir „Common Bone Fish Antigen EIA ELISA kit“ (2 ir 3 versija, XEMA, Rusija). Atlikti tyrimai, siekiant įvertinti šių rinkinių gebėjimą aptikti įvairių kaulinių ir kremzlinių žuvų baltymus tiriamuosiuose mėginiuose. Rinkiniai aptiko žuvų baltymus tik 12 iš 57 tirtų žuvų rūšių ekstraktų (menkės, karpio, upėtakio ir kitų). Deja, nė vienas rinkinys neaptiko alergenų kremzlinių žuvų, vėžiagyvių ir kitų gyvūnų ekstraktuose (pvz., vėžlio, vištos, kiaulės, krokodilo ir t. t.) (Ruethers ir kt., 2020). Tai rodo, kad labai svarbu nustatyti, kokios žuvų rūšies baltymams gali būti pritaikyta turima maisto alergenų nustatymui skirta IFA analitinė sistema, kad būtų galima tiksliai įvertinti tiriamųjų alergenų buvimą analizuojamuose mėginiuose ir apsaugoti pacientus nuo galimų alerginių reakcijų.

Šiame darbe parodėme, kad sukurtieji MAK prieš žuvų parvalbūnų pasižymi plačiu kryžminiu reaktyvumu ir geba atpažinti parvalbūnų tiek skirtingų žuvų ekstraktuose, tiek vištienos ir kiaulienos ekstraktuose. Siekiant įvertinti šių MAK potencialą alergenų ekstraktų analizei, nusprendėme pritaikyti šiuos antikūnus kuriant dviepitopę IFA, skirtą parvalbūnų aptikimui analizuojamuose mėginiuose. Kuriant tokią sistemą būtina parinkti du MAK, t. y. MAK porą, kurie atpažintų tą patį antigeną, tik skirtingus jo epitopus. Taip pat svarbu parinkti tinkamiausias eksperimento sąlygas (pvz.,

optimalias antikūnų koncentracijas, buferinius tirpalus, konjugato skiedimus ir t. t.) (Sakamoto et al., 2018; Minic and Zivkovic, 2020).

Kadangi kuriant dviepitopę IFA reikalingi MAK pora, pirmiausia reikėjo įvertinti, ar MAK prieš nGad m 1 tarpusavyje konkuruoja dėl prisijungimo prie antigeno, ar atpažįsta skirtingus parvalbumino epitopus. Atlikus konkurencinę IFA, MAK prieš nGad m 1 buvo suskirstyti į tris grupes: I grupė MAK 7B2 ir 2C1, II – MAK 18H3 ir III – MAK 16B3, kuriose esantys antikūnai atpažįsta skirtingas antigeno sritis. Tuomet dviepitopės IFA metodu buvo tikrinamos įvairios MAK porų kombinacijos, sudarytos iš MAK prieš nGad m 1 ir MAK 3F6 prieš MBP-Cyp c 1, kuomet vienu iš antikūnų yra padengiama IFA plokštelė, o kitu antikūnu (konjuguotu su krienų peroksidaze (HRP)) yra nustatomas tiriamasis antigenas. Toliau darbe MAK konjugatai su HRP žymimi „*“. Buvo atrinkamos tos antikūnų poros, kurios tiriamajame tirpale atpina rekombinantinius MBP-Scos 1 arba MBP-Cyp c 1.



3.24 pav. MAK poros atranka dviepitopės IFA kūrimui. A dalyje porų atrankai naudojamas rekombinantinis MBP-Scos 1 baltymas, o B dalyje – rekombinantinis MBP-Cyp c 1 baltymas. Matavimai atlikti be pakartojimų. „*“ prie MAK pavadinimo nurodo, kad antikūnas yra žymėtas HRP.

Pasirinkome šiuos rekombinantinius baltymus antikūnų porų atrankai, kadangi netiesioginės IFA metodu visi MAK su jais stipriai reagavo (OT > 1,3). Iš visų tirtų porų, dvi MAK poros pasižymėjo didžiausiu jautrumu (18H3-3F6* ir 7B2-18H3*), todėl jos buvo pasirinktos dviepitopės IFA optimizavimui (3.24 pav.).

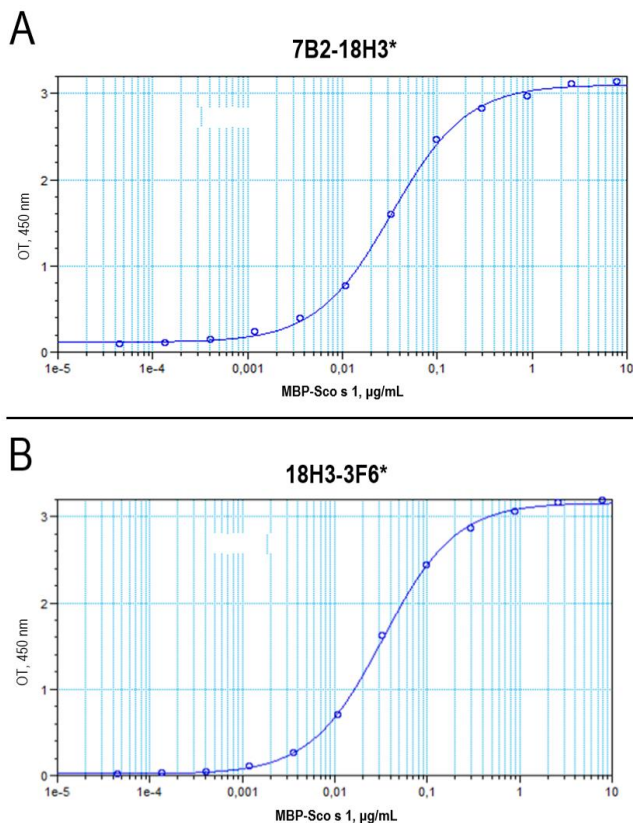
Optimizuojant buvo siekiama kuo didesnio dviepitopės IFA jautrumo, todėl buvo nuspręsta patikrinti keletą IFA metodų parametrų ir išrinkti tinkamiausią, t. y. pasirinkti IFA plokštelę („Thermo Fisher Scientific“ arba „Nerbe plus“), imobilizacijos buferinį tirpalą (IMBT arba PBS), nustatyti imobilizuojamo MAK koncentraciją (3, 5 arba 8 µg/mL), blokavimo buferinį tirpalą (2 % BSA, 4 % pieno miltelių arba 1xRotiBlock) ir parinkti HRP žymėto MAK skiedimą (10–100 kartų). Inkubacijų trukmės ir temperatūros nekeitėme. Dviepitopės IFA metodo kūrimui ir optimizavimui naudojome rekombinantinį MBP-Scos 1 baltymą (koncentracija nuo 8 µg/mL iki $1,35 \times 10^{-4}$ µg/mL).

Atlikus minėtus eksperimentus, kiekvienai MAK porai buvo parinktos dviepitopės IFA sąlygos ir įvertintas kiekvienos poros sistemos jautrumas, t. y. mažiausia parvalbumino koncentracija, kurią gali aptikti sukurta dviepitopė IFA sistema. Metodo jautrumas naudojant 7B2-18H3* porą buvo lygus $1,211 \pm 0,022$ ng/mL, o naudojant 18H3-3F6* porą – $1,857 \pm 0,034$ ng/mL (3.5 lentelė, 3.25 pav.).

3.5 lentelė. Nustatytos optimalios sąlygos abiem MAK poroms.

MAK pora	IFA plokštelė	Imobilizacijos buferinis tirpalas	Imobilizuojamo MAK koncentracija	Blokavimo buferinis tirpalas	HRP žymėto MAK skiedimas
18H3-3F6*	Nunc MaxiSorp (Thermo Fisher Scientific)	PBS	5 µg/ml	1xRotiBlock	800 kartų
7B2-18H3*					80 kartų

Vienos iš literatūroje aprašytos dviepitopės IFA sistemos, sukurtos naudojant triušio ir ožkos PAK prieš žuvų parvalbuminus, jautrumas buvo 0,6 ng/mL (Liang et al., 2022). Naudojant triušio PAK prieš menkės parvalbuminą buvo sukurta dviepitopė IFA sistema, kurios jautrumas buvo 0,11 ng/mL, naudojant triušio PAK prieš Japoninę skumbę – 0,58 ng/mL, o pritaikius ožkos ir triušio PAK prieš jūros ešerį – 0,5 ng/mL (Faeste and Plassen, 2008; Shibahara et al., 2013; Dasanayaka et al., 2021). Pastebima, kad naudojant PAK prieš žuvų alergenus yra sukuriamos didesniu jautrumu pasižyminančios dviepitopės IFA sistemos. Nepasant to, yra žinoma, kad PAK atsargos yra ribotos, todėl tokių sistemų kūrimui geriau būtų pritaikyti MAK.



3.25 pav. Optimizuotos dviepitopės IFA kalibracinės kreivės. A – dviepitopė IFA sistema sukurta naudojant MAK porą 7B2 ir 18H3*, B – dviepitopė IFA sistema sukurta naudojant MAK porą 18H3 ir 3F6*. Grafikai nubrėžti kompiuterine programa „SoftMax Pro 4.0“ (Molecular Devices).

Sukūrus optimizuotas dviepitopės IFA sistemas, buvo įvertinta, ar jos tinkamos parvalbūnų aptikimui įvairių žuvų bei vištienos ir kiaulienos ekstraktuose. Iš viso tikrinome 4 komercinius ir 29 laboratorijos sąlygomis paruoštus ekstraktus (3.6 lentelė). Parvalbūnų koncentracija mėginiuose buvo apskaičiuota pagal keturių parametrų logistinės kreivės (angl. *four parameter logistic (4PL) curve*) lygtį, gauta nubraižius kalibracinę kreivę (OT priklausomybė nuo rekombinantinio MBP-Sco s 1 koncentracijos (nuo 8 µg/mL iki $1,35 \times 10^{-4}$ µg/mL)).

Naudojant šias analitines sistemas, parvalbūnų koncentraciją pavyko nustatyti daugumoje tirtų ekstraktų. Tikrinant ekstraktus su MAK 18H3 ir 3F6* pora, parvalbūninai buvo aptikti 16 iš 33 tirtų ekstraktų (48 %). Didžiausios parvalbūnų koncentracijos (> 400 ng/mL) buvo nustatytos ledjūrio menkės, europinės stintos ir juodadėmės menkės ekstraktuose.

3.6 lentelė. Nustatytos parvalbūminų koncentracijos (ng/mL) tirtuose ekstraktuose taikant optimizuotas dviepitopės IFA sistemas, sukurtas naudojant MAk 7B2 ir 18H3* porą arba MAk 18H3 ir 3F6* porą.

Ekstraktas	MAk pora	
	7B2–18H3*	18H3–3F6*
<i>Paprastojo karpio (DST)</i>	60,58	-
<i>Atlantinės silkės (DST)</i>	-	-
<i>Atlantinės lašišos (DST)</i>	-	-
<i>Atlantinės menkės (DST)</i>	38,64	103,43
<i>Paprastojo karpio</i>	39,66	-
<i>Atlantinės silkės</i>	-	-
<i>Atlantinės lašišos</i>	-	-
<i>Vaivorykštinio upėtakio</i>	-	-
<i>Ledjūrio menkės</i>	46,4	490,69
<i>Aliaskinės rudagalvės menkės</i>	19,44	33,33
<i>Europinės lydekos</i>	40,96	69,6
<i>Europinės stintos</i>	-	400,7
<i>Paprastosios kuojos</i>	253,42	1,45
<i>Paprastojo karšio</i>	27,67	1,92
<i>Paprastojo europinio ešerio</i>	18,87	3,49
<i>Paprastojo pūgžlio</i>	2,5	1,96
<i>Auksaspalvės dorados</i>	86,29	-
<i>Gelsvapelekės plekšnės</i>	30,44	2,59
<i>Argentininės jūrų lydekos</i>	42,91	164,91
<i>Atlantinės argentinės</i>	3,3	-
<i>Juodadėmės menkės</i>	27,45	895,1
<i>Didžiagalvės menkės</i>	21,59	119,75
<i>Šiaurinės dryžakojės krevetės</i>	-	-
<i>Krabų lazdelių</i>	9,93	1,89
<i>Sūdytos atlantinės silkės</i>	-	-
<i>Konservuotos afrikinės skumbrės</i>	-	-
<i>Konservuotos atlantinės menkės</i>	-	-
<i>Konservuoto dryžojo tuno</i>	-	-
<i>Šaltai rūkytos atlantinės lašišos</i>	3,1	-
<i>Šaltai rūkytos atlantinės skumbrės</i>	65,51	3,13
<i>Rūkytų atlantinių šprotų</i>	2,5	2,8
<i>Kiaulienos</i>	-	-
<i>Vištienos</i>	-	-

Tuo tarpu ekstraktus tiriant su MAk 7B2 ir 18H3* pora, parvalbuminai buvo aptikti 20 iš 33 tirtų mėginių (61 %). Daugiausia parvalbuminų nustatyta paprastosios kuojos ekstrakte (< 200 ng/mL). Įdomu tai, kad abi MAk poros dviepitopės IFA metodu nustato skirtingas parvalbuminų koncentracijas tame pačiame ekstrakte. Analizuodami sukurtų MAk kryžminį reaktyvumą IFA metodu mes pastebėjome, kad antikūnai pasižymi skirtingu kryžminiu reaktyvumu ir su vienu žuvų rūšių parvalbuminiais sąveikauja stipriau (OT > 1,5), su kitų silpniau (OT < 0,5), arba apskritai nereaguoja. Pavyzdžiui, MAk 7B2 ir 18H3* pora neaptiko parvalbuminų stintos ekstrakte, tuo tarpu MAk 18H3 ir 3F6* pora – atlantinės argentinės ekstrakte. Tam galėjo turėti įtakos tai, kad tiriant netiesioginės IFA metodu MAk 7B2 silpnai sąveikauja su parvalbuminiais stintos ekstrakte, o MAk 18H3 – atlantinės argentinės ekstrakte.

Taip pat buvo nustatyta, kad abi dviepitopės IFA sistemos neaptiko parvalbuminų ekstraktuose, paruoštuose iš konservuotų žuvų (skumbrės, menkės ir tuno), bei iš sūdytos silkės. Tikėtina, kad šiuose ekstraktuose MAk neaptiko parvalbuminų dėl galimų jų struktūros pokyčių įvykusių konservavimo metu. Vienas ankstesnis tyrimas parodė, kad keli pacientai, alergiški termiškai neapdorotai lašišai, toleravo konservuotą lašišą. Manoma, kad konservavimo metu yra sumažinamas tam tikrų žuvų baltymų alergeniškumas ir stabilumas (Bernhisel-Broadbent et al., 1992). Be to, nė viena dviepitopė IFA sistema nenustatė parvalbuminų vištienos ir kiaulienos ekstraktuose.

Įdomu, kad parvalbuminų koncentracijos buvo nustatytos ekstraktuose, paruoštuose iš rūkytų žuvų (lašišos, skumbrės, šprotų). Be to, abi antikūnų poros aptiko parvalbuminus krabų lazdelėse, į kurių sudėtį įeina 41 % surimio, sudaryto iš žuvies (jūros lydekos, menkės ar sardinės), kiaušinio baltymo, vandens, bulvių ir kviečių krakmolo, cukraus, druskos ir t. t. Siekiant patvirtinti, kad sukurtos analitinės sistemos skirtos aptikti tik parvalbuminams, kaip neigiamą kontrolę naudojome laboratorijoje paruoštą krevetės ekstraktą, kuriame nėra parvalbuminų.

Taigi, šio darbo metu parodėme, kad sukurtieji MAk prieš žuvų parvalbuminus gali būti pritaikyti kuriant dviepitopės IFA sistemas, skirtas tam tikrų žuvų rūšių parvalbuminų aptikimui analizuojamuose mėginiuose.

REZULTATŲ APIBENDRINIMAS

β -parvalbuminas ir β -enolazė – tai žuvų raumenyse aptinkami žuvies alergenai, galintys sukelti įvairius alergijos simptomus. Siekiant išvengti nepageidaujamų alerginių reakcijų, kuriamos įvairios analitinės sistemos, kurios galėtų aptikti žuvies alergenus tiriamuosiuose maisto produktuose. Tokių sistemų kūrimui ir optimizavimui gali būti naudojami rekombinantiniai žuvų alergenai ir jiems specifiniai MAK.

Šio tyrimo metu *E. coli* bakterijose buvo susintetinta ir išgryninta 14 rekombinantinių alergenų, sulietų su MBP: 11 skirtingų žuvų rūšių β -parvalbuminų, paprastojo karpio β -enolazė, Kaliforninio šakadančio ryklio α -parvalbuminas ir vištos α -parvalbuminas. Žuviai alergiškų pacientų kraujo serume esančių IgE sąveika su išgrynintais rekombinantiniais alergenais patvirtino, kad jie pasižymi antigeninėmis savybėmis, būdingomis natūraliems alergenams ir gali būti pritaikyti žuvų alergenams specifinių MAK kūrimui ir apibūdinimui. Be to, šio darbo metu iš paprastojo karpio raumens klonuota ir *E. coli* raiškos sistemoje susintetinta rekombinantinė karpio β -enolazė buvo pripažinta nauju žuvies alergenu, kuris WHO/IUIS alergenų nomenklatūros duomenų bazėje užregistruotas pavadinimu Cyp c 2.

Taikant hibridomų technologiją ir naudojant imunizacijai rekombinantinį paprastojo karpio β -parvalbuminą, β -enolazę bei natūralų atlantinės menkės β -parvalbuminą, buvo sukurtos 7 hibridomų linijos, sekretuojančios aukšto giminingumo IgG klasės MAK prieš šiuos baltymus. Nustatyta, kad visi MAK, išskyrus MAK 14F3, atpažįsta linijinius epitopus. Taikant įvairius imunocheminius metodus buvo parodyta, kad sukurtieji MAK pasižymi plačiu kryžminiu reaktyvumu ir geba atpažinti tiek rekombinantinius, tiek natūralius įvairių žuvų rūšių raumenų ekstraktuose esančius tikslinius alergenus. Taip pat nustatyta, kad visi MAK atpažino šiuos alergenus tirtuose vištienos ir kiaulienos ekstraktuose. Be to, buvo parodyta, kad MAK prieš parvalbuminus geba atpažinti rekombinantinius žuvies ir vištos α -parvalbuminus, o MAK 6E4, sukurtas prieš karpio β -enolazę, tirtuose *E. coli* ir *Saccharomyces cerevisiae* mėginiuose aptiko šių mikroorganizmų enolazes. Kryžminis specifiškumas rodo, kad MAK atpažįsta konservatyvius tikslinių baltymų epitopus. Ypač plačiu kryžminiu specifiškumu pasižymėjo MAK 3F6.

Atlikus epitopų analizę buvo nustatyta, kad MAK 16B3 atpažįsta Gad m 1 baltymo N-galinę seką, o visi kiti MAK atpažįsta epitopus, esančius alergenų C-galinėse sekose.

Naudojant MAK prieš parvalbuminus, buvo sukurtos ir optimizuotos dvi dviepitopės IFA sistemos, kurios aptiko parvalbuminus daugumoje tirtų skirtingų žuvų rūšių ekstraktų.

Taigi, pagrindinis šio darbo rezultatas yra nauji, išsamiai apibūdinti MAK prieš žuvų alergenų, kurie pasižymi plačiu kryžminiu reaktyvumu ir gali aptikti tiek žuvies, tiek kitų organizmų tikslinius baltymus. Šių MAK pagrindu sukurtieji analitiniai metodai gali būti pritaikyti alergenų ekstraktų sudėties tyrimams ir jų standartizavimui.

IŠVADOS

1. *E. coli* raiškos sistemoje susintetinti rekombinantiniai alergenai, sulieti su maltozę surišančiu baltymu, yra antigeniškai panašūs į natūralius alergenų, nes reaguoja su IgE klasės antikūnais, esančiais žuviai alergiškų asmenų kraujo serume.
2. Pirmą kartą bakterijų raiškos sistemoje gautos rekombinantinės paprastojo karpio β -enolazės antigeniškumo tyrimai patvirtino, kad tai naujas žuvies alergenų (Cyp c 2).
3. Naudojant kaip imunogenus rekombinantinę paprastojo karpio β -enolazę, rekombinantinį paprastojo karpio β -parvalbuminą ir natūralų atlantinės menkės β -parvalbuminą, sukurtos naujos hibridomų linijos, sekretuojančios IgG klasės MAK, tinkamus tikslinių alergenų nustatymui ir tyrimams.
4. Atlikus išsamų MAK apibūdinimą ir epitopų analizę, nustatyta, kad dauguma MAK atpažįsta konservatyvius linijinius epitopus, esančius skirtingos kilmės tikslinių alergenų sekose.
5. Visi sukurtieji MAK pasižymi kryžminiu reaktyvumu, todėl gali būti pritaikyti alergenų nustatymui įvairių žuvų ir kitų gyvūnų ekstraktuose.
6. Plačiausiu kryžminiu specifiškumu pasižymintis MAK 3F6 galėtų būti pritaikytas įvairių žuvų rūšių alergenų ekstraktų analizei ir standartizavimui.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abbas A. K., Lichtman A. H., Andrew H., Pillai S. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. 6th Edition. *Elsevier*, 2020.
2. Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 9th Edition, *Elsevier*, 2018.
3. Aden E., Weber B., Bossert J., Teppke M., Frank E., Wahl R., Fiebig H., Cromwell O. Standardization of *Alternaria alternata*: extraction and quantification of alt a 1 by using an mAb-based 2-site binding assay. *J Allergy Clin Immunol*, 1999, **104(1)**, 128–135, doi:10.1016/s0091-6749(99)70124-7.
4. Alhadj M., Farhana A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *StatPearls Publishing*, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>.
5. Arakaki T. L., Pezza J. A., Cronin M. A., Hopkins C. E., Zimmer D. B., Tolan D. R., Allen K. N. Structure of human brain fructose 1,6-(bis)phosphate aldolase: linking isozyme structure with function. *Protein Sci*, 2004, **13(12)**, 3077–3084, doi:10.1110/ps.04915904.
6. Argiz L., Vega F., Castillo M., Pineda F., Blanco C. Selective Allergy to Conger Fish due to Parvalbumin. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2019, **29(5)**, 390–391, doi:10.18176/jiaci.0412.
7. Armbruster D. A., Pry, T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *The Clinical biochemist. Reviews*, 2008, **29(1–1)**, S49–S52. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2556583/>.
8. Bagdonaitė L. Klinikinės imunologijos praktikos užduotys: mokomoji knygelė. *Petro Ofsetas*, 2013. http://www.esparama.lt/es_parama_pletra/failai/ESFproduktai/2013_mokomoji_Imunologijos_uzduotys.pdf.
9. Beale J. E., Jeebhay M. F., Lopata A. L. Characterisation of purified parvalbumin from five fish species and nucleotide sequencing of this major allergen from Pacific pilchard, *Sardinops sagax*. *Molecular immunology*, 2009, **46(15)**, 2985–2993, doi:10.1016/j.molimm.2009.06.018.
10. Bernhisel-Broadbent J., Strause D., Sampson H. A. Fish hypersensitivity. II: Clinical relevance of altered fish allergenicity caused by various preparation methods. *J Allergy Clin Immunol*, 1992, **90(4–1)**, 622–629, doi:10.1016/0091-6749(92)90135-o.
11. Berni Canani R., Di Costanzo M., Bedogni G., Amoroso A., Cosenza L., Di Scala C., Granata V., Nocerino R. Extensively hydrolyzed casein formula containing *Lactobacillus rhamnosus* GG reduces the occurrence of other allergic manifestations in children with cow's milk allergy: 3-year randomized controlled trial. *J Allergy Clin Immunol.*, 2017, **139(6)**, 1906–1913.e4, doi:10.1016/j.jaci.2016.10.050.
12. Boguszewska K., Szewczuk M., Urbaniak S., Karwowski B. T. Review: immunoassays in DNA damage and instability detection. *Cell. Mol. Life Sci*, 2019, **76**, 4689–4704, doi:10.1007/s00018-019-03239-6.

13. Boye J. I. Food allergies in developing and emerging economies: need for comprehensive data on prevalence rates. *Clin Transl Allergy*, 2012, **2**(1), 25, doi.org/10.1186/2045-7022-2-25.
14. Brand P. Allergy diagnosis: pros and cons of different tests, indications and limitations. *Breathe*, 2007, **3**, 345–349, doi:10.1183/18106838.0304.345.
15. Brough H. A., Lanser B. J., Sindher S. B., Teng J. M. C., Leung D. Y. M., Venter C., Chan S. M., Santos A. F., Bahnson H. T., Guttman-Yassky E., Gupta R. S., Lack G., Ciaccio C. E., Sampath V., Nadeau K. C., Nagler C. R. Early intervention and prevention of allergic diseases. *Allergy*, 2022, **77**(2), 416–441, doi:10.1111/all.15006.
16. Bublin M., Kostadinova M., Fuchs J. E., Ackerbauer D., Moraes A. H., Almeida F. C., Lengger N., Hafner C., Ebner C., Radauer C., Liedl K. R., Valente A. P., Breiteneder H. A Cross-Reactive Human Single-Chain Antibody for Detection of Major Fish Allergens, Parvalbumins, and Identification of a Major IgE-Binding Epitope. *PLoS one*, 2015, **10**(11), e0142625, doi:org/10.1371/journal.pone.0142625.
17. Bugajska-Schretter A., Grote M., Vangelista L., Valent P., Sperr W. R., Rumpold H., Pastore A., Reichelt R., Valenta R., Spitzauer S. Purification, biochemical, and immunological characterisation of a major food allergen: different immunoglobulin E recognition of the apo- and calcium-bound forms of carp parvalbumin. *Gut*, 2000, **46**(5), 661–669, doi.org/10.1136/gut.46.5.661.
18. Bukelskis E., Balevičius A., Vaitonis L. Žuvų biologija ir sandara, klasifikacijos pagrindai. *UAB „Senasis ežerėlis“*, 2017. https://www.silutespmc.lt/wp-content/uploads/2020/02/konspektas_zuvubiologija.pdf.
19. Cai Q.-F., Wang X.-C., Liu G.-M., Zhang L., Ruan M.-M., Liu Y., Cao M.-J. Development of a monoclonal antibody-based competitive enzyme linked-immunosorbent assay (c-ELISA) for quantification of silver carp parvalbumin, *Food Control*, 2013, **29**(1), 241–247, doi:10.1016/j.foodcont.2012.06.016.
20. Calamelli E., Liotti L., Beghetti I., Piccinno V., Serra L., Bottau P. Component-Resolved Diagnosis in Food Allergies. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 2019, **55**(8), 498, doi:10.3390/medicina55080498.
21. Carr S., Chan E. S., Watson, W. Eosinophilic esophagitis. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 2018, **14**(2), 58, doi:10.1186/s13223-018-0287-0.
22. Carvalho S., Marcelino J., Cabral Duarte M. F., Costa C., Barbosa M. A., Pereira Dos Santos M. C. Role of Recombinant Parvalbumin Gad c 1 in the Diagnosis and Prognosis of Fish Allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol.*, 2020, **30**(5), 340–345, doi:10.18176/jiaci.0437.
23. Celio M. R., Baier W., Schärer L., de Viragh P. A., Gerday C. Monoclonal antibodies directed against the calcium binding protein parvalbumin. *Cell Calcium*, 1988, **9**(2), 81–86, doi:10.1016/0143-4160(88)90027-9.
24. Chan B. C. L., Lam C. W. K., Tam L. S., Wong C. K. IL33: Roles in Allergic Inflammation and Therapeutic Perspectives. *Frontiers in immunology*, 2019, **10**, 364, doi:10.3389/fimmu.2019.00364.
25. Chapman M. D. Allergen specific monoclonal antibodies: new tools for the management of allergic disease. *Allergy*, 1988, **43**(5), 7–14, doi:10.1111/j.1398-9995.1988.tb05042.x.

26. Chen Y. T., Hsieh Y. P. Development and Characterization of Monoclonal Antibodies for the Detection of Fish Protein. *Foods*, 2021, **10(10)**, 2360, doi:10.3390/foods10102360.
27. Chen L., Hefle S. L., Taylor S. L., Swoboda I., Goodman R. E. Detecting fish parvalbumin with commercial mouse monoclonal anti-frog parvalbumin IgG. *J Agric Food Chem*, 2006, **54(15)**, 5577–5582, doi:10.1021/jf060291g.
28. Climer L. K., Cox A. M., Reynolds T. J., Simmons D. D. Oncomodulin: The Enigmatic Parvalbumin Protein. *Frontiers in molecular neuroscience*, 2019, **12**, 235, doi:10.3389/fnmol.2019.00235.
29. Connors L., O'Keefe A., Rosenfield L., Kim H. Non-IgE-mediated food hypersensitivity. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 2018, **14(2)**, 56, doi:10.1186/s13223-018-0285-2.
30. Cory R. P., Wold F. Isolation and characterization of enolase from rainbow trout (*Salmo gairdnerii* *gairdnerii*). *Biochemistry*, 1966, **5(10)**, 3131–3137, doi:10.1021/bi00874a008.
31. Costa S., Almeida A., Castro A., Domingues L. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Frontiers in microbiology*, 2014, **5**, 63, doi.org/10.3389/fmicb.2014.00063.
32. Csonka P. Molecular Allergology User's Guide, *Punamusta Oy*, 2021. https://www.researchgate.net/publication/329619688_Molecular_Allergology_User's_Guide#fullTextFileContent.
33. Dahlman-Höglund A., Renström A., Acevedo F., Andersson E. Exposure to parvalbumin allergen and aerosols among herring processing workers. *The Annals of occupational hygiene*, 2013, **57(8)**, 1020–1029, doi:10.1093/annhyg/met021.
34. Das Dores S., Chopin C., Villaume C., Fleurence J., Guéant J. L. A new oligomeric parvalbumin allergen of Atlantic cod (*Gad mI*) encoded by a gene distinct from that of *Gad cI*. *Allergy*, 2002, **57(72)**, 79–83, doi:10.1034/j.1398-9995.57.s72.1.x.
35. Dasanayaka B. P., Li Z., Pramod S. N., Chen Y., Khan M. U., Lin H. A review on food processing and preparation methods for altering fish allergenicity. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 2022, **62(7)**, 1951–1970, doi:10.1080/10408398.2020.1848791.
36. Dasanayaka B. P., Zhao J., Zhang J., Huang Y., Khan M. U., Lin H., Li Z. Development of a sensitive sandwich-ELISA assay for reliable detection of fish residues in foods. *Analytical biochemistry*, 2021, **635**, 114448, doi:10.1016/j.ab.2021.114448.
37. Díaz-Ramos A., Roig-Borrellas A., García-Melero A., López-Alemaný R. α -Enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2012, **2012**, 156795, doi:10.1155/2012/156795.
38. Dijkema D., Emons J. A. M., Van de Ven A. A. J. M., Oude Elberink J. N. G. Fish Allergy: Fishing for Novel Diagnostic and Therapeutic Options. *Clin Rev Allergy Immunol.*, 2022, **62(1)**, 64–71, doi:10.1007/s12016-020-08806-5.
39. Duarte J. H. Functional switching. *Nat. Immunol*, 2016, **17**, S12–S12, doi:10.1038/ni.3607.
40. Dubakienė R. Alergija: Priežastys, Simptomai, Gydymas. *Tyto Alba*, 2019.
41. Dubakienė R. Alergijos Labirintais. *Kriventa*, 2021.

42. Eigenmann P. A., Sicherer S. H., Borkowski T. A., Cohen B. A., Sampson H. A. Prevalence of IgE-mediated food allergy among children with atopic dermatitis. *Pediatrics*, 1998, **101(3):E8**, doi:10.1542/peds.101.3.e8.
43. Faeste C. K., Plassen C. Quantitative sandwich ELISA for the determination of fish in foods. *J Immunol Methods*, 2008, **329(1–2)**, 45–55, doi:10.1016/j.jim.2007.09.007.
44. Feketea G., Vassilopoulou E., Geropanta F., Berghea E. C., Bocsan I. C. Alternative Fish Species for Nutritional Management of Children with Fish-FPIES-A Clinical Approach. *Nutrients*, 2021, **14(1)**, 19, doi:10.3390/nu14010019.
45. Fernandes T. J. R., Costa J., Carrapatoso I., Oliveira M. B. P. P., Mafra I. Advances on the molecular characterization, clinical relevance, and detection methods of Gadiform parvalbumin allergens. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 2017, **57(15)**, 3281–3296, doi:10.1080/10408398.2015.1113157.
46. Fernandes T. J. R., Costa J., Oliveira M. B. P. P., Mafra I. An overview on fish and shellfish allergens and current methods of detection. *Food and Agricultural Immunology*, 2015, **26:6**, 848–869, doi:10.1080/09540105.2015.1039497.
47. Gajewski K. G., Hsieh Y. H. Monoclonal antibody specific to a major fish allergen: parvalbumin. *J Food Prot*, 2009, **72(4)**, 818–825, doi:10.4315/0362-028x-72.4.818.
48. Ghagane S. C., Puranik S. I., Gan S. H., Hiremath M. B., Nerli R. B., Ravishankar M. V. Frontiers of monoclonal antibodies: Applications in medical practices. *Hum Antibodies*, 2017, **26(3)**, 135–142, doi:10.3233/HAB-170331.
49. González-de-Olano D., Bartolomé B., Maroto A. S., Vivanco F., Pastor-Vargas C. Asthma after chicken consumption due to cross-reactivity between fish and chicken parvalbumin. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2012, **22(3)**, 227–228.
50. Griesmeier U., Vázquez-Cortés S., Bublin M., Radauer C., Ma Y., Briza P., Fernández-Rivas M., Breiteneder H. Expression levels of parvalbumins determine allergenicity of fish species. *Allergy*, 2010, **65(2)**, 191–198, doi:10.1111/j.1398-9995.2009.02162.x.
51. Grimshaw K., Logan K., O'Donovan S., Kiely M., Patient K., van Bilsen J., Beyer K., Campbell D. E., Garcia-Larsen V., Grabenhenrich L., Lack G., Mills C., Wal J. M., Roberts G. Modifying the infant's diet to prevent food allergy. *Arch Dis Child.*, 2017, **102(2)**, 179–186, doi:10.1136/archdischild-2015-309770.
52. Grozdanovic M., Popovic M., Gavrovic-Jankulovic M. Design and cloning strategies of recombinant allergens for diagnosis and specific immunotherapy. *Advances in Genetics Research*, 2014, **11**, 19–46. https://www.researchgate.net/publication/290713361_Design_and_cloning_strategies_of_recombinant_allergens_for_diagnosis_and_specific_immunotherapy#fullTextFileContent.
53. Hayat S. M. G., Farahani N., Golichenari B., Sahebkar A. Recombinant Protein Expression in Escherichia coli (E.coli): What We Need to Know. *Current pharmaceutical design*, 2018, **24(6)**, 718–725, doi:10.2174/1381612824666180131121940.
54. Haroun Díaz E., Martín-Pedraza L., Betancor D., Somoza M. L., Blanca-López N., Vázquez de la Torre M., Luna L., Bartolomé B., Pastor-Vargas C., Cuesta-Herranz J., Ruano F. J. Selective Allergy to Whiff (*Lepidorhombus whiffiagonis*): Identification

- of Enolase as a New Major Allergen. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2023, **33(1)**, 45–47, doi:10.18176/jiaci.0802.
55. Hilger C., van Hage M., Kuehn A. Diagnosis of Allergy to Mammals and Fish: Cross-Reactive vs. Specific Markers. *Curr Allergy Asthma Rep.*, 2017, **17(9)**, 64, doi:10.1007/s11882-017-0732-z.
 56. Yeang H. Y., Cheong K. F., Sunderasan E., Hamzah S., Chew N. P., Hamid S., Hamilton R. G., Cardosa M. J. The 14.6 kd rubber elongation factor (Hev b 1) and 24 kd (Hev b 3) rubber particle proteins are recognized by IgE from patients with spina bifida and latex allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 1996, **98(3)**, 628–639, doi.org/10.1016/s0091-6749(96)70097-0.
 57. Yu W., Freeland D. M. H., Nadeau K. C. Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.*, 2016, **16(12)**, 751–765, doi:10.1038/nri.2016.111.
 58. Yuk J. E., Lee J., Kuehn K. Y., Park K. H., Kim J. D., Kim J. T., Lee J. H., Park J. W. Allergenicity and Stability of 6 New Korean Bony Fish Extracts. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2021, **13(4)**, 623–637, doi:10.4168/aaair.2021.13.4.623.
 59. Iweala O. I., Choudhary S. K., Commins, S. P. Food Allergy. *Current gastroenterology reports*, 2018, **20(5)**, 17. doi:10.1007/s11894-018-0624-y.
 60. Jeong K.Y., Park K.H., Lee J.H., Park J.W. Monoclonal Antibodies to Recombinant Fag e 3 Buckwheat Allergen and Development of a Two-site ELISA for Its Quantification. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2017, **9(5)**, 417–422, doi.org/10.4168/aaair.2017.9.5.417.
 61. Jiang X., Rao Q. Effect of Processing on Fish Protein Antigenicity and Allergenicity. *Foods*, 2021, **10(5)**, 969, doi:10.3390/foods10050969.
 62. Jongejan L., van Ree R., Poulsen L. K. Hypoallergenic molecules for subcutaneous immunotherapy. *Expert Rev Clin Immunol*, 2016, **12(1)**, 5–7, doi:10.1586/1744666X.2016.1103182.
 63. Jutel M., Solarewicz-Madejek K., Smolinska S. Recombinant allergens: the present and the future. *Hum Vaccin Immunother*, 2012, **8(10)**, 1534–1543, doi:10.4161/hv.22064.
 64. Kalic T., Kamath S. D., Ruethers T., Taki A. C., Nugraha R., Le T. T. K., Humeniuk P., Williamson N. A., Hira D., Rolland J. M., O'Hehir R. E., Dai D., Campbell D. E., Breiteneder H., Lopata A. L. Collagen-An Important Fish Allergen for Improved Diagnosis. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2020, **8(9)**, 3084–3092, doi:10.1016/j.jaip.2020.04.063.
 65. Kalic T., Morel-Codreanu F., Radauer C., Ruethers T., Taki A. C., Swoboda I., Hilger C., Hoffmann-Sommergruber K., Ollert M., Hafner C., Lopata A. L., Morisset M., Breiteneder H., Kuehn A. Patients Allergic to Fish Tolerate Ray Based on the Low Allergenicity of Its Parvalbumin. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2019, **7(2)**, 500–508.e11, doi:10.1016/j.jaip.2018.11.011.
 66. Kalic T., Radauer C., Lopata A. L., Breiteneder H., Hafner C. Fish Allergy Around the World-Precise Diagnosis to Facilitate Patient Management. *Frontiers in allergy*, 2021, **2**, 732178, doi:10.3389/falgy.2021.732178.

67. Kawase S., Ushio H., Ohshima T., Yamanaka H., Fukuda H. Preparation of monoclonal antibodies against tuna parvalbumin. *Fisheries Science*, 2001, **67**, 559–561, 10.1046/j.1444-2906.2001.00273.x.
68. Kiyota K., Kawatsu K., Sakata J., Yoshimitsu M., Akutsu K., Kajimura K. Development of sandwich ELISA for quantification of the orange allergen profilin (Cit s 2), *Food and Agricultural Immunology*, 2016, **27(1)**, 128–137, doi: 10.1080/09540105.2015.1079599.
69. Kleine-Tebbe J. and Jakob T. Molecular Allergy Diagnostics Innovation for a Better Patient Management. *Springer*, 2017, doi: 10.1007/978-3-319-42499-6.
70. Klueber J., Schrama D., Rodrigues P., Dickel H., Kuehn A. Fish Allergy Management: From Component-Resolved Diagnosis to Unmet Diagnostic Needs. *Curr Treat Options Allergy*, 2019, **6**, 322–337, doi:10.1007/s40521-019-00235-w.
71. Kobayashi A, Tanaka H, Hamada Y, Ishizaki S, Nagashima Y, Shiomi K. Comparison of allergenicity and allergens between fish white and dark muscles. *Allergy*, 2006, **61(3)**, 357–363, doi:10.1111/j.1398-9995.2006.00966.x.
72. Kobayashi Y., Akiyama H., Hüge J., Kubota H., Chikazawa S., Satoh T., Miyake T., Uhara H., Okuyama R., Nakagawara R., Aihara M., Hamada-Sato N. Fish collagen is an important panallergen in the Japanese population. *Allergy*, 2016, **71(5)**, 720–723, doi:10.1111/all.12836.
73. Köhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, **256(5517)**, 495–497, doi:10.1038/256495a0.
74. Kondo Y., Kakami M., Koyama H., Yasuda T., Nakajima Y., Kawamura M., Tokuda R., Tsuge I., Urisu A. IgE Cross-reactivity between Fish Roe (Salmon, Herring and Pollock) and Chicken Egg in Patients Anaphylactic to Salmon Roe. *Allergology International*, 2005, **54(2)**, 317–323, doi:10.2332/allergolint.54.317.
75. Koppelman S. J., Nordlee J. A., Lee P. W., Happe R. P., Helsing M., Norland R., Manning T., Deschene R., De Jong G.A.H., Taylor S.L. Parvalbumin in fish skin-derived gelatin: is there a risk for fish allergic consumers?. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2012, **29(9)**, 1347–1355. doi:10.1080/19440049.2012.698399.
76. Kuehn A., Hilger C., Lehnert-Weber C., Codreanu-Morel F., Morisset M., Metz-Favre C., Pauli G., de Blay F., Revets D., Muller C. P., Vogel L., Vieths S., Hentges F. Identification of enolases and aldolases as important fish allergens in cod, salmon and tuna: component resolved diagnosis using parvalbumin and the new allergens. *Clin Exp Allergy*, 2013, **43(7)**, 811–822, doi:10.1111/cea.12117.
77. Kuehn A., Scheuermann T., Hilger C., Hentges F. Important variations in parvalbumin content in common fish species: a factor possibly contributing to variable allergenicity. *Int Arch Allergy Immunol*, 2010, **153(4)**, 359–366, doi:10.1159/000316346.
78. Kuehn A., Swoboda I., Arumugam K., Hilger C., Hentges F. Fish allergens at a glance: variable allergenicity of parvalbumins, the major fish allergens. *Frontiers in immunology*, 2014, **5**, 179, doi:10.3389/fimmu.2014.00179.
79. Larsen J. M., Bang-Berthelsen C. H., Qvortrup K., Sancho A. I., Hansen A. H., Andersen K. I. H., Thacker S. S. N., Eiwegger T., Upton J., Bøgh K. L. Production of

- allergen-specific immunotherapeutic agents for the treatment of food allergy. *Crit Rev Biotechnol*, 2020, **40(6)**, 881–894, doi:10.1080/07388551.2020.1772194.
80. Lee P. W., Nordlee J. A., Koppelman S. J., Baumert J. L., Taylor S. L. Evaluation and comparison of the species-specificity of 3 antiparvalbumin IgG antibodies. *J Agric Food Chem.*, 2011, **59(23)**, 12309–12316, doi:10.1021/jf203277z.
 81. Lee P. W., Nordlee J. A., Koppelman S. J., Baumert J. L., Taylor S. L. Measuring parvalbumin levels in fish muscle tissue: relevance of muscle locations and storage conditions. *Food chemistry*, 2012, **135(2)**, 502–507, doi:10.1016/j.foodchem.2012.05.030.
 82. Leenaars P. P., Hendriksen C. F., de Leeuw W. A., Carat F., Delahaut P., Fischer R., Halder M., Hanly W. C., Hartinger J., Hau J., Lindblad E. B., Nicklas W., Outschoorn I. M., Stewart-Tull D. E. The Production of Polyclonal Antibodies in Laboratory Animals. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 35. *Altern Lab Anim*, 1999, **27(1)**, 79–102, doi.org/10.1177/026119299902700106.
 83. Leung N. Y. H., Leung A. S. Y., Xu K. J. Y., Wai C. Y. Y., Lam C. Y., Wong G. W. K., Leung T. F. Molecular and immunological characterization of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) parvalbumin Cten i 1: A major fish allergen in Hong Kong. *Pediatr Allergy Immunol*, 2020, **31(7)**, 792–804, doi:10.1111/pai.13259.
 84. Liang J., Taylor S. L., Baumert J., Alice Lee N. Development of a sensitive sandwich ELISA with broad species specificity for improved fish allergen detection. *Food Chem*, 2022, **396**, 133656, doi:10.1016/j.foodchem.2022.133656.
 85. Lim D. L., Neo K. H., Yi F. C., Chua K. Y., Goh D. L., Shek L. P., Giam Y. C., Van Bever H. P., Lee B. W. Parvalbumin--the major tropical fish allergen. *Pediatr Allergy Immunol*, 2008, **19(5)**, 399–407, doi:10.1111/j.1399-3038.2007.00674.x.
 86. Lindstrøm C. D., van Dô. T., Hordvik I., Endresen C., Elsayed S. Cloning of two distinct cDNAs encoding parvalbumin, the major allergen of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Scand J Immunol*, 1996, **44(4)**, 335–344, doi:10.1046/j.1365-3083.1996.d01-314.x.
 87. Liu C., Sathé S. K. Food Allergen Epitope Mapping. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2018, **66(28)**, 7238–7248, doi:10.1021/acs.jafc.8b01967.
 88. Liu R., Yang E., Liu C., Xue W. Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) allergens characterized by ELISA, SDS-PAGE, 2D gels, Western blotting and MALDI-TOF mass spectrometry. *Int J Food Sci Nutr.*, 2012, **63(3)**, 259–266, doi:10.3109/09637486.2011.619966.
 89. Liu R., Krishnan H. B., Xue W., Liu C. Characterization of allergens isolated from the freshwater fish blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *J Agric Food Chem*, 2011, **59(1)**, 458–463, doi:10.1021/jf103942p.
 90. Lombardero M., Quirce S., Duffort O., Barber D., Carpizo J., Chamorro M. J., Lezaun A., Carreira J. Monoclonal antibodies against *Olea europaea* major allergen: allergenic activity of affinity-purified allergen and depleted extract and development of a radioimmunoassay for the quantitation of the allergen. *J Allergy Clin Immunol*, 1992, **89(4)**, 884–894, doi.org/10.1016/0091-6749(92)90445-8.

91. Lorenz A. R., Scheurer S., Hausteijn D., Vieths S. Recombinant food allergens. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001, **756(1–2)**, 255–279, doi:10.1016/s0378-4347(01)00086-x.
92. Loureiro L. R., Carrascal M. A., Barbas A., Ramalho J. S., Novo C., Delannoy P., Videira P. A. Challenges in Antibody Development against Tn and Sialyl-Tn Antigens. *Biomolecules*, 2015, **5(3)**, 1783–1809, doi:10.3390/biom5031783.
93. Ma Y., Griesmeier U., Susani M., Radauer C., Briza P., Erler A., Bublin M., Alessandri S., Himly M., Vázquez-Cortés S., de Arellano I. R., Vassilopoulou E., Saxoni-Papageorgiou P., Knulst A. C., Fernández-Rivas M., Hoffmann-Sommergruber K., Breiteneder H. Comparison of natural and recombinant forms of the major fish allergen parvalbumin from cod and carp. *Mol Nutr Food Res*, 2008, **52(2)**, 196–207, doi.org/10.1002/mnfr.200700284.
94. Mayorga C., Palomares F., Cañas J. A., Pérez-Sánchez N., Núñez R., Torres M. J., Gómez F. New Insights in Therapy for Food Allergy. *Foods*, 2021, **10**, 1037, doi:10.3390/foods10051037.
95. Matricardi P. M., Kleine-Tebbe J., Hoffmann H. J., Valenta R., Hilger C., Hofmaier S., Aalberse R. C., Agache I., Asero R., Ballmer-Weber B., Barber D., Beyer K., Biedermann T., Bilò M. B., Blank S., Bohle B., Bosshard P. P., Breiteneder H., Brough H. A., Caraballo L., Caubet J. C., Cramer R., Davies J. M., Douladiris N., Ebisawa M., Eigenmann P. A., Fernandez-Rivas M., Ferreira F., Gadermaier G., Glatz M., Hamilton R. G., Hawranek T., Hellings P., Hoffmann-Sommergruber K., Jakob T., Jappe U., Jutel M., Kamath S. D., Knol E. F., Korosec P., Kuehn A., Lack G., Lopata A. L., Mäkelä M., Morisset M., Niederberger V., Nowak-Węgrzyn A. H., Papadopoulos N. G., Pastorello E. A., Pauli G., Platts-Mills T., Posa D., Poulsen L. K., Raulf M., Sastre J., Scala E., Schmid J. M., Schmid-Grendelmeier P., van Hage M., van Ree R., Vieths S., Weber R., Wickman M., Muraro A., Ollert M. EAACI Molecular Allergy User's Guide. *Pediatr Allergy Immunol*, 2016, **27(23)**, 1–250, doi:10.1111/pai.12563.
96. Minic R., Zivkovic I. Optimization, Validation and Standardization of ELISA. *ELISA Test-Perspectives and Applications*, 2020, doi:10.5772/intechopen.94338.
97. Mitra S., Tomar P. C. Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. *J Genet Eng Biotechnol*, 2021, **19**, 159, doi:10.1186/s43141-021-00264-6.
98. Mohammadi M., Mokhtarian K., Kardar G. A., Farrokhi S., Sadroddiny E., Khorramizadeh M. R., Falak R. Expression of recombinant parvalbumin from wolf-herring fish and determination of its IgE binding capability. *Food and Agricultural Immunology*. 2017, **28(4)**, 573–585, doi: 10.1080/z09540105.2017.1306493.
99. Morales-Amparano M. B., Huerta-Ocampo J. Á., Pastor-Palacios G., Teran L. M. The Role of Enolases in Allergic Disease. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2021, **9(8)**, 3026–3032, doi:10.1016/j.jaip.2021.04.005.
100. Mrkvová M., Hančinský R., Grešíková S., Kaňuková Š., Barilla J., Glasa M., Hauptvogel P., Kraic J., Mihálik D. Evaluation of New Polyclonal Antibody Developed for Serological Diagnostics of Tomato Mosaic Virus. *Viruses*, 2022, **14(6)**, 1331, doi: 10.3390/v14061331.

101. Mueller G. A., Gosavi R. A., Pomés A., Wünschmann S., Moon A. F., London R. E., Pedersen L. C. Ara h 2: crystal structure and IgE binding distinguish two subpopulations of peanut allergic patients by epitope diversity. *Allergy*, 2011, **66**(7), 878–885, doi.org/10.1111/j.1398-9995.2010.02532.x.
102. Murphy K., Weaver C. Janeway's Immunobiology. 9th Edition. *Garland Science/Taylor & Francis Group*, 2017.
103. Nakagawa T., Nagayama F. Enzymatic properties of enolase from fish muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 1991, **98**(2–3), 355–359, doi:10.1016/0305-0491(91)90190-O.
104. Nelson P. N., Reynolds G. M., Waldron E. E., Ward E., Giannopoulos K., Murray P.G. Monoclonal antibodies. *Mol Pathol*, 2000, **53**(3), 111–7, doi:10.1136/mp.53.3.111.
105. Panawala L. Difference Between Monoclonal and Polyclonal Antibodies, 2017. https://www.researchgate.net/publication/320707210_Difference_Between_Monoclonal_and_Polyclonal_Antibodies#fullTextFileContent.
106. Pekar J., Ret D., Untersmayr E. Stability of allergens. *Molecular immunology*, 2018, **100**, 14–20, doi:10.1016/j.molimm.2018.03.017.
107. Peñas E., Uberti F., Baviera G., Di Lorenzo C., Restani P. Clinical monosensitivity to salmon and rainbow trout: a case report. *Pediatr Allergy Immunol*, 2014, **25**(1), 98–100. <https://doi.org/10.1111/pai.12150>.
108. Pérez-Tavarez R., Carrera M., Pedrosa M., Quirce S., Rodríguez-Pérez R., Gasset M. Reconstruction of fish allergenicity from the content and structural traits of the component β -parvalbumin isoforms. *Sci Rep*, 2019, **9**(1), 16298, doi:10.1038/s41598-019-52801-6.
109. Pérez-Tavarez R., Moreno H. M., Borderias J., Loli-Ausejo D., Pedrosa M., Hurtado J. L., Rodríguez-Pérez R., Gasset M. Fish muscle processing into seafood products reduces β -parvalbumin allergenicity. *Food chemistry*, 2021, **364**, 130308, doi:10.1016/j.foodchem.2021.130308.
110. Rodgers P. M. Food Allergies Symptoms, Diagnosis, and Treatment. *Nova Science Publishers Inc*, 2011. <https://ebookcentral.proquest.com/lib/viluniv-ebooks/detail.action?pq-origsite=primo&docID=3020299>.
111. Rosmilah M., Shahnaz M., Meinir J., Masita A., Noormalin A., Jamaluddin M. Identification of parvalbumin and two new thermolabile major allergens of *Thunnus tonggol* using a proteomics approach. *Int Arch Allergy Immunol*, 2013, **162**(4), 299–309, doi:10.1159/000354544.
112. Rudzevičienė O. Alergija Maistui: Studijų Kursas. *Vilniaus Universiteto Leidykla*, 2021.
113. Ruethers T., Taki A. C., Johnston E. B., Nugraha R., Le T. T. K., Kalic T., McLean T. R., Kamath S. D., Lopata A. L. Seafood allergy: A comprehensive review of fish and shellfish allergens. *Molecular immunology*, 2018, **100**, 28–57, doi:10.1016/j.molimm.2018.04.008.
114. Ruethers T., Taki A. C., Karnaneedi S., Nie, S., Kalic T., Dai, D., Daduang S., Leeming M., Williamson N. A., Breiteneder H., Mehr S. S., Kamath S. D., Campbell

- D. E., Lopata A. L. Expanding the allergen repertoire of salmon and catfish. *Allergy*, 2021, **76(5)**, 1443–1453, doi:10.1111/all.14574.
115. Ruethers T., Taki A. C., Khangurha J., Roberts J., Buddhadasa S., Clarke D., Hedges C. E., Campbell D. E., Kamath S. D., Lopata A. L., Koeberl M. Commercial fish ELISA kits have a limited capacity to detect different fish species and their products. *J Sci Food Agric*, 2020, **100(12)**, 4353–4363, doi:10.1002/jsfa.10451.
116. Ruethers T., Taki A. C., Nugraha R., Cao T. T., Koeberl M., Kamath S. D., Williamson N. A., O'Callaghan S., Nie, S. Mehr, S. S. Campbell, D. E., Lopata A. L. Variability of allergens in commercial fish extracts for skin prick testing. *Allergy*, 2019, **74(7)**, 1352–1363, doi:org/10.1111/all.13748.
117. Sakamoto S., Putalun W., Vimolmangkang S., Phoolcharoen W., Shoyama Y., Tanaka H., Morimoto, S. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *Journal of natural medicines*, 2018, **72(1)**, 32–42, doi:10.1007/s11418-017-1144-z.
118. Sampath V., Sindher S. B., Alvarez Pinzon A. M., Nadeau K. C. Can food allergy be cured? What are the future prospects?. *Allergy*, 2020, **75(6)**, 1316–1326, doi:10.1111/all.14116.
119. Schroeder H. W. Jr, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125(2,2), S41–S52, doi:10.1016/j.jaci.2009.09.046.
120. Sharp M. F., Lopata A. L. Fish allergy: in review. *Clin Rev Allergy Immunol.*, 2014, **46(3)**, 258–271, doi:10.1007/s12016-013-8363-1.
121. Sharp M. F., Stephen J. N., Kraft L., Weiss T., Kamath S. D., Lopata A. L. Immunological cross-reactivity between four distant parvalbumins-Impact on allergen detection and diagnostics. *Mol Immunol*, 2015, **63(2)**, 437–448. doi:10.1016/j.molimm.2014.09.019.
122. Shibahara Y., Uesaka Y., Wang J., Yamada S., Shiomi K. A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of fish protein in processed foods. *Food Chem*, 2013, **136(2)**, 675–681, doi:10.1016/j.foodchem.2012.08.066.
123. Shrivastava A. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, 2011, **2**, 21–25, doi:10.4103/2229-5186.79345.
124. Slizienė A., Plečkaitytė M., Zaveckas M., Juškaitė K., Rudokas V., Žvirblis G., Žvirblienė A. Monoclonal antibodies against the newly identified allergen β -enolase from common carp (*Cyprinus carpio*). *Food and Agricultural Immunology*, 2022, **33(1)**, 129–149, doi:10.1080/09540105.2022.2028741.
125. Spring T. G., Wold, F. The purification and characterization of *Escherichia coli* enolase. *The Journal of biological chemistry*, 1971, **246(22)**, 6797–6802, doi:10.1016/S0021-9258(19)45916-4.
126. Stewart G. A., Peden D. B., Thompson P. J., Ludwig M. Allergens and air pollutants. 4th Edition. *Allergy*, 2012, 73–128, doi:10.1016/B978-0-7234-3658-4.00009-3.
127. Sun L., Xu L., Huang Y., Lin H., Ahmed I., Li Z. Identification and comparison of allergenicity of native and recombinant fish major allergen parvalbumins from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Food Funct.* 2019, **10(10)**, 6615–6623, doi:10.1039/c9fo01402k.

128. Swoboda I., Bugajska-Schretter A., Linhart B., Verdino P., Keller W., Schulmeister U., Sperr W. R., Valent P., Peltre G., Quirce S., Douladiris N., Papadopoulos N. G., Valenta R., Spitzauer S. A recombinant hypoallergenic parvalbumin mutant for immunotherapy of IgE-mediated fish allergy. *Journal of immunology*, 2007, **178(10)**, 6290–6296, doi:10.4049/jimmunol.178.10.6290.
129. Swoboda I., Bugajska-Schretter A., Valenta R., Spitzauer S. Recombinant fish parvalbumins: Candidates for diagnosis and treatment of fish allergy. *Allergy*, 2002a, **57(72)**, 94–96, doi:10.1034/j.1398-9995.57.s72.21.x.
130. Swoboda I., Bugajska-Schretter A., Verdino P., Keller W., Sperr W. R., Valent P., Valenta R., Spitzauer S. Recombinant carp parvalbumin, the major cross-reactive fish allergen: a tool for diagnosis and therapy of fish allergy. *J Immunol*, 2002b, **168(9)**, 4576–4584, doi:10.4049/jimmunol.168.9.4576.
131. Tabll A., Abbas A. T., El-Kafrawy S., Wahid A. Monoclonal antibodies: Principles and applications of immunodiagnosis and immunotherapy for hepatitis C virus. *World J Hepatol*, 2015, **7(22)**, 2369–2383, doi:10.4254/wjh.v7.i22.2369.
132. Tamošiūnas V. A., Dubakienė R., Žvirblienė A. Aiškinamasis imunologijos ir alergologijos terminų žodynas. *Mokslo ir enciklopedijų leidybos centras*, 2012.
133. Tamošiūnas V. A., Kvietkauskaitė R., Pumputienė I. Imunologijos ir imunotechnologijos pagrindai: vadovėlis. Vytauto Didžiojo universitetas, *Versus aureus*, 2015, <http://ebooks.vdu.lt/eb/1575/imunologijos-ir-imunotechnologijos-pagrindai/>.
134. Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **60(5)**, 523–533, doi:10.1007/s00253-002-1158-6/
135. Tamm J. M., van Do T., Jende C., Simon J. C., Treudler R., von Bergen M., Averbeck M. Identification of new potential allergens from Nile perch (*Lates niloticus*) and cod (*Gadus morhua*). *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2013, **23(3)**, 159–167, <https://www.jiacci.org/issues/vol23issue3/4.pdf>.
136. Tscheppe A., Breiteneder H. Recombinant Allergens in Structural Biology, Diagnosis, and Immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol*, 2017, **172(4)**, 187–202, doi:10.1159/000464104.
137. Tuppo L., Giangrieco I., Tamburrini M., Alessandri C., Mari A., Ciardiello M. A. Detection of Allergenic Proteins in Foodstuffs: Advantages of the Innovative Multiplex Allergen Microarray-Based Immunoassay Compared to Conventional Methods. *Foods*, 2022, **11(6)**, 878, doi:10.3390/foods11060878.
138. Valenta R., Karaulov A., Niederberger V., Zhernov Y., Elisyutina O., Campana R., Focke-Tejkl M., Curin M., Namazova-Baranova L., Wang J. Y., Pawankar R., Khaito, M. Allergen Extracts for In Vivo Diagnosis and Treatment of Allergy: Is There a Future?. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2018, **6(6)**, 1845–1855.e2, doi:10.1016/j.jaip.2018.08.032.
139. van der Ventel M. L., Nieuwenhuizen N. E., Kirstein F., Hikuam C., Jeebhay M. F., Swoboda I., Brombacher F., Lopata A. L. Differential responses to natural and recombinant allergens in a murine model of fish allergy. *Molecular immunology*, 2011, **48(4)**, 637–646, doi:10.1016/j.molimm.2010.11.001.

140. Van Do T., Elsayed S., Florvaag E., Hordvik I., Endresen C. Allergy to fish parvalbumins: studies on the cross-reactivity of allergens from 9 commonly consumed fish. *J Allergy Clin Immunol*, 2005b, **116(6)**, 1314–1320, doi.org:10.1016/j.jaci.2005.07.033.
141. Van Do T., Hordvik I., Endresen C., Elsayed S. Characterization of parvalbumin, the major allergen in Alaska pollack, and comparison with codfish Allergen M. *Mol Immunol*, 2005a, **42(3)**, 345–353, doi:10.1016/j.molimm.2004.09.001.
142. Van Do T., Hordvik I., Endresen C., Elsayed S. Expression and analysis of recombinant salmon parvalbumin, the major allergen in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Scand J Immunol*, 1999, **50(6)**, 619–625, doi:10.1046/j.1365–3083.1999.00637.
143. Van Do T., Hordvik I., Endresen C., Elsayed S. The major allergen (parvalbumin) of codfish is encoded by at least two isotypic genes: cDNA cloning, expression and antibody binding of the recombinant allergens. *Mol Immunol*, 2003, **39(10)**, 595–602, doi:10.1016/s0161-5890(02)00200-6.
144. van Neerven R. J., Sparholt S. H., Schou C., Larsen J. N. Preserved epitope-specific T cell activation by recombinant Bet v 1-MBP fusion proteins. *Clin Exp Allergy*, 1998, **28(4)**, 423–433, doi:10.1046/j.1365-2222.1998.00259.x.
145. Waugh D. S. The remarkable solubility-enhancing power of Escherichia coli maltose-binding protein. Niezwykła zdolność MBP Escherichia coli do zwiększania rozpuszczalności innych białek. *Postepy Biochem*, 2016, **62(3)**, 377–382, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28132493/>.
146. Weber P., Steinhart H., Paschke A. Competitive indirect ELISA for the determination of parvalbumins from various fish species in food grade fish gelatins and isinglass with PARV-19 anti-parvalbumin antibodies. *J Agric Food Chem*, 2009, **57(23)**, 11328–11334, doi:10.1021/jf902470e.
147. Wüthrich B. History of food allergy. *Chemical immunology and allergy*, 2014, **100**, 109–119, doi:10.1159/000358616.
148. Zhang M., Li M., Zhao Y., Naifeng X., Peng L., Wang Y., Wei X. Novel monoclonal antibody sandwich immunochromatographic assay based on Fe₃O₄/Au nanoparticles for rapid detection of fish allergen parvalbumin. *Food Research International*, 2021, **142(5)**, 110102, doi:10.1016/j.foodres.2020.110102.
149. Zhernov Y., Curin M., Khaitov M., Karaulov A., Valenta R. Recombinant allergens for immunotherapy: state of the art. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2019, **19(4)**, 402–414, doi:10.1097/ACI.0000000000000536.
150. Zlatina K., Galuska S. P. Immunoglobulin Glycosylation - An Unexploited Potential for Immunomodulatory Strategies in Farm Animals. *Front Immunol*, 2021, **12**, 753294, doi: 10.3389/fimmu.2021.753294.
151. Zuidmeer-Jongejan L., Huber H., Swoboda I., Rigby N., Versteeg S. A., Jensen B. M., Quaak S., Akkerdaas J. H., Blom L., Asturias J., Bindslev-Jensen C., Bernardi M. L., Clausen M., Ferrara R., Hauer M., Heyse J., Kopp S., Kowalski M. L., Lewandowska-Polak A., Linhart B., van Ree R. Development of a hypoallergenic recombinant parvalbumin for first-in-man subcutaneous immunotherapy of fish allergy. *Int Arch Allergy Immunol*, 2015, **166(1)**, 41–51, doi:10.1159/000371657.

PRIEDAI

1 priedas. Keletas alergenų šaltinių (pritaikyta pagal Stewart et al., 2012).

Alergenų grupės	Alergenų šaltiniai
<i>Gyvūnų pleiskanos ir šlapimas</i>	Katė, šuo, arklys, triušis, karvė, t. t.
<i>Paukščių plunksnos</i>	Papūga, balandis, višta, t. t.
<i>Grūdų miltai</i>	Kviečiai, rugiai, avižos, t. t.
<i>Žolės</i>	Motiejukas, varputis, t. t.
<i>Piktžolės</i>	Kietis, ambrozija, t. t.
<i>Medžiai</i>	Alksnis, beržas, lazdynas, kipras, t. t.
<i>Namų dulkių erkės</i>	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> , <i>Dermatophagoides farinae</i> , <i>Euroglyphus maynei</i> , t. t.
<i>Vabzdžiai</i>	Tarakonas, bičių ir vapsvų įgėlimai, skruzdėlių ir uodų įkandimai, t. t.
<i>Pelėsiniai grybai</i>	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Cladosporium</i> spp., <i>Alternaria</i> spp, t. t.
<i>Kiti</i>	Lateksas, papainas, bromelainas, t. t.
<i>Vaistai</i>	Penicilinas, sulfonamidai ir kiti antibiotikai, t. t.
<i>Maistas</i>	Jūros gėrybės, pienas, kiaušiniai, t. t.

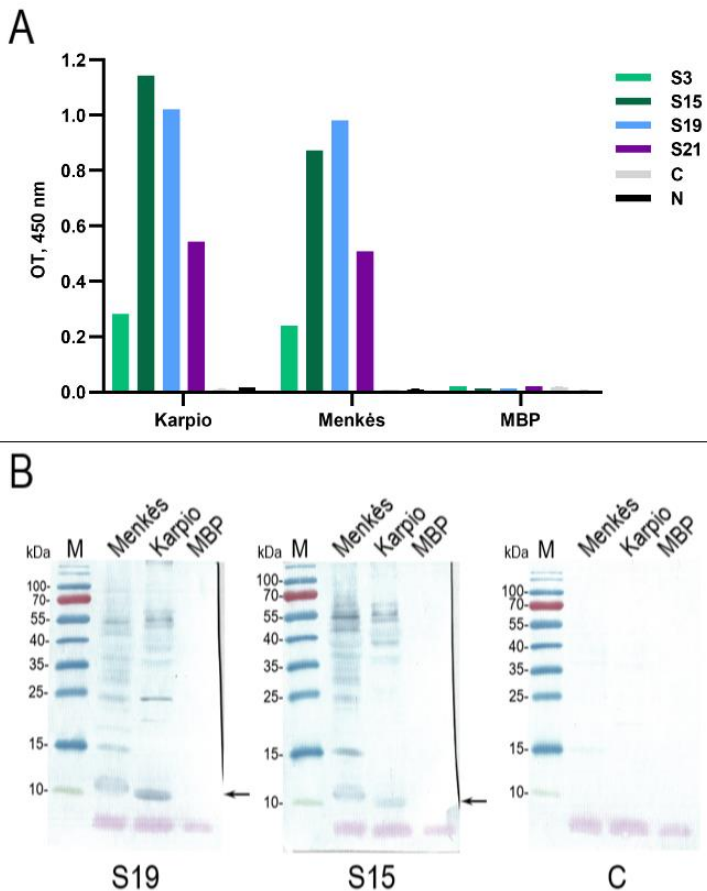
2 priedas. Alergenų baltymų šeimos (pritaikyta pagal Csonka, 2021; Rudzevičienė, 2021).

Baltymų šeima	Molekulinė masė (kDa)	Alergeno šaltinis	Aprašymas	Stabilumas	Alergenų komponentų pavyzdžiai
<i>PR-10</i> (su patogenezės susijusi 10-oji baltymų šeima)	16–22	Beržinių ir bukinių šeimų žiedadulkės; vaisiai; daržovės; riešutai	Stiprūs kryžminiai alergenai; termiškai neapdoroti dažnai sukelia žiedadulkių ir maisto alergijos sindromo simptomus	Labilūs	Aln g 1 (alksnis); Api g 1 (salierai); Bet v 1 (beržas); Cas s 1 (kaštainis); Cor a 1 (lazdynų riešutai); Dau c 1 (morkos); Fag s 1 (bukas); Gly m 4 (soja); Mal d 1 (obuoliai); Pru p 1 (persikas)
<i>2S albuminai</i>	9–17	Riešutai, sėklos, ankštiniai augalai	Kaupimo baltymai; dažnai sukelia sunkias alergines reakcijas	Stabilūs	Ana o 3 (anakardžių riešutai); Ara h 2, Ara h 6 (žemės riešutai); Cor a 14 (lazdynų riešutai); Jug r 1 (graikiniai riešutai); Pis v 1 (pistacijų); Ses i 1 (sezamų sėklos); Sin a 1 (garstyčių sėklos)
<i>7S globulinai (vicilinai)</i>	63–65				Ara h 1 (žemės riešutai); Gly m 5 (soja); Jug r 2 (graikinis riešutas); Ses i 3 (sezamų sėklos)
<i>11S globulinai (leguminai)</i>	52–61				Ara h 3 (žemės riešutai); Ber e 2 (Brazilinės bertoletijos); Gly m 6 (soja); Ses i 6 (sezamų sėklos)
<i>Profilinai</i>	14–15	Žiedadulkės, vaisiai, daržovės, riešutai, lateksas	Stiprūs kryžminiai alergenai; termiškai neapdoroti dažnai sukelia žiedadulkių ir maisto alergijos sindromo simptomus	Labilūs	Api g 4 (salierai); Ara h 5 (žemės riešutai); Bet v 2 (beržas); Hev b 8 (lateksas); Mal d 4 (obuoliai); Ole e 2 (alyvuogės); Phl p 12 (motiejukai); Pru p 4 (persikai)

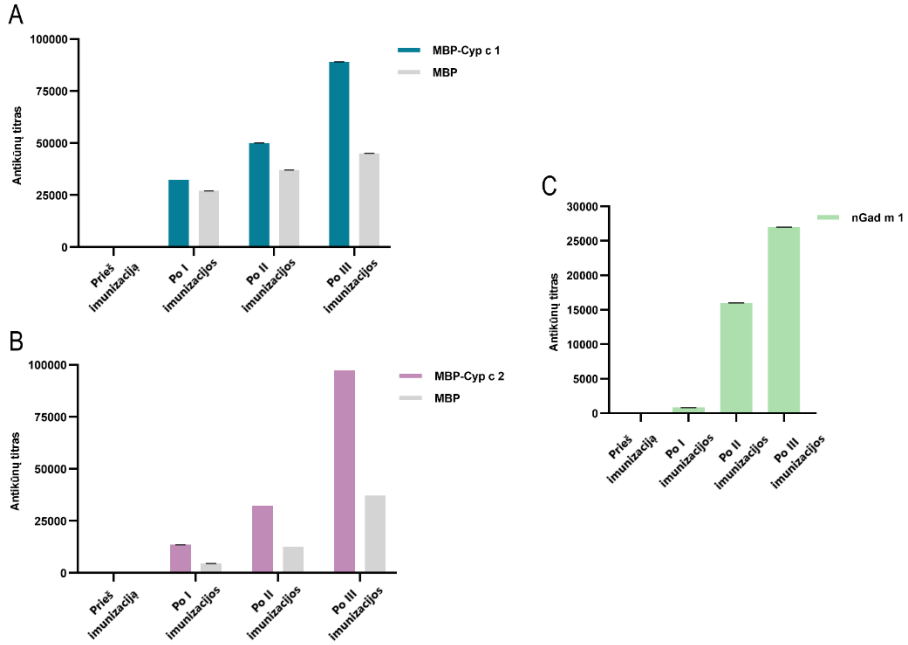
<i>nsLTP (nespecifiniai lipidus pernešantys baltymai)</i>	9–10	Riešutai, sėklos, vaisiai, daržovės, žiedadulkės, javų grūduose	Apsaugo augalus nuo grybų, bakterijų ir kt.	Stabilūs	Act d 10 (kivio vaisiai); Api g 2 (salierai); Ara h 9 (žemės riešutai); Art v 3 (kiečiai); Cor a 8 (lazdyno riešutai); Jug r 3 (graikiniai riešutai); Mus a 3 (bananai); Pru d 3 (slyvos); Pru p 3 (persikai); Sola l 3 (pomidorai)
<i>Javų prolaminai (omega-5-gliadinas, alfa-beta-gliadinas, didelės molekulinės masės gluteninas)</i>	65, 30–45, 88	Kviečiai, miežiai, rugiai	Javų grūdų kaupimo baltymai; aptinkami tik javuose; kryžmiškai nereaguoja su riešutų, sėklų ir ankštinių augalų kaupimo baltymais	Stabilūs	Tri a 19 (kviečiai); Tri a 21 (kviečiai); Tri a 26 (kviečiai)
<i>Tropomiozinai</i>	32–38	Vėžiagyviai, moliuskai, apvaliosios kirmėlės, erkės, tarakonai	Kryžminiai alergenai; dažnai sukelia sunkias ūmines alergines reakcijas	Stabilūs	Bla g 7 (tarakonai); Der p 10 (namų dulkių erkė); Pen i 1 (krevetė)
<i>Serumo albuminai</i>	60–69	Gyvūnų seilės, pleiskanos, serumas	Alergijos gyvūnams atvejais stiprūs kryžminiai alergenai (mažieji alergenai)	Dalinai labilūs	Bos d 6 (karvė); Can f 3 (šuo); Cav p 4 (jūrų kiaulytė); Equ c 3 (arklys); Fel d 2 (katė); Gal d 5 (višta); Sus s 1 (kiaulė)
<i>Bifunkciniai inhibitoriai</i>	13–14,5	Javai	Aptinkami tik javuose (kviečiuose, miežiuose, ryžiuose); pagrindinė kepėjų atsmos priežastis	Stabilūs	Tri a 29 (kviečiai); Hor v 15 (miežiai)

<i>Parvalbuminai</i>	10–12	Žuvis	Koncentracijos skirtingose žuvų rūšyse žymiai skiriasi; dažnos kryžminės reakcijos su kitos žuvies rūšies parvalbuminiais; dažnai sukelia sunkias alergines reakcijas	Stabilūs	Cyp c 1 (karpis); Gad c 1 (menkė); Sal s 1 (lašiša); Thu a 1 (tunas)
<i>Lipokalinai</i>	20–25	Žinduoliai, erkės, tarakonai	Alergijos gyvūnams atvejais yra svarbiausia baltymų šeima (pleiskanos, išskyros). Taip pat aptinkami žinduolių serume (β-laktoglobulinas)	Dalinai labilūs	Bos d 2 (karvė); Can f 1 (šuo); Can f 2 (šuo); Equ c 1 (arklys); Fel d 4 (katė)
<i>Polkalcinai</i>	6–8	Žiedadulkės	Kalcio jonus surišantys baltymai, kurių specifinė biologinė funkcija dar neiširta	Labilūs	Bet v 4 (beržas); Ory s 7 (ryžiai); Phl p 7 (motiejukas)

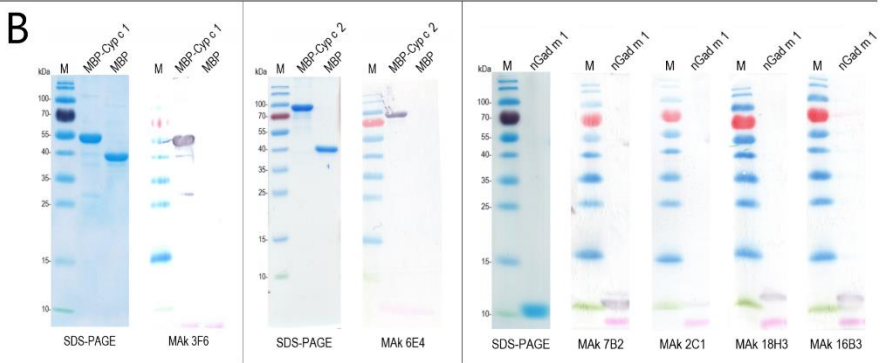
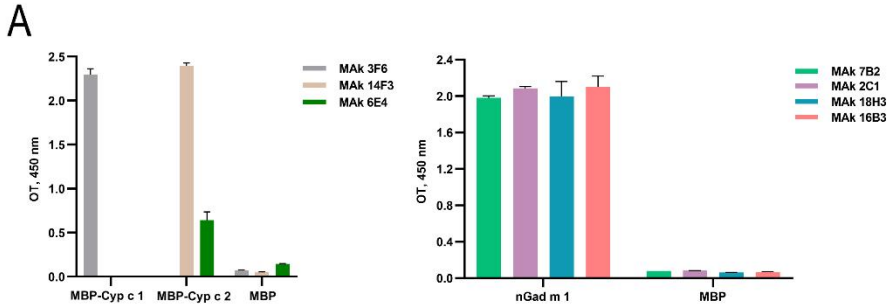
3 priedas. Žuviai alergiškų pacientų kraujo serumuose esančių IgE sąveikos su menkės ir karpio ekstraktais (DST) analizė netiesioginės IFA (A) ir imunobloto (B) metodais. S3, S15, S19 ir S21: serumo mėginiai pacientų, kuriems patvirtinta alergija žuviai; C: serumo mėginiai sveikų pacientų; N: neigiama kontrolė, inkubacija be serumo mėginio, tik su pelės antikūnais prieš žmogaus IgE Fc-HRP (SouthernBiotech). A dalyje serumo mėginiai buvo skiesti su RotiBlock-T tirpalu santykiu 1:10. Žuviai alergiškų pacientų serumo mėginių matavimai atlikti be pakartojimų. C ir N mėginių matavimai atlikti su dviem pakartojimais. B dalyje serumo mėginiai skiesti santykiu 1:50 su su blokavimo tirpalu, turinčiu 0,1 % Tween-2. Rodykle nurodomas β -parvalbuminas (11–12 kDa).



4 priedas. Antigenams specifinių antikūnų titro nustatymas hibridizacijai atrinktų pelių kraujo mėginiuose netiesioginės IFA metodu. Pelės buvo imunizuotos skirtingais antigenais: rekombinantiniu MBP-Cyp c 1 (A), rekombinantiniu MBP-Cyp c 2 (B) ir nGad m 1 (C). A ir B dalyje kraujo mėginiai tikrinti ir su rekombinantiniu MBP baltymu.

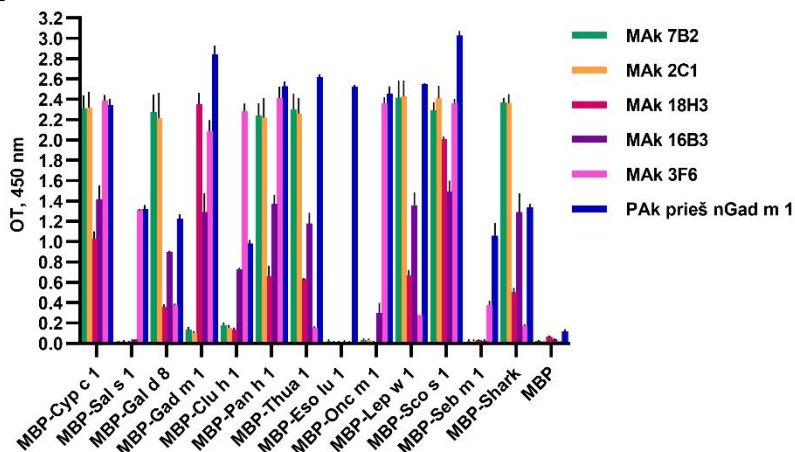


5 priedas. MAK sąveikos su antigenais analizė netiesioginės IFA (A) ir imunobloto (B) metodais. Tikrinta su neskiestomis hibridomų augimo terpėmis. A dalyje matavimai atlikti su pakartojimais. B dalyje: kairėje – SDS-PAGE; dešinėje – imunoblotas su MAK. M – baltymų molekulinio svorio standartas (Thermo Fisher Scientific), MBP-Cyp c 1 (55,7 kDa), MBP-Cyp c 2 (91, 7 kDa), nGad m 1 (11,3 kDa).

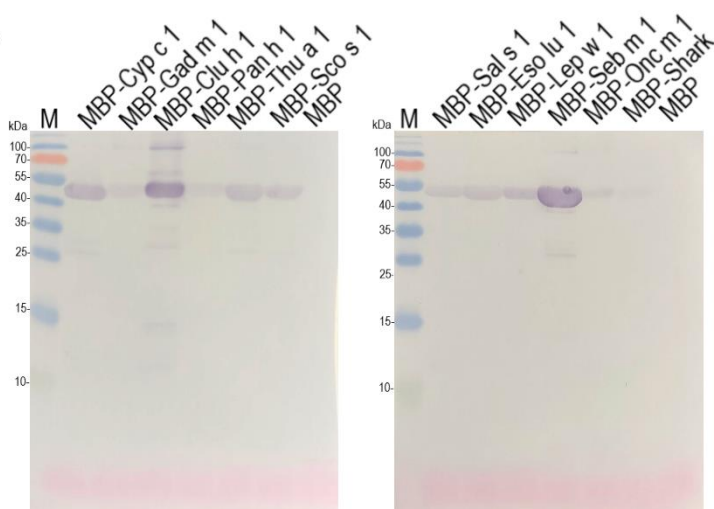


6 priedas. MAk prieš žuvų parvalbuminus ir PAK prieš nGad m 1 sąveikos su rekombinantiniais alergenuis analizė netiesioginės IFA (A) metodu. Taip pat PAK prieš nGad m 1 sąveikos su rekombinantiniais alergenuis analizė imunobloto (B) metodu. A dalyje matavimai atlikti su pakartojimais.

A

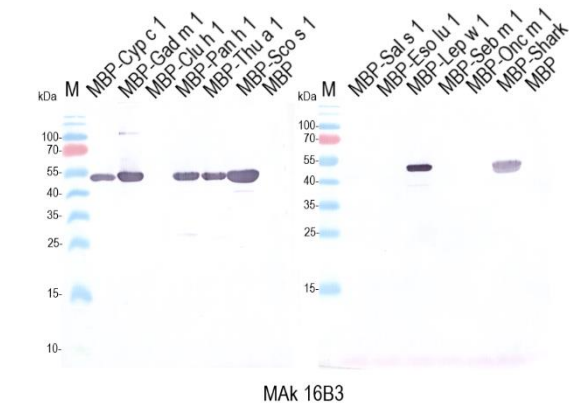
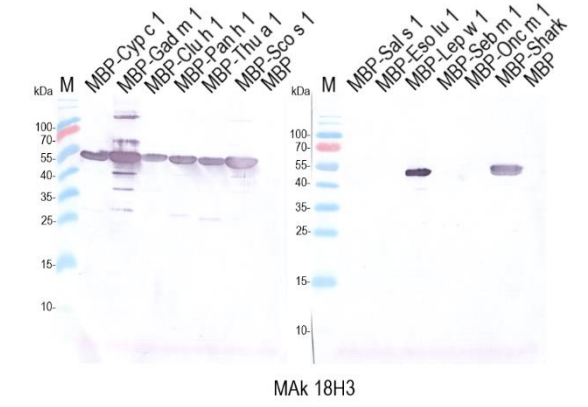
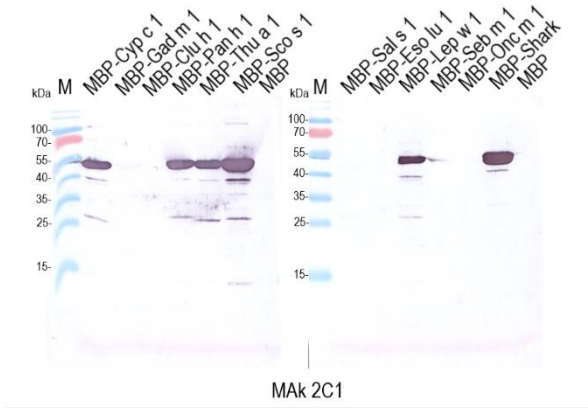


B

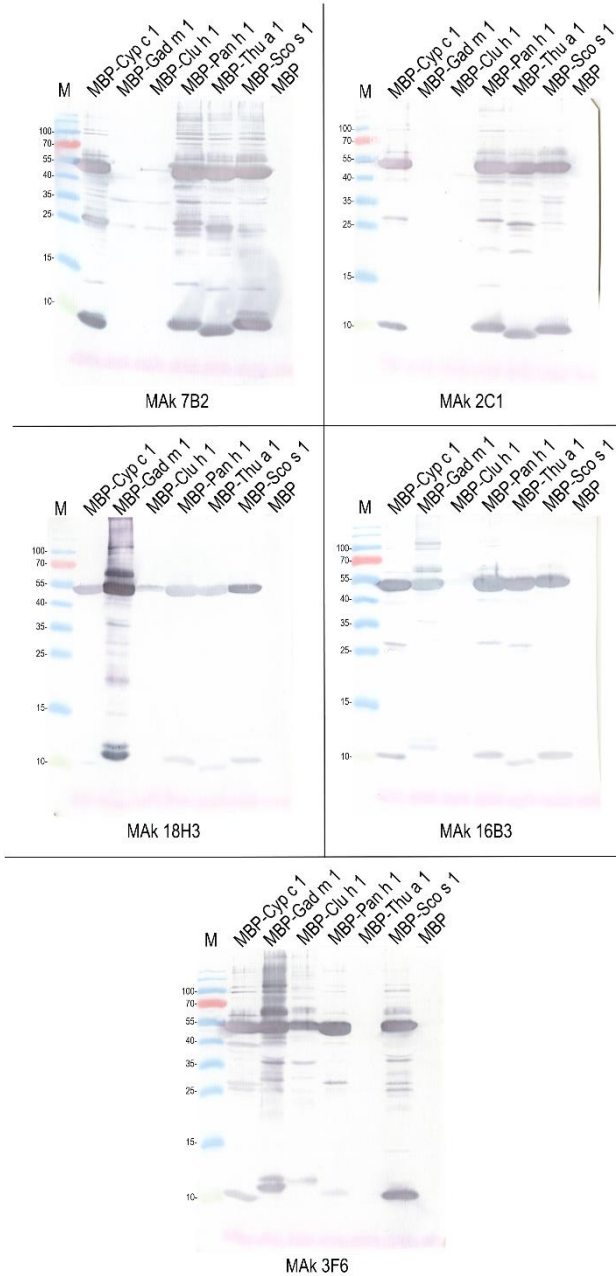


PAk prieš nGad m 1

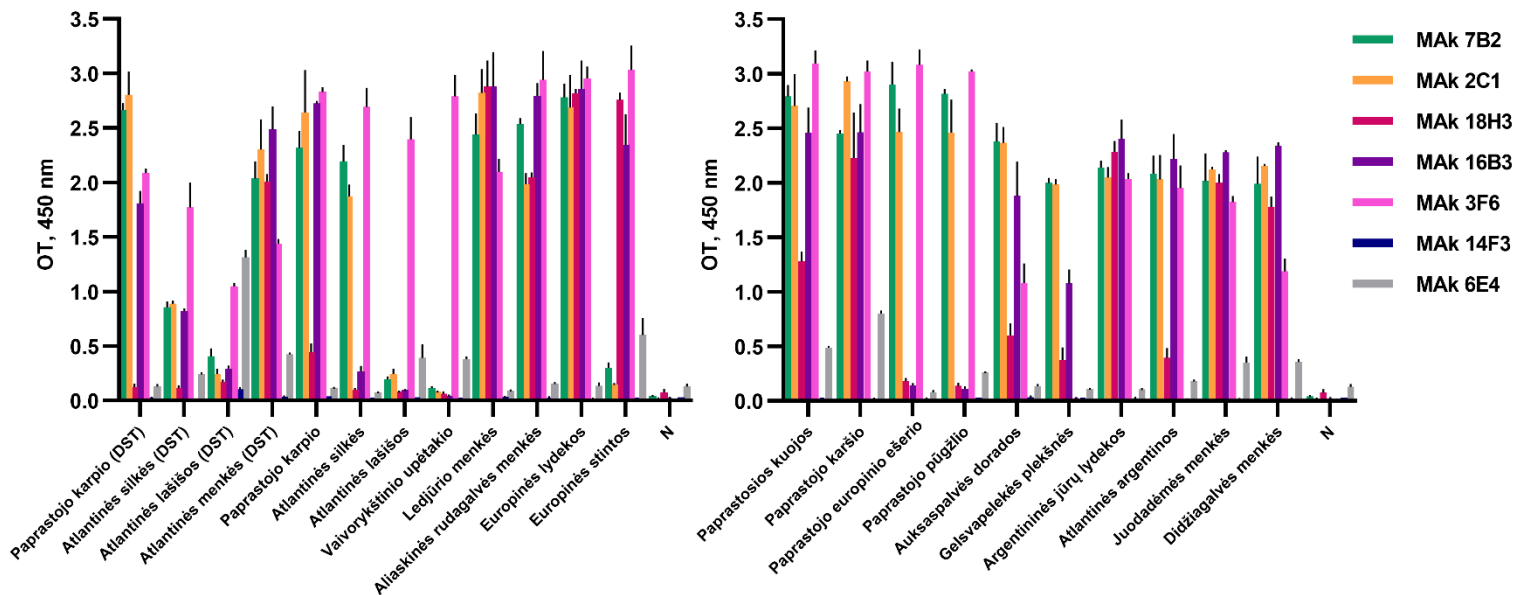
7 priedas. MAK 2C1, 18H3 ir 16B3 sąveikos su rekombinantiniais alergeneis analizė imunobloto metodu. M – baltymų molekulinio svorio standartas (Thermo Fisher Scientific).



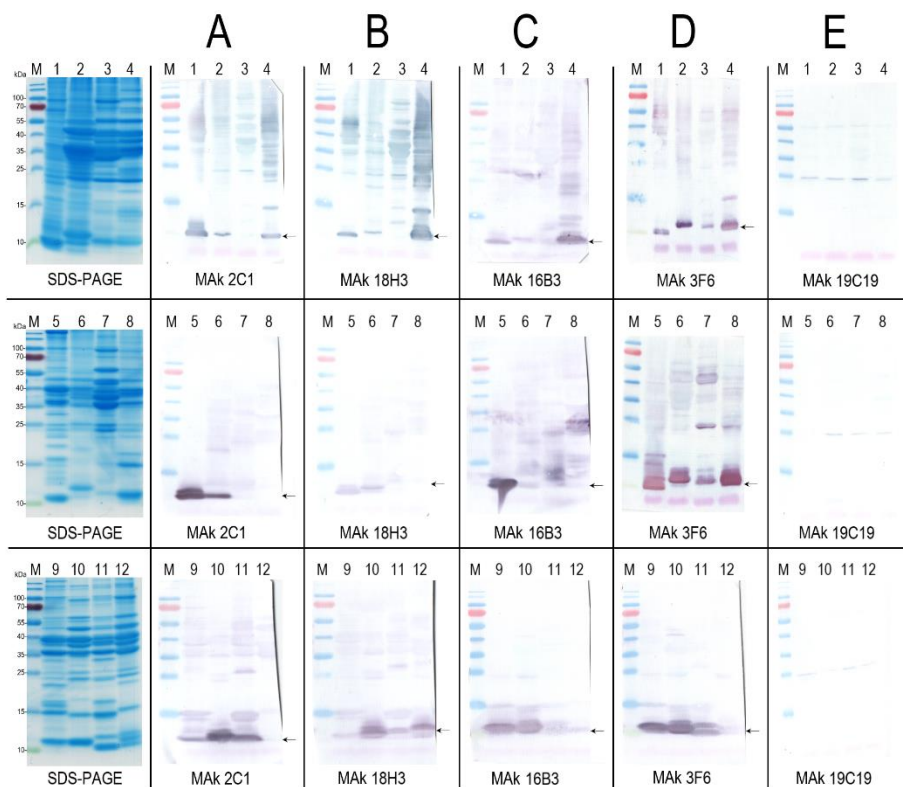
8 priedas. MAK prieš žuvų parvalbuminus sąveikos su rekombinantiniais alergenais, inkubuotais su TEV proteaze, analizė imunobloto metodu. M – baltymų molekulinio svorio standartas (Thermo Fisher Scientific).



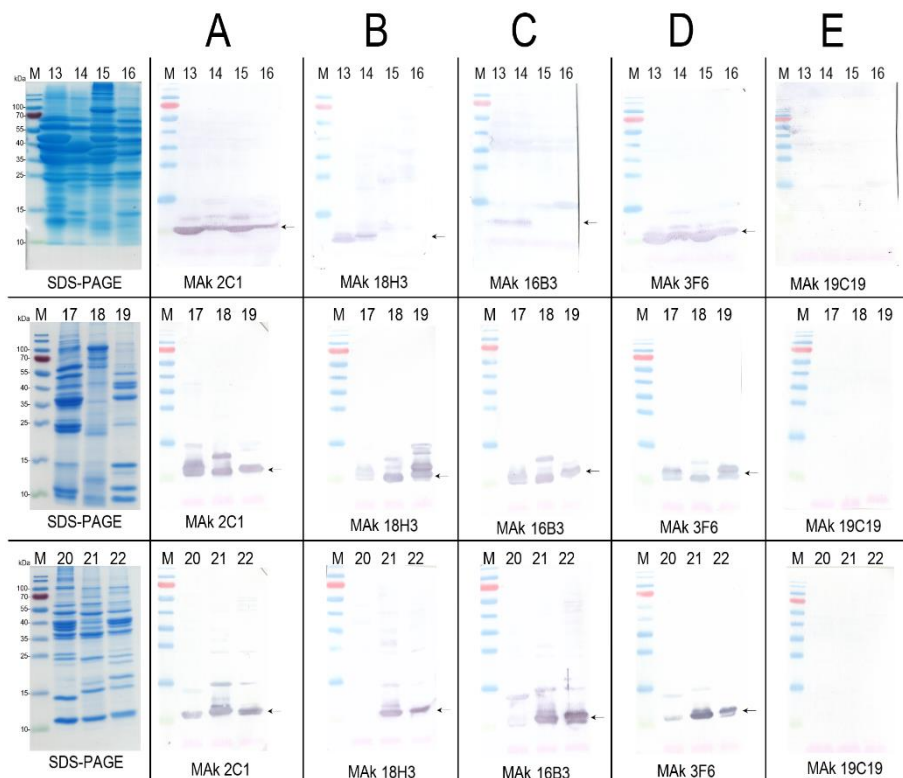
9 priedas. Visų MAk sąveikos su skirtingų žuvų rūšių ekstraktais analizė netiesioginės IFA metodu. Matavimai atlikti su pakartojimais. N – IFA plokštelė padengta tik imobilizacijos buferiniu tirpalu.



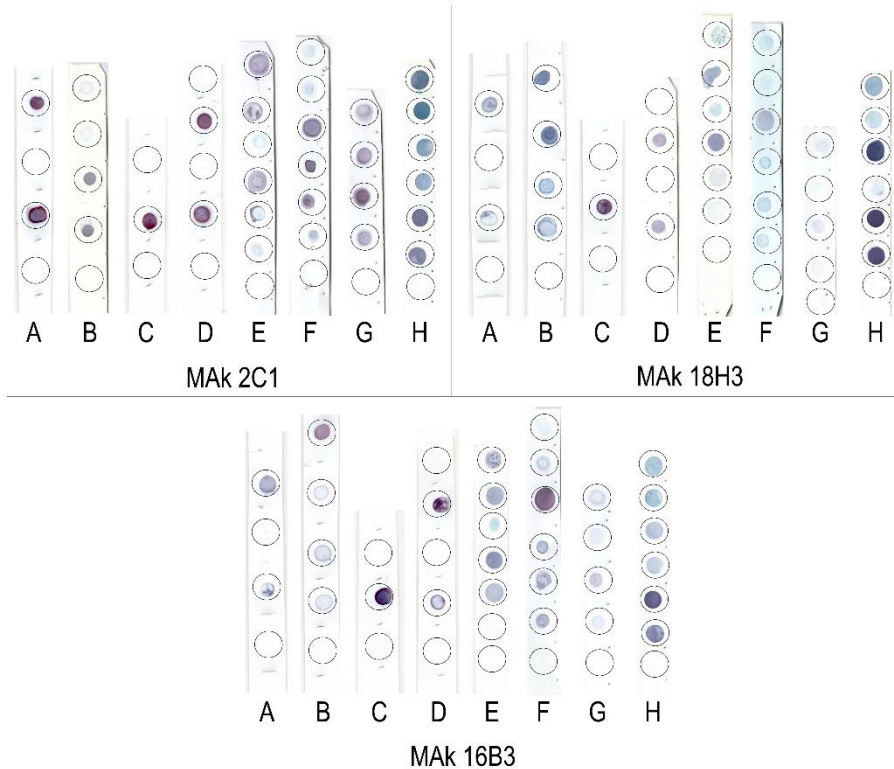
10 priedas. MAK 2C1, 18H3, 16B3, 3F6 ir 19C19 sąveikos su skirtingų žuvų rūšių ekstraktais analizė imunobloto metodu. MAK 19C19 yra sukurtas prieš MBP baltymą ir šio eksperimento metu naudotas kaip neigiama kontrolė. Kairėje – SDS-PAGE; dešinėje – imunoblotas su MAK. M – baltymų molekulinio svorio standartas (Thermo Fisher Scientific); 1 – paprastojo karpio (DST); 2 – atlantinės silkės (DST); 3 – atlantinės lašišos (DST); 4 – atlantinės menkės (DST); 5 – paprastojo karpio; 6 – atlantinės silkės; 7 – atlantinės lašišos; 8 – vaivorykštinio upėtakio; 9 – ledjūrio menkės; 10 – aliaskinės rudagalvės menkės; 11 – europinės lydekos; 12 – europinės stintos.



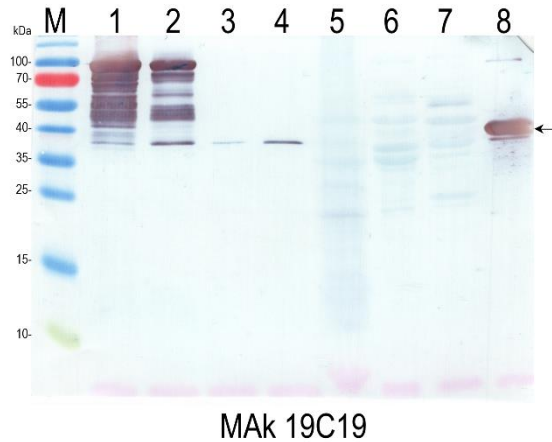
13 – paprastosios kuojos; 14 – paprastojo karšio; 15 – paprastojo europinio ešerio; 16 – paprastojo pūgžlio; 17 – auksaspalvės dorados; 18 – gelsvapelekės plekšnės; 19 – argentininės jūrinės lydekos; 20 – atlantinės argentinios; 21 – juodadėmės menkės; 22 – didžiagalvės menkės. K – komercinis ekstraktas, o kiti yra paruošti laboratorijoje. Rodykle nurodomas β -parvalbuminas.



11 priedas. MAk 2C1, 18H3 ir 16B3 sąveikos su skirtingais rekombinantiniais baltymais (A–D) ir alergenų ekstraktais (E–H) analizė taškinio bloto metodu. *A juostelė:* MBP-Cyp c 1; MBP-Sal s 1; MBP-Gal d 8; MBP. *B juostelė:* MBP-Gad m 1; MBP-Clu h 1; MBP-Pan h 1; MBP-Thu a 1; MBP. *C juostelė:* MBP-Eso lu 1; MBP-Lep w 1; MBP. *D juostelė:* MBP-Onc m 1; MBP-Sco s 1; MBP-Seb m 1; MBP-Shark; MBP. *E juostelė:* paprastojo karpio (DST); atlantinės silkės (DST); atlantinės lašišos (DST); atlantinės menkės (DST); paprastojo karpio; atlantinės silkės; MBP. *F juostelė:* atlantinės lašišos; vaivorykštinio upėtakio; ledjūrio menkės; aliaskinės rudagalvės menkės; MBP. *G juostelė:* europinės lydekos; europinė stintos; paprastosios kuojos; paprastojo europinio ešerio; paprastojo karšio; paprastojo pūgžlio; MBP. *H juostelė:* auksaspalvės dorados; gelsvapelekės plekšnės; argentininės jūrų lydekos; atlantinės argentinios; juodadėmės menkės; didžiagalvės menkės; MBP. DST – komercinis ekstraktas, kiti yra paruošti laboratorijoje.



12 priedas. MAk 19C19 sąveikos su skirtingų organizmų enolazėmis analizė imunobloto metodu. Kairėje – SDS-PAGE; dešinėje – imunoblotas su MAk 19C19. M – baltymų molekulinio svorio standartas (Thermo Fisher Scientific); 1 – MBP-Cyp c 2 baltymas *E. coli* Tuner(DE3) bakterijų lizate; 2 – MBP-Alt a 6 baltymas *E. coli* Tuner(DE3) bakterijų lizate; 3 – *E. coli* DH10B bakterijų lizatas; 4 – *E. coli* Tuner(DE3) bakterijų lizatas; 5 – kepimo mielių tirpalas; 6 – vištienos ekstraktas; 7 – kiaulienos ekstraktas; 8 – rekombinantinis MBP baltymas. Rodykle nurodyta natūralaus MBP baltymo (~43 kDa) padėtis išanalizuotuose *E. coli* lizatų mėginiuose.



SUMMARY

List of abbreviations

aa – amino acids;
Cyp c 1 – common carp β -parvalbumin;
Cyp c 2 – common carp β -enolase;
Clu h 1 – Atlantic herring β -parvalbumin;
ELISA – indirect enzyme-linked immunosorbent assay;
Eso lu 1 – Northern pike β -parvalbumin;
FBS – fetal bovine serum;
Gad m 1 – Atlantic cod β -parvalbumin;
Gad m 2 – Atlantic cod β -enolase;
Gal d 8 – chicken α -parvalbumin;
Gal d 9 – chicken β -enolase;
HRP – horseradish peroxidase;
IgE – immunoglobulin E;
IPTG – isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside;
Lep w 1 – megrim β -parvalbumin;
MAb – monoclonal antibodies;
MBP – maltose binding protein;
MW – molecular weight;
OD – optical density;
Onc m 1 – rainbow trout β -parvalbumin;
PAb – polyclonal antibodies;
Pan h 1 – striped catfish β -parvalbumin;
PBS – phosphate buffered saline;
PBST – 0.1% Tween 20 in PBS;
PEG – polyethylene glycol;
PVDF – polyvinylidene difluoride;
RT – room temperature;
Sal s 1 – Atlantic salmon β -parvalbumin;
Sco s 1 – Atlantic mackerel β -parvalbumin;
SDS-PAGE – sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis;
Seb m 1 – ocean perch β -parvalbumin;
Shark – Leopard shark α -parvalbumin;
Thu a 1 – yellowfin tuna β -parvalbumin;
TMB – 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine;
WB – Western blot.

Introduction

Major food allergens are milk, eggs, nuts, fish, crustaceans, shellfish, wheat and soy, that can cause various allergy symptoms and affect either the gastrointestinal tract, respiratory tract or skin, and even lead to anaphylaxis (Boye, 2012). Fish is a source of valuable nutrients such as high-quality proteins and polyunsaturated fatty acids. Therefore, more and more people include fish products in their diets. Due to an increased fish consumption, more cases of fish allergy have been reported and studied around the world. It is estimated that 0.1–0.4% of the general population have fish allergy (Dasanayaka et al., 2022; Fernandes et al., 2015). Allergy symptoms (like urticaria, rhinitis, stomach cramps and others) may occur not only after eating fish or inhalation of fish steam during processing of fish but also by skin contact in fish-processing environments (Dijkema et al., 2022). Patients could be allergic to a single fish species or be sensitive to several different fish species. This could be related to people's eating habits and their geographic regions, where those fish species are more common (Klueber et al., 2019). To manage fish allergy, patients are recommended to avoid eating fish and its products. However, there are cases when patients with monosensitivity to certain fish species could consume other fish species without any allergic reactions (Hilger et al., 2017; Sharp et al., 2014). To ensure safety for fish allergic consumers, it is recommended to label foods and other products that contain materials derived from fish as their ingredients (Liang et al., 2022). However, due to mislabeling or accidental cross-contamination during the production of products, hidden allergens could cause adverse allergic reactions for sensitive patients (Sharp et al., 2014). That is why various detection methods for fish allergen detection in food and other analyzed samples are developed, including those where recombinant fish allergens and allergen-specific monoclonal antibodies could be used.

Fish allergens have been identified and analyzed in more than 40 different fish species. β -parvalbumin, β -enolase, aldolase A, tropomyosin, collagen alpha and vitellogenin are the most studied and analyzed fish proteins that are found in fish muscle, skin, bones and roe (Matricardi et al., 2016). β -parvalbumins are the major fish allergens, causing allergy symptoms for the majority of fish allergic patients (> 90%) (Carvalho et al., 2020). They are 10–12 kDa heat-stable proteins, found in the muscles of different bony fish species (carp, herring, catfish and others), while α -parvalbumins are present in cartilaginous fish (Leopard shark, thornback ray) and are considered as non-allergic proteins (Kalic et al., 2021). Studies showed, that β -parvalbumins among different fish species (cod, salmon, carp) share high amino acid (aa)

sequence identity (> 60%), which could explain why patients are sensitized to several different fish species (Carvalho et al., 2020; Kalic et al., 2021). β -parvalbumins have been identified and described in most consumed fish species (Atlantic salmon, Atlantic cod, common carp). Several recombinant fish parvalbumins were produced and characterized. Analyzing these recombinant parvalbumins, not only protein structures are determined, but also factors that could change that structure. This is important for designing hypoallergenic derivatives of fish β -parvalbumins, that could be used for immunotherapy of fish allergy (Van Do et al., 1999; Das Dores et al., 2002; Swoboda et al., 2002; Swoboda et al., 2007). Moreover, there are study cases where serum specimens of fish-allergic patients demonstrated cross-reactivity with frog, crocodile and chicken α -parvalbumins (Haroun-Díaz et al., 2022). Another important fish allergen is β -enolase, which is a 50 kDa thermolabile enzyme, found in fish muscle (Fernandes et al., 2015). This allergen has been identified in Nile perch, Atlantic cod, tilapia, tuna, salmon and other fish species (Dasanayaka et al., 2022). Moreover, new studies demonstrate, that more people are allergic to fish β -enolases (whiff, stripped catfish) and it is becoming an important fish allergen (Haroun Díaz et al., 2023; Ruethers et al., 2020).

Polyclonal and monoclonal antibodies have been generated against fish parvalbumins, however antibodies against fish β -enolase have not yet been reported (Gajewski and Hsieh, 2008; Lee et al., 2011). Allergen-specific monoclonal antibodies (MAb) could be applied for allergen extract standardization by detecting specific allergen and determining its concentration in the analyzed extract. This could ensure better protocols for the preparation of allergen extracts and improve their quality, since prepared allergen extracts could be used for allergy diagnosis and specific immunotherapy (Aden et al., 1999; Lombardero et al., 1992).

The aim of the dissertation

To develop and characterize novel monoclonal antibodies against fish allergens for detection of fish β -parvalbumins and β -enolases in allergen extracts of different fish species.

Tasks of the dissertation:

1. To produce recombinant allergens fused to maltose binding protein (MBP), in *Escherichia coli* and evaluate their antigenic properties.
2. To develop novel hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies (MAbs) against fish allergens: Atlantic cod parvalbumin, common carp β -parvalbumin and β -enolase.

3. To characterize the MABs by determining their affinity, mapping their epitopes and investigating their cross-reactivity with allergens of different fish species and other animals.
4. To evaluate the ability of MABs to detect fish allergens in muscle extracts of different fish species and other animals.

Scientific novelty and practical value of the study

MABs against the particular allergen could be used either to characterize this allergen and analyze its structure or to develop diagnostic systems for allergen detection in biological samples. In the current study, we have developed a new collection of MABs against fish allergens, that demonstrated reactivity with both recombinant and natural allergens of different fish species. The characterized broadly cross-reactive MABs against fish parvalbumins could be applied for detection of this allergen in allergen extracts and replace MAb PARV-19 against frog parvalbumin that is currently widely used in other studies.

For the first time, MABs against fish β -enolase were developed. These MABs recognized enolases not only from fish, but also from other organisms. The Lithuanian patent (No. 509 A) and an international patent application (No. 4 056 595 A1) that describe these MABs were filed.

In this study, we described the production and antigenic characterization of recombinant β -enolase that was isolated from the common carp muscle. Studying its antigenicity, we determined that several serum specimens of fish-allergic patients reacted with this protein. In 2020, based on our results, the common carp β -enolase was registered as a new fish allergen Cyp c 2 by the WHO/IUIS Allergen Database.

Collection of 13 recombinant parvalbumins of different fish species were generated that were used for MAB characterization and studying their cross-reactivities. Moreover, a large collection of different fish species extracts were prepared, which included several fish species that are common in Lithuania (European smelt and Eurasian ruffe), which had not been studied before.

Previous studies have shown that patients allergic to fish β -parvalbumins could also be sensitive to chicken α -parvalbumins. In our study, production of recombinant MBP-fused chicken α -parvalbumin confirmed that antibodies of fish-allergic patients may also react with chicken allergen. Studying MAB cross-reactivities, it was shown for the first time, that MABs against fish allergens reacted not only with chicken, but also recognized allergens in pork muscle extract.

The generated novel MAbs against fish allergens are able to recognize parvalbumins and enolases of different fish species and other organisms, suggesting their potential value for the standardization of allergen extracts.

Defended propositions

1. Fourteen recombinant allergens were produced in *Escherichia coli* cells. They have a proper antigenic structure and are suitable for the generation and characterization of allergen-specific MAbs.
2. A new allergen was identified – the common carp β -enolase.
3. MAbs raised against fish allergens recognize conserved epitopes and cross-react with homologues of different origin.
4. The newly generated MAbs could be used to investigate fish allergens and to develop immunoassays for the analysis of allergen extracts.

Materials and methods

Production and characterization of recombinant allergens fused to maltose binding protein

The cDNA sequences, coding for the common carp (*Cyprinus carpio*) β -parvalbumin and β -enolase, were derived from mRNA extracted from the skeletal muscle of a common carp. Other fish species parvalbumins and chicken α -parvalbumin coding genes were synthesized according to sequences available in the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee and Uniprot databases. Allergen-coding DNA fragments were inserted into the pET28-MBP-TEV vector (Addgene plasmid #69929). The synthesis of recombinant MBP-fused parvalbumins in *E. coli* BL21 (DE3), BL21 (DE3) Star or Tuner (DE3) was induced with 0.1 mM IPTG.

An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to evaluate the reactivity of recombinant MBP-fused allergens with IgE from blood serum specimens of fish-allergic patients (PlasmaLab International). 96-well plates were coated with recombinant proteins (5 μ g/mL), then blocked and were incubated for 2 h at RT with diluted (1:10-1:900 in 1 x RotiBlock supplemented with 0.1% Tween 20) serum specimens. After washing, plates were incubated for additional 1 h at RT with diluted (1:1000) mouse anti-human IgE Fc-HRP (SouthernBiotech). Enzymatic reaction was carried using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrate (Clinical Science Products) and stopped with 3.6% sulfuric acid.

Generation of MAbs against fish allergens

MAbs were produced by hybridoma technology described previously (Köhler and Milstein, 1975). BALB/c mice were immunized 3 times with 50 µg of either purified recombinant common carp β-parvalbumin (MBP-Cyp c 1), or purified recombinant common carp β-enolase (MBP-Cyp c 2), or natural Atlantic cod parvalbumin (nGad m 1) every 4 weeks. The maintenance of mice and experimental procedures were performed by certified staff in accordance with FELASA guidelines and conformed to Lithuanian and European legislation in the Department of Biological Models (Institute of Biochemistry, Life Sciences Center, Vilnius University). The permission to use BALB/c mice for immunizations was obtained from the Lithuanian State Food and Veterinary Agency (permission No. G2-117, issued 11 June 2019). Spleen cells of immunized mice were fused with mouse myeloma Sp2/0 cells using polyethylene glycol solution (PEG-1500, Sigma-Aldrich). Target hybrid cells were selected using growth medium supplemented with a mixture of hypoxanthine, aminopterin and thymidine (Sigma-Aldrich) and 15% FBS. Hybridoma growth medium was screened by an indirect ELISA for antigen-specific antibodies using antigens and MBP protein as a negative control. Selected positive clones were cloned by a limiting dilution assay. Later, viable cell clones were tested again by an indirect ELISA and selected ones were propagated, then cultivated *in vitro* or frozen for storage in liquid nitrogen.

Characterization of MAbs

An indirect ELISA was used to analyze blood samples of the immunized mice, hybridoma supernatants for selection of positive clones and to investigate MAb specificity and affinity to the antigen. Moreover, this assay was used to analyze MAbs reactivity with recombinant MBP-fused parvalbumins and with prepared extracts of different fish species and other organisms. Multiwell plates were coated with purified recombinant proteins (5 µg/mL) or with allergen extract (10 µg/mL). After blocking, plates were incubated for 1 h at RT with either diluted (1:200–1:145800 in PBS-T) mouse blood samples, or with the purified MAbs (5 µg/ml in PBS-T), or with undiluted hybridoma supernatants. After washing, plates were incubated for additional 1 h at RT with diluted (1:5000 in PBS-T) goat anti-mouse IgG antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP) (Bio-Rad). Enzymatic reaction was carried using TMB substrate and stopped with 3.6% sulfuric acid.

Sandwich ELISA was used to detect fish parvalbumins in various fish extracts using the pair of MAbs (one of the MAb was labeled with HRP), that recognize different epitopes of fish parvalbumins. ELISA plates were coated with the respective MAb (5 µg/mL), blocked and the incubated for 1 h at RT

with allergen extract (10 µg/mL). After washing, plates were incubated for additional 1 h at RT with diluted (1:80 or 1:800 in PBS-T) HRP-labeled MAb. Detection of the enzymatic reaction were performed as for indirect ELISA. Parvalbumin concentration (ng/ml) in the analyzed allergen extracts was calculated from a four-parameter logistic calibration curve based on the absorbance data of the standard solution.

The ability of the MAbs to recognize their target antigens and other proteins under denaturing conditions was tested by Western blot (WB). Recombinant and natural allergens (1 µg per lane), cell lysates (10 µl per lane) and allergen extracts (10 µg per lane), were subjected to 12% SDS-PAGE under reducing conditions. After SDS-PAGE, proteins were transferred to a PVDF membrane (Carl Roth), blocked and incubated for 1 h at RT with either diluted (1:2 in 2% milk powder in PBS-T) hybridoma supernatants or with purified MAbs at a final concentration 5 µg/mL in 2% milk powder in PBS-T. Following washing step, the membrane was incubated for 1 h at RT with diluted (1:4000 in 2% milk powder in PBS-T) goat anti-mouse IgG antibody conjugated to HRP (Bio-Rad). After the final washing cycle, the membrane was incubated with TMB solution for 5 min and the enzymatic reaction was stopped by washing membranes with water. Besides that, WB method was used to localize the epitopes of recombinant Cyp c 2, Gad m 1 and Cyp c 1 proteins, that were recognized by MAbs, using overlapping recombinant MBP-fused fragments of Cyp c 2 (MBP-Cyp c 2-C1, aa 1–622, MBP-Cyp c 2-C2, aa 1–543 and MBP-Cyp c 2-C3, aa 1–543), Gad m 1 (fragment #1, aa 1–84, fragment #2, aa 21–110) and Cyp c 1 (fragment #3, aa 1–73, fragment #4, aa 30–104) proteins, which were expressed in *E. coli* Tuner (DE3) strain.

Moreover, MAb reactivities with recombinant allergens and different fish species and other animal extracts were investigated using the dot blot method. Samples of purified recombinant parvalbumins (2 µl), allergen extracts (5 µl) and MBP protein (2 µl) (a final concentration 1 µg/µl, diluted in PBS) were spotted onto the PVDF membrane (or nitrocellulose) in a series of small dots, blocked and incubated for 1 h at RT with purified MAb (5 µg/mL) or diluted (1:2 in 2% milk powder in PBS-T) hybridoma supernatants. The subsequent membrane washing, incubation with HRP-labelled anti-mouse IgG and treatment with TMB solution was performed as described for WB analysis.

Preparation of in-house allergen extract

In-house allergen extracts of different fish species, chicken (*Gallus domesticus*) and pork (*Sus scrofa domesticus*) were prepared from chilled muscle tissues purchased from a local store. A piece of muscle tissue (1–3 g) was homogenized in PBS supplemented with 150 mM NaCl using the glass

Dounce homogenizer. Collected supernatant (~ 15 mL) was clarified by centrifugation at $4000 \times g$ for 15 min at 4°C , and stored at -20°C .

Immunoprecipitation of parvalbumins from allergen extracts

MAbs against fish parvalbumins were examined for their ability to isolate parvalbumins from allergen extracts by immunoprecipitation method. The rProtein A Sepharose (Cytiva) was mixed with 0.5 mg of purified MAbs and incubated for 1 h at RT with rotation. After washing, the MAb-Sepharose complex was incubated overnight at 4°C with rotation with selected allergen extract (each 50 μl). Then samples were washed once again, resuspended in 100 μL PBS and analyzed by SDS-PAGE and WB, using diluted (1:500 in 2% milk powder in PBS-T) specific HRP-labeled MAb against parvalbumin as described for WB analysis.

Results and discussion

Production and antigenic characterization of recombinant fish allergens fused to maltose binding protein

Recombinant allergens with N-terminal MBP were produced in *E. coli*. In total, a collection of 14 recombinant fish allergens were generated: 11 fish β -parvalbumins, common carp β -enolase and two α -parvalbumins (shark and chicken) (Table 1). Most of these recombinant allergens have been analyzed in previous studies. In addition, we included common carp β -enolase, Northern pike β -parvalbumin, Leopard shark α -parvalbumin that have not been studied before and could be used either as immunogens for MAbs generation or to investigate MAbs specificity for fish allergens.

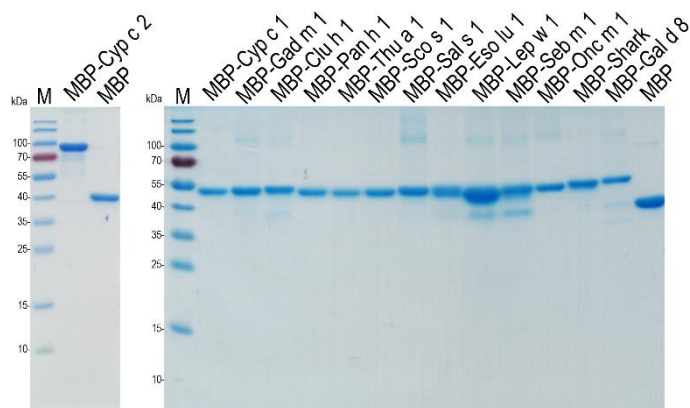


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of purified recombinant proteins. Lane M: protein molecular weight marker (Thermo Fisher Scientific); MBP protein (44.2 kDa).

Table 1. List of recombinant allergens produced and analyzed in this study.

Recombinant parvalbumin	MW ₁ (kDA)	Allergen name (IUIS)	MW ₂ (kDA)	Parvalbumin isoform	Common name of allergen source	Species	Order	<i>E.coli</i> strain for protein expression	Database for allergen sequence
MBP-Cyp c 2	91,7	Cyp c 2	47,5	β	Common carp	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Cypriniformes</i>	Tuner (DE3)	WHO/IUIS (Cyp c 2.0101)
MBP-Cyp c 1	55,7	Cyp c 1	11,5	β	Common carp	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Cypriniformes</i>	Tuner (DE3)	WHO/IUIS (Cyp c 1.0101)
MBP-Gad m 1	55,5	Gad m 1	11,3	β	Atlantic cod	<i>Gadus morhua</i>	<i>Gadiformes</i>	Tuner (DE3)	WHO/IUIS (Gad m 1.0101)
MBP-Sal s 1	56,1	Sal s 1	11,9	β	Atlantic salmon	<i>Salmo salar</i>	<i>Salmoniformes</i>	BL21 (DE3)	WHO/IUIS (Sal s 1.0101)
MBP-Onc m 1	56,1	Onc m 1	11,9	β	Rainbow trout	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Salmoniformes</i>	BL21 (DE3) Star	WHO/IUIS (Gad m 1.0101)
MBP-Clu h 1	55,9	Clu h 1	11,7	β	Atlantic herring	<i>Clupea harengus</i>	<i>Clupeiformes</i>	Tuner (DE3)	WHO/IUIS (Clu h 1.0101)
MBP-Pan h 1	55,8	Pan h 1	11,6	β	Striped catfish	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	<i>Siluriformes</i>	Tuner (DE3)	WHO/IUIS (Pan h 1.0101)
MBP-Thu a 1	55,7	Thu a 1	11,5	β	Yellowfin tuna	<i>Thunnus albacares</i>	<i>Scombriformes</i>	Tuner (DE3)	WHO/IUIS (Thu a 1.0101)
MBP-Sco s 1	55,7	Sco s 1	11,5	β	Atlantic mackerel	<i>Scomber scombrus</i>	<i>Scombriformes</i>	BL21 (DE3) Star	WHO/IUIS (Sco s 1.0101)
MBP-Eso lu 1	55,6	Eso lu 1	11,4	β	Northern pike	<i>Esox lucius</i>	<i>Esociformes</i>	BL21 (DE3) Star	Uniprot (P02619)
MBP-Lep w 1	55,9	Lep w 1	11,7	β	Megrim	<i>Lepidorhombus whiffiagonis</i>	<i>Pleuronectiformes</i>	BL21 (DE3) Star	WHO/IUIS (Lep w 1.0101)
MBP-Seb m 1	55,6	Seb m 1	11,4	β	Ocean perch	<i>Sebastes norvegicus</i>	<i>Scorpaeniformes</i>	BL21 (DE3) Star	WHO/IUIS (Seb m 1.0101)
MBP-Shark	56,1	-	11,9	α	Leopard shark	<i>Triakis semifasciata</i>	<i>Carcharhiniformes</i>	BL21 (DE3) Star	Uniprot (P30563)
MBP-Gal d 8	56,3	Gal d 8	12,1	α	Chicken	<i>Gallus domesticus</i>	<i>Galliformes</i>	BL21 (DE3)	WHO/IUIS (Gal d 8.0101)

MW₁ – calculated theoretical molecular weight (MW) of synthesized recombinant parvalbumin.

MW₂ – molecular weight of the allergen according to WHO/IUIS allergen and Uniprot databases.

MBP-fused allergens were mostly found in soluble fractions of *E.coli* lysates and were purified by affinity chromatography using „MBPTrap™ HP“ column (Cytiva) (Fig. 1).

Purified recombinant allergens were tested for IgE binding capacity by ELISA using serum specimens of patients with diagnosed fish allergy (PlasmaLab International). In a first step, 21 serum specimens were tested with purified recombinant common carp allergens: MBP-Cyp c 1 and MBP-Cyp c 2 proteins. 14 of them were found to be reactive with MBP-Cyp c 1, while only 4 specimens with MBP-Cyp c 2 (Fig. 2 A).

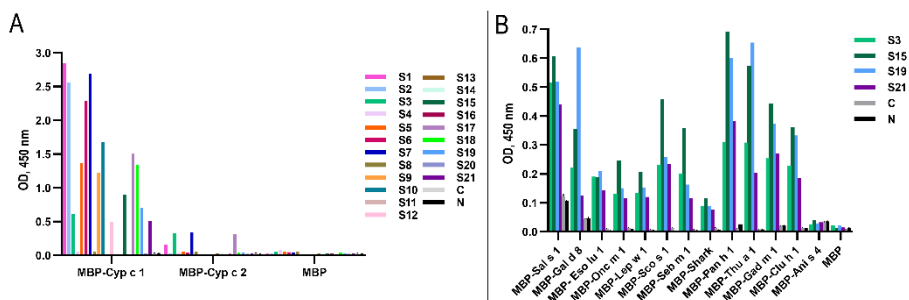


Fig. 2. The reactivities of serum IgE of fish-allergic patients with purified recombinant proteins as determined by ELISA. S1–S21: serum specimens of patients with confirmed fish allergy; C: negative control, serum specimens of patients with other allergies; N: incubation without serum specimen, only with anti-human IgE Fc-HRP (SouthernBiotech). Serum samples were diluted 1:10. OD indicates optical density.

To characterize the rest of recombinant parvalbumins by ELISA, 4 serum specimens of patients that were sensitized to fish allergens were used. These analyzed serum specimens demonstrated reactivity with different fish species parvalbumins, but also were reactive with chicken α -parvalbumin and showed no reactivity to recombinant MBP-fused *Anisakis simplex* allergen (MBP-Ani s 4) that was used as a control to confirm that serum specimens specifically recognize parvalbumins (Fig. 2 B). All tested serum specimens showed no reactivity with recombinant MBP used as a negative control.

In order to show that common carp β -enolase is a potential fish allergen, the reactivity of denatured (boiled for 10 min at 100 °C) and native recombinant MBP-Cyp c 2 protein with serum specimens of fish allergic patients was analyzed by dot blot (Fig. 3). 3 out of 21 blood serum samples reacted with native protein. Based on all our results, the common carp β -enolase was later registered as the new fish allergen Cyp c 2 by WHO/IUIS allergen database.

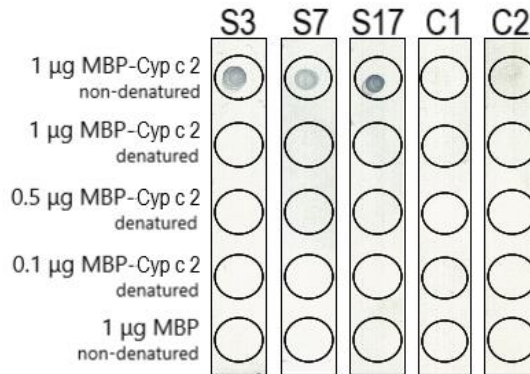


Fig. 3. The reactivity of serum IgE of fish-allergic patients with purified recombinant MBP-Cyp c 2 determined by dot blot. As a negative control, purified MBP was used. S3, S7 and S17: serum specimens of patients with confirmed fish allergy; C1: serum specimen of a patient with other allergies; C2: serum specimen of a healthy (non-atopic) individual. Different amounts of denatured and non-denatured MBP-Cyp c 2 were used in dot blot (spotted onto the nitrocellulose membrane).

Since serum specimens from fish-allergic patients recognized the purified recombinant allergens, this suggests their antigenic similarities with natural allergens present in fish extracts.

Generation and characterization of MAbs against fish allergens

For the production of MAbs against fish allergens, BALB/c mice were immunized with either purified recombinant MBP-Cyp c 1, or purified recombinant MBP-Cyp c 2, or with natural Atlantic cod parvalbumin (nGad m 1) (DST). Hybridomas were generated by fusion of mouse myeloma cells with spleen cells of the immunized mice with the highest antibody response. Then hybridoma clones were screened by an indirect ELISA using antigens and MBP protein (as a negative control) to identify only allergen specific clones. Selected hybrid clones were cloned by limiting dilution assay and later tested again for their specificity for the antigen. In total, five stable hybridoma cell lines of IgG1 subtype were developed: one MAb (clone 3F6) against recombinant common carp β -parvalbumin and four MAbs (clones 7B2, 2C1, 18H3 and 16B3) against nGad m 1, and two stable hybridoma cell lines (clones 14F3 and 6E4) of IgG2b subtype against recombinant common carp β -enolase. The supernatants of these hybridomas were collected and used for the purification of MAbs and their characterization.

All seven generated MAbs were reactive with their respective antigens and showed no reactivity to recombinant MBP protein both by indirect ELISA and

WB, except for MAb 14F3. This antibody showed no reactivity with recombinant target antigens under denaturing conditions, suggesting that MAb 14F3 recognizes a conformation-sensitive epitope of β -enolase.

To determine the affinity of the generated MAbs to the antigen, the apparent dissociation constant (K_d) values of each antibody were calculated from the results of an indirect ELISA. All MAbs K_d values were higher than 1×10^{-9} , except for MAb 6E4 (K_d value 7.64×10^{-8}), indicating that these MAbs are of high affinity.

Monoclonal or polyclonal antibodies raised against allergens could be used for allergen extract standardization or to develop immunoassays for allergen detection in analyzed samples (Chapman, 1988; Jeong et al., 2017; Kiyota et al., 2016). MAbs have been generated against common carp, southern bluefin tuna, silver carp parvalbumins that cross-reacted with different fish species parvalbumins. However, MAb against frog parvalbumin (PARV-19) is one of the widely used antibody to study fish extracts (Celio et al., 1998; Kawase et al., 2001; Zhang et al., 2021). Even though it recognizes parvalbumins of various fish species (carp, catfish, cod, tilapia, Elephant shark and others), there are studies where MAb PARV-19 showed no cross-reactivity with yellowfin tuna, swordfish, pollock and other fish species extracts (Chen et al., 2006; Gajewski et al., 2009, Saptarshi et al., 2014). Furthermore, information about MAbs against fish β -enolase has not yet been reported.

Common carp and Atlantic cod parvalbumins are one of the most studied fish allergens that share high sequence similarity with other fish species, suggesting that MAbs against these allergens could demonstrate either broad reactivity with various or specificity to one specific fish species. In the current study, we generated a panel of MAbs against recombinant MBP-Cyp c 1, recombinant MBP-Cyp c 2 and nGad m 1 that demonstrated strongly reactive with their target antigens.

The reactivities of MAbs with recombinant fish parvalbumins

A collection of purified recombinant MBP-fused fish parvalbumins were used to evaluate the ability of MAbs raised against fish parvalbumins to recognize parvalbumins of other fish species. All five MAbs cross-reacted with recombinant allergens by ELISA, WB and dot blot, showing slightly different pattern of reactivity (Fig. 4. Table 2).

MAb 3F6 raised against common carp β -parvalbumin demonstrated the broadest reactivity with all tested recombinant fish β -parvalbumins, except MBP-Eso lu 1. This suggest, that MAb 3F6 might recognize highly conserved regions of fish parvalbumins. Four MAbs raised against nGad m 1 reacted with most of recombinant fish β -parvalbumins in ELISA and dot blot, but

were reactive only with certain proteins by WB, indicating that their epitopes might be conformation-sensitive. Moreover, all five MAbs recognized recombinant Leopard shark α -parvalbumin (Table 2).

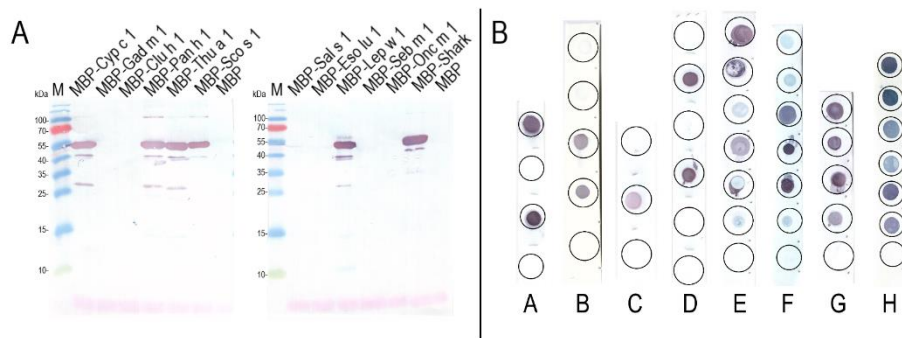


Fig. 4. The reactivity of MAb 7B2 with recombinant fish allergens by WB (A) and with recombinant fish allergens and allergen extracts by dot blot (B). Lane M: protein molecular weight marker. Strip A: MBP-Cyp c 1; MBP-Sal s 1; MBP-Gad m 1; MBP (negative control). Strip B: MBP-Gad m 1; MBP-Clu h 1; MBP-Pan h 1; MBP-Thu a 1; MBP. Strip C: MBP-Eso lu 1; MBP-Lep w 1; MBP. Strip D: MBP-Onc m 1; MBP-Sco s 1; MBP-Seb m 1; MBP-Shark; MBP. Strip E: common carp (DST); Atlantic herring (DST); Atlantic salmon (DST); Atlantic cod (DST); common carp; Atlantic herring; MBP. Strip F: Atlantic salmon; rainbow trout; saithe; Alaska pollock; Northern pike; European smelt; MBP. Strip G: common roach; European perch; common bream; Eurasian ruffe; MBP. Strip H: DST – commercial extracts from manufacturer (DST), the others are in-house prepared extracts. Strip A–D are recombinant proteins, while E–H fish extracts. Samples were spotted onto the PVDF membrane from top to bottom.

All MAbs raised against fish parvalbumins showed no reactivity with recombinant Eso lu 1, while MAbs against nGad m 1 also did not react with Onc m 1 (except MAb 16B3), Sal s 1 and Seb m 1 parvalbumins. Aligning the aa sequence of common carp β -parvalbumin (Cyp c 1) with Northern pike β -parvalbumin (Eso lu 1) aa sequence and Atlantic cod β -parvalbumin (Gad m 1) aa sequence with Eso lu 1, rainbow trout β -parvalbumin (Onc m 1), Atlantic salmon β -parvalbumin (Sal s 1) and ocean perch β -parvalbumin (Seb m 1) aa sequences, using Uniprot Aligh tool (<https://www.uniprot.org/align>), high identity levels (80%, 74%, 65%, 66% and 73%, respectively) of aa sequences among these allergens was revealed. Despite that, the differences in certain aa sequences may explain why MAbs did not recognize those recombinant fish allergens.

Table 2. Summary of MAb reactivities with recombinant parvalbumins by ELISA, Western blot and dot blot assays.

Order	Recombinant parvalbumin	MAb 7B2			MAb 2C1			MAb 18H3			MAb 16B3			MAb 3F6		
		E	WB	DB	E	WB	DB	E	WB	DB	E	WB	DB	E	WB	DB
<i>Cypriniformes</i>	MBP-Cyp c 1	+++	✓	✓	+++	✓	✓	++	✓	✓	++	✓	✓	+++	✓	✓
<i>Gadiformes</i>	MBP-Gad m 1	+		✓	+		✓	+++	✓	✓	++	✓	✓	+++	✓	✓
<i>Salmoniformes</i>	MBP-Sal s 1													++	✓	✓
<i>Salmoniformes</i>	MBP-Onc m 1										+			+++	✓	✓
<i>Clupeiformes</i>	MBP-Clu h 1	+		✓	+		✓	+	✓	✓	+		✓	+++	✓	✓
<i>Siluriformes</i>	MBP-Pan h 1	+++	✓	✓	+++	✓	✓	++	✓	✓	++	✓	✓	+++	✓	✓
<i>Scombriformes</i>	MBP-Thu a 1	+++	✓	✓	+++	✓	✓	++	✓	✓	++	✓	✓	+		✓
<i>Scombriformes</i>	MBP-Sco s 1	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	++	✓	✓	+++	✓	✓
<i>Esociformes</i>	MBP-Eso lu 1															
<i>Pleuronectiformes</i>	MBP-Lep w 1	+++	✓	✓	+++	✓	✓	++	✓	✓	++	✓	✓	+	✓	✓
<i>Scorpaeniformes</i>	MBP-Seb m 1													+	✓	✓
<i>Carcharhiniformes</i>	MBP-Shark	+++	✓	✓	+++	✓	✓	++	✓	✓	++	✓	✓	+	✓	✓
<i>Galliformes</i>	MBP-Gal d 8	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+	✓	✓	++	✓	✓	+	✓	✓

„✓“ indicate MAb reactivity with the antigen; empty space – no reactivity.

E – ELISA, WB – Western blot, DB – dot blot methods.

ELISA reactivity: (+++) OD₄₅₀ > 1.5; (++) OD₄₅₀ 0.5–1.5; (+) OD₄₅₀ < 0.5.

We demonstrated, that not only serum specimens of fish-allergic patients reacted with recombinant Leopard shark α -parvalbumin, but also all our five MAbs recognized this parvalbumin, even though it shares low sequence similarity with Gad m 1 and Cyp c 1 proteins (48–55% identity). These results suggest that generated MAbs against fish parvalbumins are broadly-reactive and may be used to study both isoforms of fish parvalbumins (α - and β -).

MAb reactivities with extracts of different fish species

MAb ability to recognize natural allergens in extracts of different fish species was investigated using four commercial fish extracts (carp, cod, salmon and herring) and 18 in-house prepared fish allergen extracts by ELISA, WB and dot blot methods. All MAbs raised against fish parvalbumins recognized β -parvalbumins in all fish extracts, while MAb 6E4 and 14F3 detected β -enolase in the majority of analyzed fish extracts by ELISA and dot blot (Fig. 4 and Table 3).

WB analysis of heated fish extracts with MAbs against fish parvalbumins revealed about 10–12 kDa protein bands at positions that correspond to the molecular weight (MW) of full-length β -parvalbumins and with MAb 6E4 revealed about 47–50 kDa protein bands at positions that correspond to the MW of full-length β -enolase and its partially degraded forms (Fig. 5 and Table 3). MAb 3F6 detected target antigen in all extracts. MAbs 7B2 and 2C1 did not react with allergen in European smelt, while MAb 18H3 and 16B3 in European perch and ruffe extracts. Moreover, neither MAb 2C1 nor 18H3 recognized parvalbumins in Atlantic salmon and rainbow trout, while MAb 18H3 also in greater argentine extract.

In our study, we analyzed MAbs reactivity with different fish extracts, including extracts of two fish species that are more common in our country (European smelt and Eurasian ruff) and have not been analyzed before. MAbs demonstrated broad-cross reactivity and were able to recognize fish allergens in commercial and in-house prepared fish extracts, suggesting their possible application for allergen detection in fish extracts.

Table 3. Summary of MAb reactivities with allergen extracts determined by ELISA, Western blot and dot blot assays.

Order	Allergen extract	MAb 7B2			MAb 2C1			MAb 18H3			MAb 16B3			MAb 3F6			MAb 6E4			MAb 14F3	
		E	WB	DB	E	WB	DB	E	WB	DB	E	WB	DB	E	WB	DB	E	WB	DB	E	DB
<i>Cypriniformes</i>	Common carp (DST)	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+	✓	✓		✓
<i>Cypriniformes</i>	Common carp	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+	✓	✓		
<i>Cypriniformes</i>	Common roach	+++	✓	✓	+++	✓	✓	++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+	✓	✓		✓
<i>Cypriniformes</i>	Common bream	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	++	✓	✓		✓
<i>Clupeiformes</i>	Atlantic herring (DST)	++	✓	✓	++	✓	✓	+	✓	✓	++	✓	✓	+++	✓	✓	+	✓	✓		✓
<i>Clupeiformes</i>	Atlantic herring	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+	✓	✓	+	✓		+++	✓	✓	+	✓	✓		✓
<i>Salmoniformes</i>	Atlantic salmon (DST)	+	✓	✓	+		✓	+		✓	+	✓	✓	++	✓	✓	++	✓	✓	+	✓
<i>Salmoniformes</i>	Atlantic salmon	+	✓	✓	+		✓			✓	+	✓	✓	+++	✓	✓	+	✓	✓		
<i>Salmoniformes</i>	Rainbow trout	+	✓	✓	+		✓			✓	+	✓	✓	+++	✓	✓	+	✓	✓		✓
<i>Gadiformes</i>	Atlantic cod (DST)	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	++	✓	✓	+	✓	✓		✓
<i>Gadiformes</i>	Saithe	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓		✓	✓		✓
<i>Gadiformes</i>	Alaska pollock	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓		✓	✓		✓
<i>Gadiformes</i>	Argentine hake	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓		✓	✓		✓
<i>Gadiformes</i>	Haddock	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+		✓		✓
<i>Gadiformes</i>	Pacific cod	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	++	✓	✓	+	✓	✓		✓

<i>Esociformes</i>	Northern pike	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓		✓	✓		
<i>Osmeriformes</i>	European smelt	+		✓	+		✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	++	✓			✓
<i>Osmeriformes</i>	Greater argentine	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+		✓	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+	✓	✓		✓
<i>Perciformes</i>	European perch	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+		✓	+		✓	+++	✓	✓		✓	✓		✓
<i>Perciformes</i>	Ruffe	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+		✓	+		✓	+++	✓	✓	+	✓	✓		✓
<i>Perciformes</i>	Gilt-head bream	+++	✓	✓	+++	✓	✓	++	✓	✓	+++	✓	✓	++	✓	✓		✓	✓		✓
<i>Pleuronectiformes</i>	Common dab	+++	✓	✓	+++	✓	✓	+	✓	✓	++	✓	✓		✓			✓	✓		✓

„✓“ indicate MAb reactivity with the antigen; empty space – no reactivity.

E – ELISA, WB – Western blot, DB – dot blot methods.

ELISA reactivity: (+++) OD₄₅₀ > 1.5; (++) OD₄₅₀ 0.5–1.5; (+) OD₄₅₀ < 0.5.

DST – commercial extracts from DST (Germany).

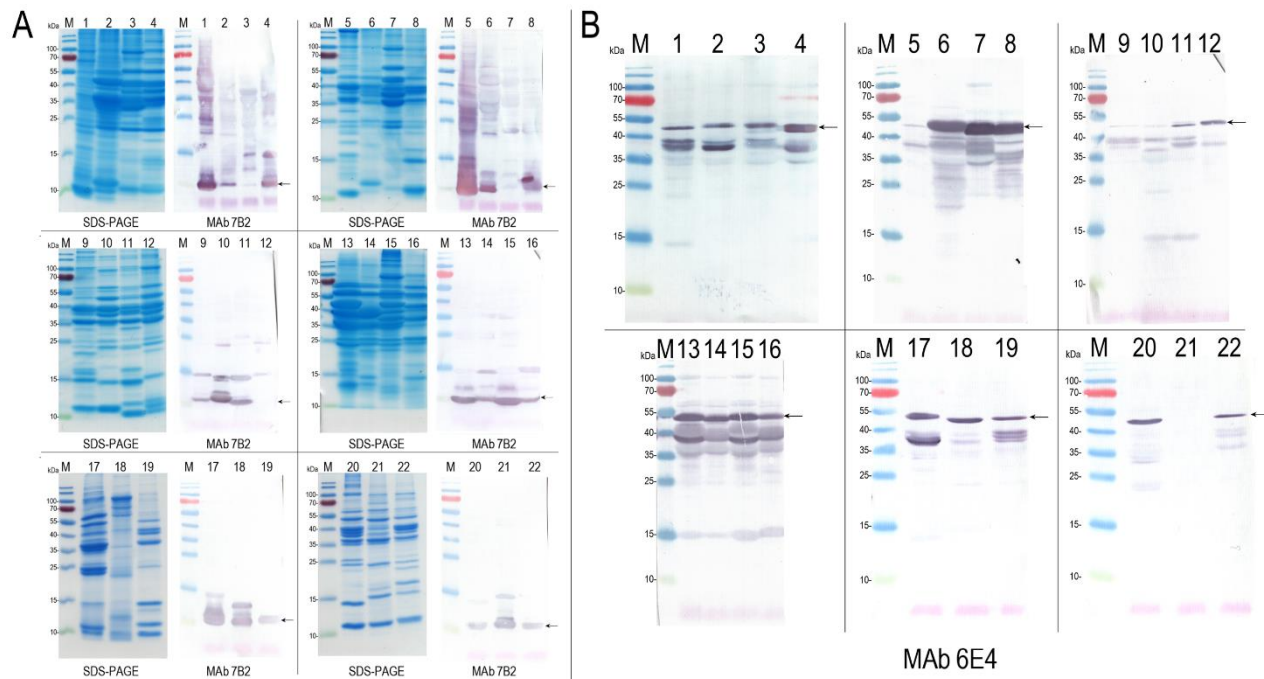


Fig. 5. The reactivity of MAb 7B2 (A) and 6E4 (B) with heated fish extracts by Western blot. Lane M: protein molecular weight marker; lane 1: Common carp (DST); lane 2: Atlantic herring (DST); lane 3: Atlantic salmon (DST); lane 4: Atlantic cod (DST); lane 5: Common carp; lane 6: Atlantic herring; lane 7: Atlantic salmon; lane 8: Rainbow trout; lane 9: Saithe; lane 10: Alaska pollock; lane 11: Northern pike; lane 12: European smelt; lane 13: Common roach; lane 14: Common bream; lane 15: European perch; lane 16: Eurasian ruffe; lane 17: Gilt-head bream; lane 18: Common dab; lane 19: Argentine hake; lane 20: Greater argentine; lane 21: Haddock; lane 22: Pacific cod; DST – commercial extracts, the others are in-house prepared extracts. The positions of β -parvalbumin (A) and β -enolase (B) are indicated by an arrow.

MAbs reactivity with allergens in other animal extracts

Enolase aa sequences share high similarity among different organisms: the similarity of enolases among fungi is $\geq 72\%$, among plants $\geq 86\%$ and among animals $\geq 81\%$ (Morales-Amparano et al., 2021). That is why we decided to investigate MAb 6E4 reactivity by WB with *E. coli* Tuner (DE3) and *E. coli* DH10B cell lysates, recombinant MBP-fused *Alternaria alternata* enolase (MBP-Alt a 6), Baker's yeasts extract, and with in-house prepared chicken and pork muscle extracts. Results showed that MAb 6E4 reacted with enolases from *E. coli* and *Saccharomyces cerevisiae*, as well as with β -enolase from chicken and pork (Fig. 6). Alignment of Cyp c 2 aa sequences with *E. coli* (UniProtKB accession no. P0A6P9) and *Saccharomyces cerevisiae* (UniProtKB accession no. P00924) revealed 54% and 65% sequence identities, respectively, indicating that MAb 6E4 binds to a highly conserved aa sequence of these antigens.

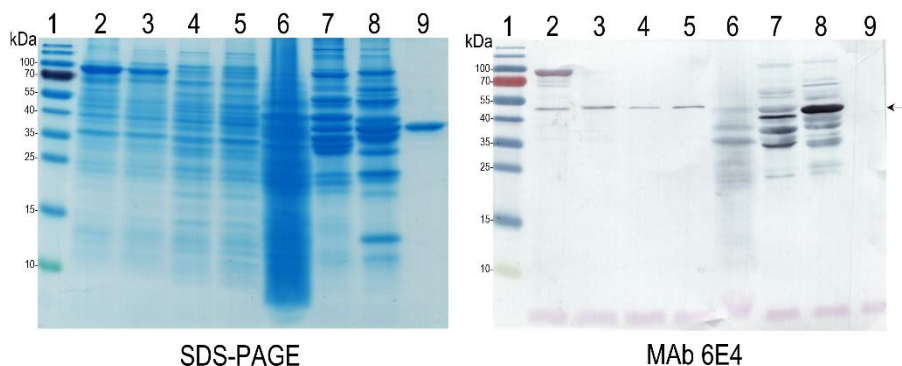


Fig. 6. The reactivity of MAb 6E4 with enolases from different organisms. Left: SDS-PAGE, right: WB with MAb 6E4. Lane 1: protein molecular weight marker; lane 2: MBP-Cyp c 2 in *E. coli* Tuner (DE3) cell lysate; lane 3: MBP-Alt a 6 in *E. coli* Tuner (DE3) cell lysate; lane 4: *E. coli* DH10B cell lysate; lane 5: *E. coli* Tuner (DE3) cell lysate; lane 6: the Baker's yeast extract; lane 7: in-house prepared chicken muscle extract; lane 8: in-house prepared pork muscle extract; line 9: recombinant purified MBP protein. The migration position of enolases indicated by an arrow.

Besides that, we analyzed the reactivity of MAbs raised against common carp β -enolase with in-house prepared chicken and pork muscle extracts by ELISA and dot blot. Both antibodies recognized β -enolases in meat extracts by dot blot, which could be explained by the high aa sequences identity (84%) between Cyp c 2 and chicken β -enolase (Gal d 9). In other studies, the cross-reactivity was demonstrated between Gal d 9 and Atlantic cod β -enolase (Gad

m 2) (Kuehn et al., 2016). Based on previous studies and our results, we assume that Cyp c 2 share common epitopes with β -enolases of other fish species and other animals (chicken, pork), that are recognized by our MAbs.

Since MAbs against fish parvalbumins recognized fish α - and β -parvalbumins, we decided to determine whether these antibodies may cross-react with parvalbumins of other animals. We investigated the reactivities of these MAbs with recombinant MBP-fused chicken α -parvalbumin (MBP-Gal d 8) and with in-house prepared chicken and pork muscle extracts by ELISA, WB and dot blot. All MAbs recognized recombinant MBP-Gal d 8 and reacted with non-heated chicken and pork extracts (Fig 7 and Table 2).

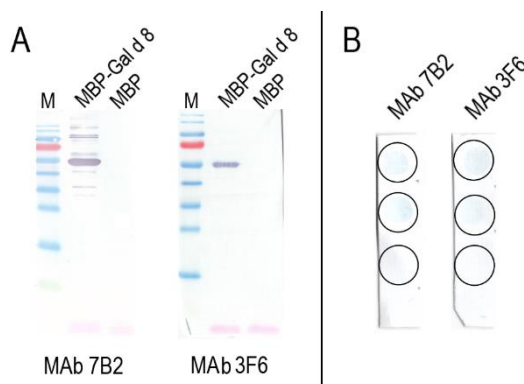


Fig. 7. The reactivity of MAb 7B2 and 3F6 with heated recombinant chicken α -parvalbumin (MBP-Gal d 8) by WB (A) and with other animal muscle extracts by dot blot (B). Lane M: protein molecular weight marker. Samples were spotted onto the PVDF membrane from top to bottom: chicken extract; pork extract; MBP (negative control).

Cross-reactivities between parvalbumins of fish and other animals (frog, chicken and crocodile) have been reported in previous studies (Kuehn et al., 2016; Haroun-Diaz et al., 2021). In our study, we showed that not only serum samples of fish-allergic patients reacted with recombinant MBP-Gal d 8, but also MAbs against fish parvalbumins, even though Gal d 8 shares only 56% aa sequence identity with Cyp c 1 and 54% with Gad m 1. Since MAbs detected parvalbumins in chicken and pork extracts, it shows that these antibodies recognize epitopes common to parvalbumins not only of various fish species but also other animals.

Localization of MAb epitopes

To determine the epitopes of recombinant Cyp c 2, Gad m 1 and Cyp c 1 proteins recognized by the MAbs, overlapping recombinant MBP-fused

fragments of Cyp c 2 (MBP-Cyp c 2-C1, aa 1–698, MBP-Cyp c 2-C2, aa 1–622, MBP-Cyp c 2-C3, aa 1–543), Gad m 1 (fragment #1, aa 1–84, fragment #2, aa 21–110) and Cyp c 1 (fragment #3, aa 1–73, fragment #4, aa 30–104) were constructed (Fig. 8 and 9).

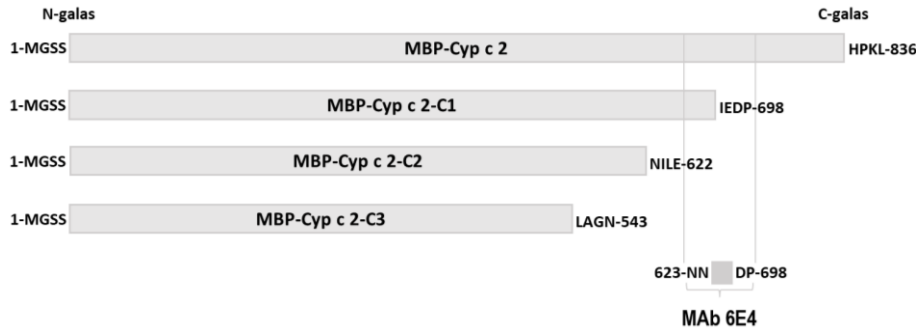


Fig. 8. Mapping of MAb 6E4 epitope using truncated variants of MBP-Cyp c 2 comprising aa 1–698 (MBP-Cyp c 2-C1), aa 1–622 (MBP-Cyp c 2-C2) and aa 1–543 (MBP-Cyp c 2-C3) of β -enolase. The aa sequence recognized by MAb 6E4 are indicated (aa 623–698).

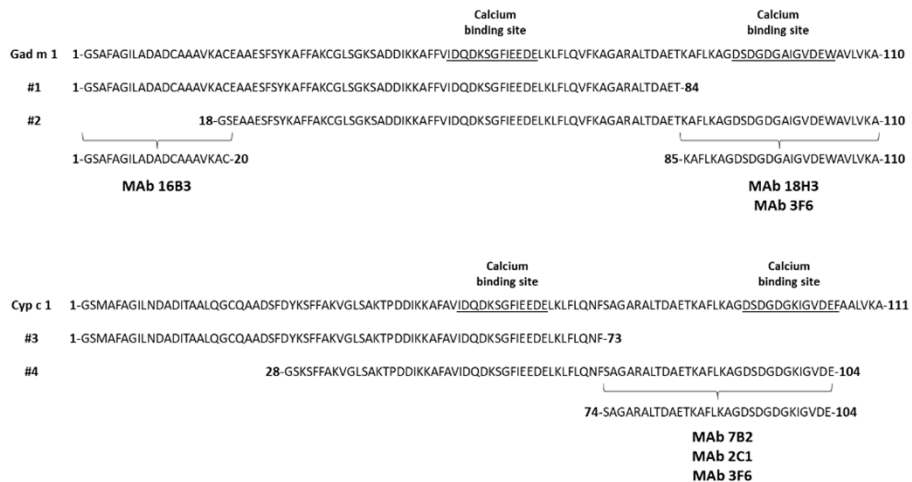


Fig. 9. Mapping of MAb against fish parvalbumins epitopes using recombinant overlapping MBP-fused fragments of Gad m 1 and Cyp c 1 proteins. The aa sequences recognized by the respective MABs are indicated.

Recombinant fragments were expressed in *E. coli* Tuner (DE3) cells and the reactivities of MABs with the lysates of transformed *E. coli* cells expressing the respective fragments were investigated by WB (Fig. 10 and 11).

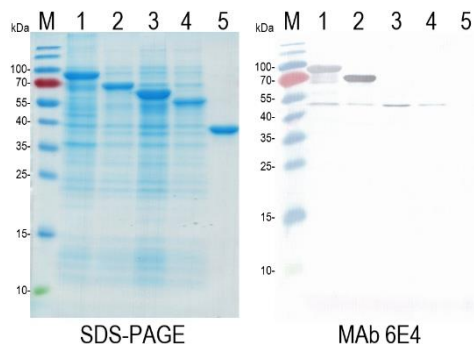


Fig. 10. The reactivity of MAb 6E4 with recombinant overlapping MBP-fused fragments of MBP-Cyp c 2 in *E. coli* cell lysates analyzed by WB. Lane M: protein molecular weight marker; lane 1: MBP-Cyp c 2 (91.7 kDa); lane 2: MBP-Cyp c 2-C1 (76.3 kDa); lane 3: MBP-Cyp c 2-C2 (67.8 kDa); lane 4: MBP-Cyp c 2-C3 (59.3 kDa); lane 5: recombinant purified MBP as a negative control (44.2 kDa).

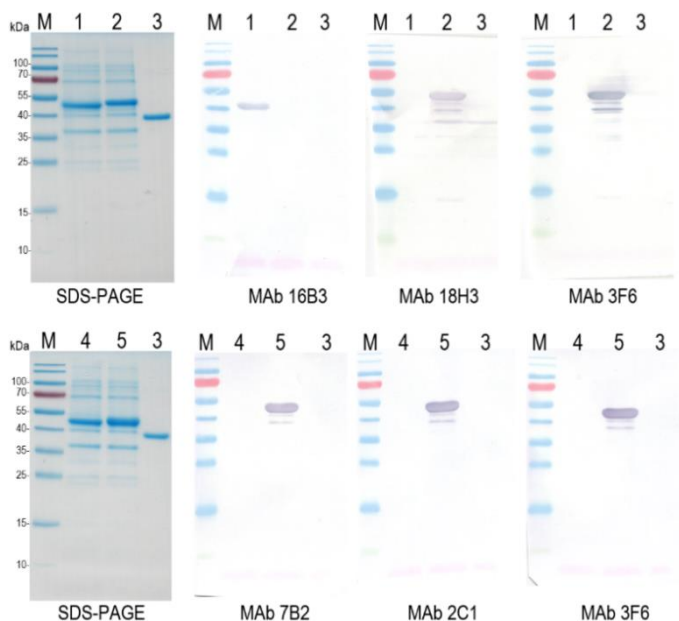


Fig. 11. The reactivity of MAbs with recombinant overlapping MBP-fused fragments of Gad m 1 and Cyp c 1 in *E. coli* cell lysates analyzed by WB. Lane M: protein molecular weight marker; lane 1: fragment #1 (52.9 kDa); lane 2: fragment #2 (53.9 kDa); lane 3: recombinant purified MBP as a negative control (44.2 kDa); lane 4: fragment #3 (51.9 kDa); lane 5: fragment #4 (52.2 kDa).

MAb 6E4 reacted with MBP-Cyp c 2-C1, the C-terminal region of Cyp c 2. MAbs 7B2 and 2C1 recognized fragment #4, which represents the C-terminal region of Cyp c 1, while MAb 18H3 reacted with fragment #2, the

C-terminal region of Gad m 1. Only MAb 16B3 recognized fragment #1 the N-terminal region of Gad m 1, while MAb 3F6 reacted both with fragment #2 and fragment #4 representing the C-terminal regions of Gad m 1 and Cyp c 1, respectively. After analysing the results, it was concluded that the epitope of MAb 6E4 is located between aa 623–698 of Cyp c 2. The epitopes MAb 7B2 and 2C1 are located between aa 74–104 of Cyp c 1, the epitope of MAb 18H3 – between aa 85–110 of Gad m 1, the epitope of MAb 16B3 – between aa 1–20 of Gad m 1 and the epitope of MAb 3F6 – between aa 74–104 of Cyp c 1 (Fig. 8 and 9).

Aligning common carp β -enolase 76 aa-long sequence (aa 623–698), that was recognized by the MAb 6E4, with aa sequences of other fish (Atlantic cod, striped catfish and Atlantic salmon) and chicken β -enolases, revealed more than 90% and 70% aa sequence identity, respectively. This high aa sequence similarities could explain MAb 6E4 reactivity with β -enolases from various fish species and other organisms.

The homology between the C-terminal region of Cyp c 1 with other recombinant fish parvalbumins and chicken α -parvalbumin, that were synthesized in our study, is more than 65%. This could explain the broad reactivity of MAb 3F6 with parvalbumins of different fish species and other animals. In contrast, the N-terminal region of Gad m 1 (aa 1–20), recognized by MAb 16B3, shows low sequence similarity with other recombinant parvalbumins, especially with α -parvalbumins (30–40%). This suggests that MAb 16B3 could be applied only for analyzing β -parvalbumins of certain fish species.

The use of MAbs for parvalbumin immunoprecipitation from allergen extracts

Since we showed that MAbs recognize parvalbumins in allergen extracts, we decided to investigate their ability to isolate allergens from allergen extracts by immunoprecipitation method. Selected commercial and in-house prepared extracts of carp and salmon were incubated overnight with prepared Protein A-Sepharose complex with either MAb 7B2 or 3F6. As a negative control for immunoprecipitation, we also pre-incubated MBP-specific MAb 19C19 with Protein A-Sepharose and then incubated with allergen extracts. After overnight incubation, the sepharose-antibody-parvalbumin complex was analyzed by SDS-PAGE and WB. Using HRP-labeled MAb 3F6 about 10–12 kDa sized protein bands corresponding to parvalbumins were identified in all analyzed extracts. MAb 7B2 was able to immunoprecipitate fish β -parvalbumin from carp extract, while MAb 3F6 – from both fish species extracts. No protein bands were detected after incubation with MBP-specific

MAb 19C19 thus confirming the specificity of the immunoprecipitation assay (Fig. 12).

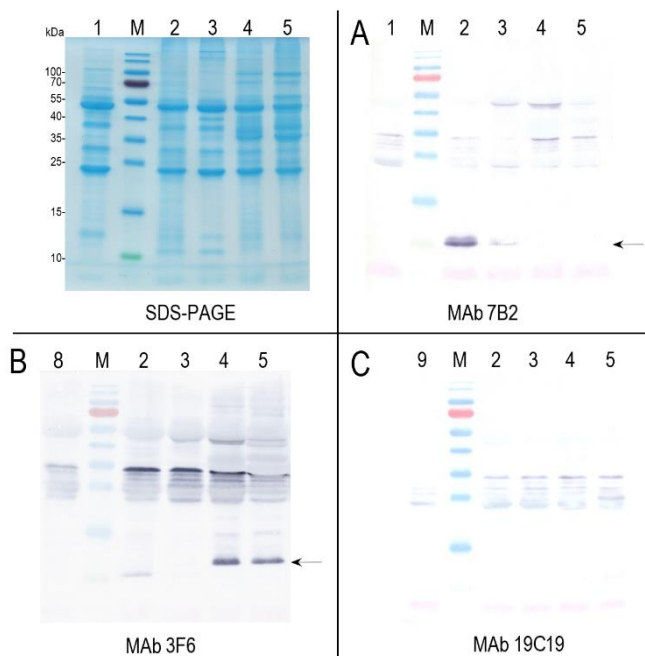


Fig. 12. Parvalbumin immunoprecipitation from allergen extracts either using MAb 7B2 (A) or MAb 3F6 (B) and detection with HRP-labeled MAb 3F6 by WB. Lane M: protein molecular weight marker; lane 1: Protein A-sepharose complex with MAb 7B2; lane 2–3: carp extract; lane 4–5: salmon extract; lane 8: Protein A-Sepharose complex with MAb 3F6; lane 9: Protein A-sepharose complex with anti-MBP MAb 19C19; Lanes 2, 4 and 6: commercial extracts; lane 3, 5 and 7: in-house prepared extracts. Anti-MBP MAb 19C19 was used as a negative control (C). The position of parvalbumin is indicated by an arrow.

The ability of both MAbs to capture and isolate parvalbumins from extracts demonstrates their potential use for the standardization of allergen extract.

The application of MAbs for parvalbumin detection in allergen extracts

ELISA is one of the most commonly used methods for fish allergen detection in analyzed samples. Polyclonal antibodies against certain fish allergens were used to develop sandwich ELISAs for fish allergen detection in various food samples. Even though they demonstrated high method sensitivity, they also showed limitations in detecting allergens in certain fish species (Liang et al., 2022; Faeste and Plassen, 2008; Shibahara et al., 2013; Dasanayaka et al., 2021). Since our MAbs against fish parvalbumins

demonstrated broad cross-reactivity with different fish species and were able to detect allergens in in-house prepared fish extracts, we decided to use them to develop sandwich ELISA for parvalbumin detection in analyzed samples.

First, we selected a suitable MAb pair (one MAb to capture and the other to detect target antigen), by performing indirect ELISA and testing different MAb compositions. Based on this test, capture-detection antibody pairs that detected recombinant MBP-Sco s 1 or MBP-Cyp c 1 proteins in the analyzed solutions were selected (Fig 13).

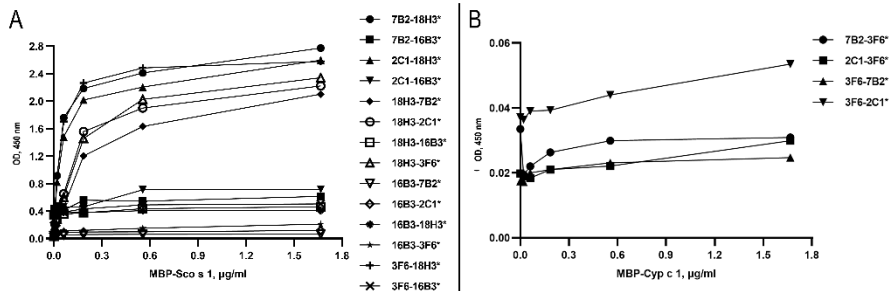


Fig. 13. Selection of MAb pair for sandwich ELISA development. A – recombinant MBP-Sco s 1 protein is used for pair selection, B – recombinant MBP-Cyp c 1 protein. *,** next to the MAb name indicates that the antibody is HRP-labeled.

Two MAb pairs (18H3-3F6* and 7B2-18H3*) that demonstrated the highest assay sensitivity were selected for the development and optimization of sandwich ELISA.

During the optimization, we selected several assay parameters (blocking solution, MAb concentration, etc.) to improve its sensitivity. Two variants of sandwich ELISA were developed. The first one is based on the 7B2-18H3* pair and its sensitivity is $1,211 \pm 0,022$ ng/mL, while the other is based on the 18H3-3F6* pair with a sensitivity of $1,857 \pm 0,034$ ng/mL (Fig. 14).

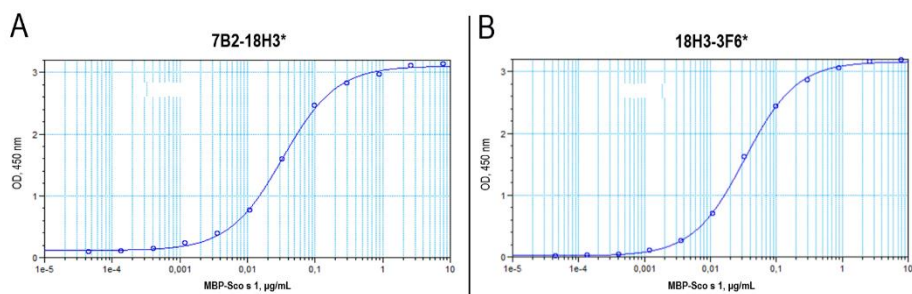


Fig. 14. Calibration curves of optimized sandwich ELISA. A – assay was developed using 7B2-18H3* pair, B – using 18H3-3F6* pair.

Table 4. The determined concentrations of parvalbumins (ng/mL) in the tested extracts using optimized sandwich ELISA systems, that were developed using either 7B2-18H3* pair or MAb 18H3-3F6* pair.

Extract	MAb pair	
	7B2–18H3*	18H3–3F6*
<i>Common carp (DST)</i>	60,58	-
<i>Atlantic herring (DST)</i>	-	-
<i>Atlantic salmon (DST)</i>	-	-
<i>Atlantic cod (DST)</i>	38,64	103,43
<i>Common carp</i>	39,66	-
<i>Atlantic herring</i>	-	-
<i>Atlantic salmon</i>	-	-
<i>Rainbow trout</i>	-	-
<i>Saithe</i>	46,4	490,69
<i>Alaska pollock</i>	19,44	33,33
<i>Northern pike</i>	40,96	69,6
<i>European smelt</i>	-	400,7
<i>Common roach</i>	253,42	1,45
<i>Common bream</i>	27,67	1,92
<i>European perch</i>	18,87	3,49
<i>Ruffe</i>	2,5	1,96
<i>Gilt-head bream</i>	86,29	-
<i>Common dab</i>	30,44	2,59
<i>Argentine hake</i>	42,91	164,91
<i>Greater argentine</i>	3,3	-
<i>Haddock</i>	27,45	895,1
<i>Pacific cod</i>	21,59	119,75
<i>Northern prawn</i>	-	-
<i>Crab sticks</i>	9,93	1,89
<i>Salted Atlantic herring</i>	-	-
<i>Canned African mackerel</i>	-	-
<i>Canned Atlantic cod</i>	-	-
<i>Canned skipjack tuna</i>	-	-
<i>Cold smoked Atlantic salmon</i>	3,1	-
<i>Cold smoked Atlantic mackerel</i>	65,51	3,13
<i>Smoked sprats</i>	2,5	2,8
<i>Pork</i>	-	-
<i>Chicken</i>	-	-

To evaluate the suitability of new ELISAs for the detection of parvalbumins in various allergen extracts, we analyzed 4 commercial and 29 in-house prepared allergen extracts using both sandwich ELISA systems (Table 4).

Both assays detected parvalbumins in most of the analyzed fish extracts. Analyzing extracts with MAb 18H3-3F6* pair, the highest fish protein concentrations (>400 ng/mL) were determined in saithe, European smelt and haddock, while using MAb 7B2-18H3* (>200 ng/mL) in the common roach extract. Moreover, we noticed that MAb 18H3-3F6* pair did not detect parvalbumins in common carp, gilt-head bream and greater argentine, while MAbs 7B2-18H3* pair in European smelt. These results indicated that each MAb pair could be applied to analyze allergen extracts of certain fish species. Furthermore, no parvalbumins were detected in canned fish extracts, suggesting that MAbs were not able to recognize target allergens due to possible changes in parvalbumin antigenic structure during canning. Moreover, both sandwich ELISAs showed no reactivity with chicken and pork muscle extracts. Despite that, parvalbumin concentrations were determined in prepared extracts of smoked fish and crab sticks.

Summarizing, in this study we have generated a collection of recombinant allergens (n=14) fused to maltose-binding protein and a collection of broadly-reactive MAbs (n=7) against fish allergens, characterized them by different immunoassays, including epitope mapping, and evaluated their potential to investigate and quantify target allergens in allergen extracts.

Conclusions

1. Recombinant allergens fused to maltose binding protein and produced in *E. coli* expression system are antigenically similar to natural allergens as proven by their reactivity with allergen-specific IgE in the blood serum of fish-allergic patients.
2. Antigenicity studies of recombinant common carp β -enolase, for the first time produced in bacterial expression system, confirmed that it is a new fish allergen (Cyp c 2).
3. The use of recombinant common carp β -enolase, recombinant common carp β -parvalbumin and natural Atlantic cod β -parvalbumin as immunogens resulted in new hybridoma cell lines secreting MAbs of IgG isotype suitable for identification and investigation of target allergens.
4. A comprehensive characterization of MAbs and epitope mapping revealed that most MAbs recognize conserved linear epitopes present in target allergens of different origin.
5. All developed MAbs are cross-reactive and could be applied to the detection of allergens in the extracts of various fish and other animals.
6. The broadly-reactive MAb 3F6 could be applied for the analysis and standardization of allergen extracts of various fish species.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Publikacijos susijusios su disertacijos tema:

1. **Slišienė A**, Plečkaitytė M, Zaveckas M, Juškaitė K, Rudokas V, Žvirblis G, Žvirblienė A. Monoclonal antibodies against the newly identified allergen β -enolase from common carp (*Cyprinus carpio*), *Food and Agricultural Immunology*. 2022;33(1):129–149. doi:10.1080/09540105.2022.2028741.

2. **Slišienė A**, Plečkaitytė M, Rudokas V, Juškaitė K, Žvirblis G, Žvirblienė A. Cross-reactive monoclonal antibodies against fish parvalbumins as a tool for studying antigenic similarity of different parvalbumins and analysis of fish extracts. *Mol Immunol*. 2023;154:80–95. doi:10.1016/j.molimm.2023.01.001.

Publikacijos nesusijusios su disertacijos tema:

1. Stravinskiene D, **Imbrasaite A**, Petrikaite V, Matulis D, Matulienė J, Zvirbliene A. New Monoclonal Antibodies for a Selective Detection of Membrane-Associated and Soluble Forms of Carbonic Anhydrase IX in Human Cell Lines and Biological Samples. *Biomolecules*. 2019;9(8):304. doi:10.3390/biom9080304.

2. Stravinskiene D, **Sližiene A**, Baranauskiene L, Petrikaite V, Zvirbliene A. Inhibitory Monoclonal Antibodies and Their Recombinant Derivatives Targeting Surface-Exposed Carbonic Anhydrase XII on Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24):9411. doi:10.3390/ijms21249411.

3. Matulienė J, Žvinys G, Petrauskas V, Kvietkauskaitė A, Zakšauskas A, Shubin K, Zubrienė A, Baranauskienė L, Kačenauskaitė L, Kopanchuk S, Veiksina S, Paketurytė-Latvė V, Smirnovienė J, Juozapaitienė V, Mickevičiūtė A, Michailovienė V, Jachno J, Stravinskienė D, **Slišienė A**, Petrošiūtė A, Becker HM, Kazokaitė-Adomaitienė J, Yaromina A, Čapkuskaitė E, Rinken A, Dudutienė V, Dubois LJ, Matulis D. Picomolar fluorescent probes for compound affinity determination to carbonic anhydrase IX expressed in live cancer cells. *Sci Rep*. 2022;12(1):17644. doi:10.1038/s41598-022-22436-1.

4. Grincevičienė Š, Vaitkienė D, Kanopienė D, Vansevičiūtė R, Tykvart J, Sukovas A, Celiešiūtė J, Ivanauskaitė Didžiokienė E, Čižauskas A, Laurinavičienė A, Král V, Hlavačková A, Zemanová J, Stravinskienė D, **Slišienė A**, Petrošiūtė A, Petrauskas V, Balsytė R, Grincevičius J, Navratil V, Jahn U, Konvalinka J, Žvirblienė A, Matulis D, Matulienė J. Factors, associated with elevated concentration of soluble carbonic anhydrase IX in plasma of women with cervical dysplasia. *Sci Rep.* 2022;12(1):15397. doi:10.1038/s41598-022-19492-y.

Su disertacijos tema nesusijęs knygos skyrius:

Imbrasaitė A, Stravinskienė D, Žvirblienė A (2019) Detection of Carbonic Anhydrases. In: Matulis D. (red.) Carbonic Anhydrase as Drug Target. *Springer*, Cham. pp 323-333.

PATENTAI

1. Žvirblis G, Slišienė A, Plečkaitytė M, Zaveckas M. Monokloniniai antikūnai prieš paprastojo karpio beta enolazę. Paraiška Nr. 2021 509, LT patentas Nr. 509 A (2021).

2. Zvirblis G, Sližiene A, Plečkaityte M, Zaveckas M. Monoclonal antibodies against common carp beta-enolase. Patent application No. 21177472.4, No. 4 056 595 A1.

PRANEŠIMAI KONFERENCIJOSE

1. Tarptautinė mokslinė konferencija FEBS3+. Žodinis pranešimas „Generation and characterization of monoclonal antibodies against Atlantic cod parvalbumin“. 2019 m. birželio 17–19 d., Ryga, Latvija.

2. Tarptautinis mokslinis simpoziumas (2019 International Symposium on Molecular Allergology (ISMA)). Stendinis pranešimas „Production of salmon and Baltic cod allergens in *E.coli*“. 2019 m. lapkričio 28–30 d., Amsterdamas, Nyderlandai.

3. Tarptautinė mokslinė konferencija (Allergy School on Food Allergy). Stendinis pranešimas „The cross-reactivity of monoclonal antibodies raised against Atlantic cod allergen Gad m 1 with other recombinant fish allergens“. 2019 m. gruodžio 5–7 d., Paryžius, Prancūzija.

4. 12-oji jaunųjų mokslininkų konferencija „Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“. Žodinis pranešimas „Rekombinantinių parvalbuminų biosintezė bakterijose ir jų antigeninių savybių tyrimas, naudojant monokloninius antikūnus prieš atlantinės menkės alergeną“. 2019 m. gruodžio 11 d., Kaunas, Lietuva.

5. Tarptautinė mokslinė konferencija (Food Allergy and Anaphylaxis 2020 (FAAM) and the European Consortium on Application of Flow Cytometry in Allergy 2020 (EUROBAT)). Stendinis pranešimas „Production of recombinant fish allergens in *E.coli* and their reactivity with monoclonal antibodies raised against Atlantic cod allergen Gad m 1“. 2020 m. spalio 16–17 d., vyko nuotoliniu būdu.

6. Tarptautinė imunologijos mokykla (19th Immunology Winter School on Basic Immunology Research in Allergy and Clinical Immunology). Stendinis pranešimas „Generation of monoclonal antibodies against Atlantic cod parvalbumin and their reactivity with recombinant fish allergens“. 2021 m. sausio 22–24 d., vyko nuotoliniu būdu.

7. Tarptautinė mokslinė konferencija („The COINS 2021“, International Conference of Life Sciences). Stendinis pranešimas „Generation of monoclonal antibodies against Atlantic cod parvalbumin and their reactivity with recombinant fish allergens“. 2021 m. vasario 27d., vyko nuotoliniu būdu.

8. Tarptautinė mokslinė konferencija (The Sixth European Congress of Immunology (6th ECI 2021)). Stendinis pranešimas „Generation and characterization of a broadly-reactive monoclonal antibody against fish parvalbumins“. 2021 m. rugsėjo 1–4 d., vyko nuotoliniu būdu.

9. Tarptautinė mokslinė konferencija (EAACI Hybrid Congress 2022). Stendinis pranešimas “Novel monoclonal antibodies against common carp (*Cyprinus carpio*) β -enolase”. 2022 m. liepos 1–3 d., Praha, Čekija.

10. Tarptautinė mokslinė konferencija („Molekulinių gyvybės mokslų pasiekimai“, skirta prof. Andriaus Sniadeckio atminimo įamžinimui). Stendinis pranešimas „The use of a broadly reactive monoclonal antibody for antigenic characterization of recombinant fish parvalbumins”. 2023 m. gegužės 24–25 d., Vilnius, Lietuva.

11. Tarptautinė mokslinė konferencija (EAACI Hybrid Congress 2023). Stendinis pranešimas „Epitope mapping of monoclonal antibodies raised against fish parvalbumins and their reactivity with different fish extracts”. 2023 m. birželio 9–11 d., Hamburgas, Vokietija.

CURRICULUM VITAE

Vardas, Pavardė Gimimo data	AISTĖ SLIŽIENĖ (IMBRASAITĖ) 1994-02-23
Darbo adresas	Vilniaus Universitetas (VU), Gyvybės mokslų centras (GMC), Biotechnologijos institutas (BTI), Imunologijos skyrius (ILS), Saulėtekio al. 7, Vilnius. V227 kab.
El. paštas	aiste.sliziene@gmc.vu.lt
Išsilavinimas <i>2012–2016</i> <i>2016–2018</i> <i>2018–2022</i>	VU, Biochemijos bakalauro laipsnis VU, Biochemijos magistro laipsnis Chemijos inžinerijos doktorantūros studijos VU GMC BTI ILS
Darbo patirtis <i>2016–2017</i> <i>2017–2018</i> <i>2018–2019</i> <i>2018–2020</i> <i>Nuo 2020 m.</i>	VU GMC BTI ILS laborantė UAB „Imunodiagnostika“ laborantė UAB „Imunodiagnostika“ mokslo darbuotoja VU GMC BTI ILS biologė tyrėja VU GMC BTI ILS jaunesnioji mokslo darbuotoja
Apdovanojimai <i>2019 12 5–7</i> <i>2019 12 11</i>	Apdovanojimas už geriausią stendinį pranešimą „The cross-reactivity of monoclonal antibodies raised against Atlantic cod allergen Gad m 1 with other recombinant fish allergens”. Tarptautinė mokslinė konferencija (Allergy School on Food Allergy), 2019 m. gruodžio 5–7 d., Paryžius, Prancūzija. Trečios vietos apdovanojimas už žodinį pranešimą „Rekombinantinių parvalbūminų biosintezė bakterijose ir jų antigeninių savybių tyrimas, naudojant monokloninius antikūnus prieš atlantinės menkės alergeną”. 12-oji jaunųjų mokslininkų konferencija „Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos”, 2019 m. gruodžio 11 d., Kaunas, Lietuva.
Narystės <i>Nuo 2017</i> <i>Nuo 2019</i> <i>Nuo 2022</i>	Lietuvos biochemikų draugijos narė The European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) Junior Member Lietuvos imunologų draugijos narė

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovei dr. Aurelijai Žvirblienei už suteiktą galimybę atlikti šį darbą, už skatinimą tobulėti ir pasitikėjimą, už pagalbą rašant, palaikymą ir vertingus patarimus.

Nuoširdžiai dėkoju visiems VU GMC BTI Imunologijos skyriaus kolegoms dr. Indrei Kučinskaitei-Kodzei, dr. Dovilei Stravinskienei, Indrei Dalgėdienei, dr. Martynui Simanavičiui, Karolinai Bielskei, Vytautui Rudokui, Agnei Rimkutei, dr. Astai Lučiūnaitei, Kristinai Mašalaitei, Dainiui Gudui ir kt. už patarimus, draugišką aplinką, pagalbą, diskusijas ir skaitinimą tobulėti. Taip pat dėkoju savo studentams Margaritai Kondratovič, Ignei Visockiui, Onai Šaulianskaitė ir Mariui Vinogradovui už pagalbą atliekant tyrimus ir suteiktą galimybę tobulėti.

Dėkoju dr. Gintautui Žvirbliui už pagalbą planuojant tyrimus, diskusijas ir naudingus patarimus. Taip pat už duomenų apie β -enolazę pateikimą į tarptautines duomenų bazes ir už pagalbą ruošiant publikacijas.

Dėkoju dr. Mildai Plečkaitytei už pagalbą, suteiktas žinias, patarimus ir galimybę naudotis laboratorijos priemonėmis vykdant rekombinantinių alergenų sintezę. Taip pat dėkoju už rekombinantinių paprastojo karpio alergenų biosintezę ir už pagalbą ir patarimus ruošiant publikacijas.

Dėkoju doktorantei Karolinai Bielskei už rekombinantinių paprastojo karpio baltymų sąveikos su kraujo serumo mėginiais tyrimus ir už suteiktas žinias ir pagalbą vykdant rekombinantinių alergenų sintezę.

Dėkoju dr. Mindaugui Zaveckui ir doktorantui Vytautui Rudokui už rekombinantinių alergenų gryninimą.

Dėkoju dr. Martynui Simanavičiui už suteiktas žinias ir pagalbą kuriant monokloninius antikūnus.

Dėkoju Europos regioninės plėtros fondui (ERPF) už tyrimų finansavimą (Nr. 01.2.2-LMT-K-718-01-0008).

Nuoširdžiausiai dėkoju savo vyrui už nuolatinį palaikymą, supratimą ir buvimą kartu. Dėkoju savo tėveliams ir sesei už rūpestį, palaikymą ir skatinimą siekti užsibrėžtų tikslų. Ačiū, kad buvote su manim šioje ypatingoje kelionėje!

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 15 egz.