

Olsztyn, dnia 23.05.2022

Alergeny w żywności można wykrywać, identyfikując peptydy będące markerami ich obecności. Markery charakterystyczne dla danej rodziny białek mogą służyć do wykrywania obecności alergenów o nieznanach sekwencjach aminokwasowych, w oparciu o podobieństwo ich sekwencji do sekwencji białek z gatunków pokrewnych filogenetycznie. Identyfikacja peptydów pochodzących z białek o nieznanach sekwencjach jest wykonywana głównie za pomocą techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (RP-LC-MS/MS).

Celem badań było zidentyfikowanie peptydów pochodzących z tropomiozyn z tropomiozyn w przetworzonych produktach z owoców morza. W pierwszym etapie przeprowadzono analizę bioinformatyczną wybranych sekwencji aminokwasowych tropomiozyn. W ramach eksperymentu laboratoryjnego, wyekstrahowano białka z 4 produktów poddanych rozmrożeniu, ugotowaniu lub usmażeniu bez tłuszczu, a także z dwóch produktów gotowych do spożycia. Białka hydrolizowano trypsyną, zliofilizowano, a hydrolizaty poddano analizie RP-LC-MS/MS. Wybrane surowce zawierały gatunki zarówno o znanych, jak i nieznanach sekwencjach tropomiozyn.

Na drodze analizy *in silico* wyodrębniono 72 sekwencje aminokwasowe peptydów (o długości od 7 do 15 aminokwasów), które występowały jako produkty symulowanej proteolizy trypsyną co najmniej dwóch sekwencji tropomiozyn. Następnie poddano je analizie pod kątem ich występowania w ogólnej liczbie sekwencji tropomiozyn z bazy UniProtKB. Uzyskany wynik przeliczono na procent, jaki stanowi ta liczba w ogólnej liczbie tropomiozyn w bazach rodzin białek Interpro i Pfam.

Po analizie RP-LC-MS/MS, wybrano 40 peptydów o zbliżonych czasach retencji, obecnych w co najmniej dwóch próbkach. Następnie wyodrębniono te, których nie było wśród produktów symulowanej proteolizy trypsyną (takie, w których pozostały niezhydrolizowane wiązania peptydowe). Te peptydy (23) przeanalizowano pod kątem obecności w nich fragmentów epitopów alergennych tropomiozyn z bazy Immune Epitope Database. Pozostałe 17 peptydów, stanowiących produkty symulowanej proteolizy trypsyną, również poddano analizie, aby stwierdzić, czy są fragmentami epitopów. W obu przypadkach obliczono stopień pokrycia sekwencji epitopu i peptydu (SCC). Aby sprawdzić do jakich rodzin należą białka, z których może zostać uwolniony dany peptyd (po trawieniu trypsyną), zastosowano narzędzie UniPept, przy pomocy którego wygenerowano drzewa filogenetyczne, ilustrujące taksonomiczne podobieństwo pomiędzy organizmami, będącymi źródłami białek

prekursorowych badanych peptydów. Przeanalizowano także rozpowszechnienie tych peptydów w sekwencjach białek z rodziny tropomiozyn (na podstawie wyników z analizy *in silico*). Następnie oceniono przydatność analizowanych peptydów jako potencjalne markery tropomiozyn.

Za pomocą oprogramowania PEAKS określono stopień pokrycia sekwencji aminokwasowych tropomiozyn obecnych w próbce z sekwencjami aminokwasowymi tropomiozyn dostępnych w bazie UniProtKB. Oprogramowanie zidentyfikowało analizowane peptydy jako fragmenty znanych alergennych tropomiozyn. Gotowanie surowca pozwoliło na uzyskanie dłuższych fragmentów po trawieniu trypsyną, co umożliwiło uzyskanie wyższego stopnia pokrycia sekwencji. Smażenie zaś, ze względu na zmiany zachodzące w strukturze białka, znacznie obniżyło możliwość pokrycia sekwencji aminokwasowej, przy pomocy algorytmów komputerowych. W tym przypadku konieczne było wykorzystanie sekwencjonowania *de novo*.

Zastosowanie uniwersalnego markera peptydowego, charakterystycznego dla rodziny białek, umożliwia wykrycie alergenu bez konieczności znajomości jego dokładnej sekwencji aminokwasowej. Takie podejście, proponowane w niniejszej pracy, można uznać za odwrócenie tradycyjnego paradygmatu dotyczącego wykrywania alergenów, zakładającego wyszukiwanie peptydów unikalnych dla danej sekwencji aminokwasowej białka.