

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Angela CIVIDINI

**MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA BELJAKOVIN V MLEKU
KOBILE (*Equus caballus*)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PROTEINS IN MARE'S
MILK (*Equus caballus*)**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2016

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 4. 11. 2010 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Podiplomskem študiju bioloških in biotehniških znanosti, znanstveno področje zootehnika. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Peter Dovč. Za somentorico je bila imenovana prof. dr. Mojca Narat.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Irena ROGELJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Ante IVANKOVIĆ
Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet Zagreb

Član: doc. dr. Marija KLOPČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora: 20.6.2016

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Angela CIVIDINI

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK UDK 636.1:575(043.3)=163.6
KG konji/kobilje mleko/beljakovine/kazein/genetika/molekularna karakterizacija
KK AGRIS L10/5120
AV CIVIDINI, Angela, univ. dipl. inž. zoot., mag. znanosti
SA DOVČ, Peter (mentor)/NARAT, Mojca (somentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, doktorski študij Bioloških in biotehniških znanosti, področje zootehnika
LI 2016
IN MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA BELJAKOVIN V MLEKU KOBILE (*Equus caballus*)
TD Doktorska disertacija
OP XIII, 94 str., 18 pregl., 28 sl., 1 pril., 119 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Kazeini so pomembna frakcija proteinov v mleku. Pomembno vlogo pri generiraju njihove pestrosti ima alternativno vključevanje eksonov pri procesiranju sporočilne RNA. Rezultat alternativnega vključevanja eksonov so različne oblike mRNA določenega kazeina. Zaradi posttranslacijskih modifikacij (glikozilacije in fosforilacije) nastanejo glikozilacijske in fosforilacijske oblike kazeinov, ki na proteomske ravni še dodatno otežujejo karakterizacijo oblik kazeinov. V naši raziskavi smo preučevali možnost karakterizacije različnih oblik β -kazeina v kobiljem mleku. Potrdili smo vpliv dveh nukleotidnih zamenjav v intronu 1 na vzorec vključevanja eksonov v zrelo mRNA β -kazeina. Posledica takega izrezovanja je nastanek več oblik β -kazeina, ki se med seboj razlikujejo po dolžini oz. po vsebnosti eksonov. Različne oblike β -kazeina smo skušali ločiti na osnovi proteinskega profila V ta namen smo optimizirali metodo ločevanja kazeinov kobiljega mleka, to je dvo-dimenzionalno elektroforezo (2-D). Na kazeinskem profilu smo prepoznali tudi različne izoelektrične variante β -kazeina, kot posledica različne stopnje fosforilacije. Za potrditev identifikacije ločenih kazeinov smo le tem določili zamoredje aminokislin na N-terminalnem koncu. Z imunoencimskim testom smo primerjali alergenost kazeinov kobiljega in kravjega mleka. Za α_{S1} - in β -kazein kravjega mleka smo ugotovili, da reagirata s človeškim IgE, medtem ko pri nobenem od kazeinov kobiljega mleka nismo zasledili reakcije s človeškim IgE.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 636.1:575(043.3)=163.6
CX horses/mare's milk/proteins/casein/genetics/molecular characterization
CC AGRIS L10/5120
AU CIVIDINI, Angela
AA DOVČ, Peter (supervisor)/NARAT, Mojca (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Animal Production
PY 2016
TI MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PROTEINS IN MARE'S MILK (*Equus caballus*)
DT Doctoral Dissertation
NO XIII, 94 p., 18 tab., 28 fig., 1 ann., 119 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Casein fraction is the major milk protein fraction. Alternative exon splicing generated the variability of caseins. The result of alternative exon splicing and posttranslational modifications (glycosylation and phosphorylation) of mare milk caseins are different isoforms of mRNA of the casein. Consequently, different allele variants of the casein were difficult to interpret on protein profile. In the present study, we investigated the identification possibility of different variants of mare β -casein. We confirmed two polymorphisms in the β -casein intron 1, which were associated with different splicing patterns in all of the samples. The β -casein mRNA showed three different splicing patterns of inclusion of weak exons. We try to separate those β -casein isoforms on protein profiles. We optimized two-dimensional (2-D) electrophoretic method for separation of the casein variants. The equine β -casein was separated in numerous isoelectric variants which were formed due to phosphorylation effect. For confirming the identification of the separated caseins the N-terminal amino acid sequence were done. With immunoenzyme test we compared the allergenicity of the equine and cow caseins. Cow milk α_{S1} -and β -casein were able to cause a positive reaction with IgE oh human sera in all sera tested. In addition, equine milk caseins did not cause any positive reaction with human IgE.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SESTAVA MLEKA	3
2.1.1 Kobilje mleko	4
2.2 BELJAKOVINE MLEKA IN MEDVRSTNA PRIMERJAVA	6
2.2.1 Sirotkini proteini	7
2.2.1.1 β-laktoglobulin	8
2.2.1.2 α-laktalbumin	9
2.2.1.3 Laktoferin in lizocim	10
2.2.1.4 Imunoglobulini	10
2.2.1.5 Serumski albumin	11
2.2.2 Kazeini	11
2.2.2.1 α _{S1} -kazein	14
2.2.2.2 α _{S2} -kazein	15
2.2.2.3 β-kazein	16
2.2.2.4 κ-kazein	18
2.3 KAZEINSKI GENI	19
2.3.1 Primerjava kazeinskih genov	19
2.3.2 Alternativno izrezovanje intronov	22
2.3.3 Alternativno izrezovanje intronov pri kazeinskih genih konja	23
2.4 ANALITSKE METODE KARAKTERIZACIJE PROTEINOV	25
2.4.1 2-D elektroforeza	25
2.5 KARAKTERIZACIJA KAZEINOV KOBILJEGA MLEKA	28
2.5.1 Karakterizacija fosforilacijskih oblik β -kazeina kobiljega mleka	29
2.5.2 Karakterizacija deamidirane oblike β-kazeina	30
2.6 ALERGIJA NA PROTEINE KRAVJEGA MLEKA	32
2.6.1 Alergeni kravjega mleka	34
2.6.2 Kobilje mleko kot alternativa kravjemu mleku	36
3 MATERIAL IN METODE	39
3.1 VZORCI MLEKA	39
3.2 IZOLACIJA GENOMSKE DNA	39
3.3 DOLOČANJE POLIMORFIZMOV V ZAPOREDJU NUKLEOTIDOV KAZEINSKIH GENOV PRI KONJU	39
3.4 ELEKTROFOREZA NA AGAROZNEM GELU	40
3.5 DOLOČANJE ZAPOREDJA NUKLEOTIDOV	41
3.6 ČIŠČENJE PRODUKTOV SEKVENČNE REAKCIJE	41
3.7 IZOLACIJA RNA IZ MLEKA	41

3.8	SINTEZA cDNA	42
3.9	DOLOČANJE VZORCEV VKLJUČEVANJA ŠIBKIH EKSONOV β -KAZEINA	42
3.10	MERJENJE KOLIČINE FRAGMENTOV Z BIOANALIZATORJEM	42
3.11	IZOLACIJA KAZEINOV IZ MLEKA	43
3.11.1	Merjenje koncentracije kazeinov	44
3.12	2-D ELEKTROFOREZA	45
3.12.1	Izoelektrično fokusiranje (IEF) - 1.dimenzija	45
3.12.2	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS-PAGE)- 2. dimenzija	46
3.12.3	Analiza slik	48
3.12.4	Identifikacija proteinov	49
3.13	IMUNOENCIMSKI TESTI	49
3.13.1	DIBA in Western analiza	50
4	REZULTATI	52
4.1	POLIMORFIZMI V INTRONU 1 β -KAZEINSKEGA GENA	52
4.2	ALTERNATIVNO VKLJUČEVANJE EKSONOV V ZRELO mRNA β -KAZEINA	54
4.3	OPTIMIZACIJA 2-D ELEKTROFOREZE LOČEVANJA KAZEINSKIH FRAKCIJ KOBILJEGA MLEKA	60
4.4	2-D PROFIL KAZEINSKE FRAKCIJE KOBILJEGA MLEKA	62
4.5	2-D PROFIL KAZEINSKE FRAKCIJE KRAVJEGA MLEKA	66
4.6	DELEŽ POSAMEZNE OBLIKE mRNA β -KAZEINA V KAZEINSKI FRAKCIJI KOBILJEGA MLEKA	67
4.7	REAKCIJE SPECIFIČNIH PROTITELES IgE S KAZEINI KRAVJEGA IN KOBILJEGA MLEKA	68
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	71
5.1	RAZPRAVA	71
5.1.1	Vzorci vključevanja eksonov v zrelo mRNA β-kazeina kobiljega mleka	71
5.1.2	Standardizacija 2-D metode za ločevanje kazeinov kobiljega mleka	73
5.1.3	Reakcija protiteles IgE s kazeini kravjega in kobiljega mleka	78
5.2	SKLEPI	80
6	POVZETEK (SUMMARY)	81
6.1	POVZETEK	81
6.2	SUMMARY	82
7	VIRI	
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Kemijska sestava kobiljega, kravjega, ovčjega, kozjega in človeškega mleka – srednja vrednost, minimalne in maksimalne vrednosti	4
Preglednica 2: Glavne proteinske frakcije in neproteinski dušik (NPN) v kobiljem, človeškem in kravjem mleku	6
Preglednica 3: Delež sirotkinih proteinov (%) v kobiljem, kravjem in človeškem mleku	8
Preglednica 4: Delež imunoglobulinov (%) v kobiljem, kravjem in človeškem mleku	11
Preglednica 5: Kazeinske frakcije kobiljega, kravjega, ovčjega, kozjega in človeškega mleka	13
Preglednica 6: Primerjava zaporedij aminokislin za α_{S1} -, β - in κ -kazeina	13
Preglednica 7: Molekulske mase (Mr) posameznih fosforilaciskih oblik β -kazeina identificiranih z LC/ESI-MS (angl. <i>liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry</i>)	32
Preglednica 8: Glavni predstavniki alergenov v kravjem mleku ter nekatere značilnosti	35
Preglednica 9: Osnovna raztopina za rehidracijo trakov	45
Preglednica 10: Stopnje izoelektričnega fokusiranja	46
Preglednica 11: SDS pufer za uravnoteženje – osnovni	46
Preglednica 12: 1xSDS elektroforezni pufer	47
Preglednica 13: Raztopina za ločevalni gel (12 %)	48
Preglednica 14: Polimorfna mesta v intronu 1 gena za β -kazein	52
Preglednica 15: Število kobil po posameznih vzorcih vključevanja eksonov v zrelo mRNA β -kazeina	54
Preglednica 16: Povprečni deleži posameznih fragmentov cDNA glede na vzorec vključevanja eksonov 5 in 8 v zrelo mRNA β -kazeina	56
Preglednica 17: Izmerjene absorbance nekaterih vzorcev in ocnjene koncentracije kazeinov	60
Preglednica 18: Delež posameznih oblik β -kazeina (β -CN, β -CN $^{\Delta 5}$) po posameznem vzorcu vključevanja eksonov	67

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1:	Primerjava zaporedij aminokislin za α_{S1} -kazein kobile, krave in človeka 15
Slika 2:	Primerjava zaporedij aminokislin za α_{S2} -kazein kobile (varianta A in B), krave in koze 16
Slika 3:	Primerjava zaporedij aminokislin za β -kazein kobile, krave in človeka 18
Slika 4:	Primerjava zaporedij aminokislin za κ -kazein kobile, krave in človeka 19
Slika 5:	Imobiliziran gradient pH v poliakrilamidnem gelu s karboksilnimi in amino skupinami 26
Slika 6:	Eksonski strukturi β -kazeina 31
Slika 7:	Standardna krivulja koncentracije proteinov 44
Slika 8:	Polimorfizem A(T) v intronu 1 β -kazeinskega gena (haplotip A-T) 52
Slika 9:	Polimorfizem T(C) v intronu 1 β -kazeinskega gena (haplotip T-C) 53
Slika 10:	Polimorfizem A/T(T/C) v intronu 1 β -kazeinskega gena (haplotip A/T-T/C) 53
Slika 11:	Vzorci vključevanja eksonov v zrelo mRNA 54
Slika 12:	Alternativno vključevanje eksona 5 (a) in eksona 8 (b) 55
Slika 13:	Vzorec vključevanja eksonov (1) pri treh kobilah (4, 9, 18) haplotipa A-T 57
Slika 14:	Vzorec vključevanja eksonov (2) pri treh kobilah (6, 12, 17) haplotipa A/T-T/C 58
Slika 15:	Vzorec vključevanja eksonov (3) pri kobili haplotipa T-C 59
Slika 16:	Vzorci vključevanja β -kazeinskih eksonov 5 in 8 z deleži posameznih fragmentov 59
Slika 17:	2-D profil kazeinskih frakcij kobiljega mleka po uporabi trakov IPG z različnim intervalom pH 61
Slika 18:	2-D profil kazeinskih frakcij kobiljega mleka 62
Slika 19:	2-D profil kazeinskih frakcij kobiljega mleka (nanos: 50 µg kazeinov), vzorec vključevanja eksonov 1 64
Slika 20:	2-D profil kazeinskih frakcij kobiljega mleka (nanos: 50 µg kazeinov), vzorec vključevanja eksonov 2 65
Slika 21:	2-D profil kazeinskih frakcij kobiljega mleka (nanos: 50 µg kazeinov), vzorec vključevanja eksonov 3 65
Slika 22:	2-D profil kazeinskih frakcij kravjega mleka 66
Slika 23:	Dedež oblik β -kazeina v kazeinski frakciji (levo) in dedež fragmentov cDNA izmerjen v bioanalizatorju po posameznem vzorcu vključevanja (desno) 68
Slika 24:	Kazeinska frakcija kravjega mleka na PVDF membrani po barvanju s CBB 69
Slika 25:	Reakcija kazeinov kravjega mleka s protitelesi IgE iz seruma (1) otroka z alergijo 69
Slika 26:	Reakcija kazeinov kravjega mleka s protitelesi IgE iz seruma (2) otroka z alergijo 69
Slika 27:	Kazeinska frakcija kobiljega mleka na PVDF membrani po barvanju s CBB 70
Slika 28	Reakcija kazeinov kobiljega mleka s protitelesi IgE iz serumov otrok z alergijo 70

KAZALO PRILOG

Priloga A: Primerjave referenčnega gela z geli posameznih vzorcev vključevanja eksonov v zrelo mRNA β -kazeina

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

APS	Amonijev persulfat (angl. <i>Ammonium persulfate</i>)
bp	Bazni pari
cDNA	DNA, ki je komplementarna mRNA
C/EBP	(<i>CAAT enhancer binding protein</i>)
CBB	Barvilo Coomassie briljantno modro (angl. <i>Coomassie Brilliant blue</i>)
CMA	Alergija na kravje mleko (angl. <i>Cow Milk Allergy</i>)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]- 1-propanesulfonate
Da	Dalton
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
DEPC	Dietilpirokarbonat
DIBA	Dot-immunobinding assay
DTT	1,4-dithiothreitol
ddH ₂ O	Bidestilirana voda
dATP	deoksiadenozintrifosfat
dCTP	deoksicitidintrifosfat
dGTP	deoksigvanozintrifosfat
dTTP	deoksitimidintrifosfat
ddNTP	deoksinukleozidtrifosfat
ESE	Ojačevalno zaporedje v eksonu (angl. <i>splicing enhancer element</i>)
ESS	Utiševalno zaporedje v eksonih (angl. <i>exonic splicing silencer</i>)
ESI-MS	Ionizacija z elektrosprejem
EDTA	etilendiamintetraacetat
ExoI	exonukleaza
GR	Glukokortikuidni receptor (angl. <i>glucocorticoid receptor</i>)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
IEF	Izoelektrično fokusiranje (angl. <i>isoelectric focusing</i>)
IEC	ionsko izmenjevalna kromatografija (angl. <i>ion-exchange chromatography</i>)
ISE	Ojačevalno zaporedje v intronu (<i>intronic splicing enhancer</i>)
ISS	Utiševalno zaporedje v intronu (<i>intronic splicing silencer</i>)
IPG	Imobiliziran pH gradient (angl. <i>immobilized pH gradient</i>)
JAA	jodacetamid
kb	Kilo bazni pari
kDa	Kilo dalton
LC	tekočinska kromatografija (angl. <i>liquid chromatography</i>)
LC-ESI-MS	Tekočinska kromatografija z elektrosprej ionizacijo (angl. <i>liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry</i>)
MS	Masna spektometrija (angl. <i>mass spectrometry</i>)
MALDI-Tof-MS	Ionizacija v nosilcu z lasersko desorpcijo na osnovi hitrosti potovanja ionov (angl. <i>matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flights mass spectrometry</i>)
mRNA	Sporočila RNA (angl. <i>messenger</i>)
MW	Molekulska masa (angl. <i>molecular weight</i>)
ORF	bralni okvir (angl. <i>open reading frame</i>)
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza (angl. <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
pI	Izoelektrična točka (angl. <i>isoelectric point</i>)

PVDF	polivinilidna difluoridna membrana (angl. <i>polyvinylidene fluoride membrane</i>)
PBS	Fosfatni pufer (s fosfati pufrana fiziološka raztopina)
PITC	fenilizotiocianat
PTH-derivati	Feniltiohidantoinski derivati
PCR	Verižna reakcija pomnoževanja s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i>)
RP-HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z reverzno fazo (angl. <i>reversed phase-high-performance liquid chromatography</i>)
RT-PCR	Verižna reakcija s polimerazo z obratnim prepisovanjem (angl. <i>reverse transcription polymersae chain reaction</i>)
SDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil fosfata (angl. <i>sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SDS	Natrijev dodecil sulfat (<i>sodium dodecyl sulphat</i>)
snRNPI	mali jedrni ribonukleoproteini
STAT	Transkripcijski faktorji, ki prenesejo signal in aktivirajo transkripcijo (angl. <i>signal transducers and activators of transcription</i>)
TBE	Tris-borat-EDTA pufer
Tris	Tris (hidroksimetil) aminometan
TRIZol	Reagent za izolacijo RNA (raztopina fenola in gvanidin izotiocianata)
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin
Tween	Polyoxyethylen sorbitan monooleat
TweenPBS (TPBS)	Tween fosfatni pufer
2-D	Dvodimenzionalna elektroforeza (angl. two-dimensional electrophoresis)

Okrajšave za aminokisline

Ala	A	alanin
Cys	C	cistein
Asp	D	asparaginska kislina
Glu	E	glutaminska kislina
Phe	F	fenilalanin
Gly	G	glicin
His	H	histidin
Ile	I	izolevcin
Lys	K	lizin
Leu	L	leucin
Met	M	metionin
Asn	N	asparagin
Pro	P	prolin
Gln	Q	glutamin
Arg	R	arginin
Ser	S	serin
Thr	T	treonin
Val	V	valin
Trp	W	triptofan
Tyr	Y	tirozin

Simboli nukleotidnih zaporedij

A	adenin
C	citozin
G	gvanin
T	timin
U	uracil
N	katerikoli nukleotid

Okrajšave za beljakovine

α -La	α -laktalbumin
β -Lg	β -laktoglobulin
Ig	imunoglobulini
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IgE	imunoglobulin E
Lf	laktoferin
Lyz	lizocim
β -CN	beta kazein
α -CN	alfa kazein
κ -CN	kapa kazein
β -CN ^{Δ5}	beta kazein brez eksona 5
β -CN ^{Δ8}	beta kazein brez eksona 8

1 UVOD

Mleko je osnovna hrana novorojencev vseh vrst sesalcev, zato je pomembna njegova kemijska sestava, ki je značilna za vsako vrsto. Mleko prežvekovalcev je najbolj preučeno, saj od prežvekovalcev pridobivamo največje tržne količine konzumnega mleka (kravje, ovče in kozje mleko). V zadnjem obdobju pridobiva na pomenu tudi mleko drugih vrst sesalcev (kobilje, osličje in kamelje mleko), saj so te vrste mleka po kemijski sestavi bolj podobne človeškemu kot kravjemu mleku. Zaradi njihove večje podobnosti v kemijski sestavi človeškemu mleku, pridobivajo pomembno vlogo v prehrani otrok, kot nadomestno mleko za otroke, ki se iz različnih vzrokov ne morejo prehranjevati z materinim mlekom.

Pomemben vir hranil sesalcev v prvem obdobju po rojstvu predstavljajo beljakovine mleka. Nomenklatura beljakovin mleka je zasnovana na podlagi raziskav kravjega mleka (Eigel in sod., 1984; Farrell in sod., 2004). Beljakovine kravjega mleka kažejo visoko stopnjo polimorfnosti, kar dokumentirajo številne genetske variante glavnih proteinov (laktoproteinov) v kravjem mleku. O kobiljem mleku je, v primerjavi s kravjim, sorazmerno malo podatkov. Kobilje mleko lahko, zaradi svoje nizke alergenosti, dobro nadomesti kravje mleko v prehrani otrok, ki so alergični na beljakovine kravjega mleka. Podobne lastnosti pripisujejo tudi kameljemu mleku. To je glavni vzrok za vse pogostejše raziskave mleka pripadnikov družin *Equidae* in *Cammelidae* (El-Agamy, 2007, 2009). Znanih je nekaj alelnih variant genov za kazeine kobiljega mleka (Girardet in sod., 2006; Miclo in sod., 2007; Lenasi in sod., 2003; Miranda in sod., 2004; Lenasi in sod., 2006), sorazmerno malo pa je znanega o uravnavanju izražanja teh genov (Lenasi in sod., 2006; Hobor in sod. 2008). Za laktoproteine kobiljega mleka, predvsem za kazeine, je značilna njihova visoka stopnja fosforilacije, ki v kombinaciji z različnimi alelnimi variantami otežuje njihovo identifikacijo. Pri procesiranju mRNA posameznega kazeina ima pomembno vlogo alternativno vključevanje eksonov. Posledica različnih vzorcev alternativnega vključevanja eksonov, značilnega za kazeine, je večja genetska pestrost, na proteinski ravni. Namen naše naloge je bil preučiti povezavo med oblikami kazeinov, ki temeljijo na alternativnem izrezovanju intronov in kazeinskim profilom na proteinski ravni. Za ločevanje proteinov smo uporabili 2-D elektroforezo, saj metoda omogoča ločevanje različnih izoformnih oblik proteinov ali pa oblik proteinov, ki so nastale zaradi post-translacijskih modifikacij. Postopek metode opisujejo različni raziskovalci (O'Farrell, 1975; Görg in sod., 2007), vendar standardizacije metode še ni opisane. Za vsak vzorec proteinov je potrebna optimizacija metode, le tako lahko pridobimo čim boljšo ponovljivost 2-D proteinskega profila.

Kravje in kobilje mleko se razlikujeta tudi v sestavi proteinov. 2-D elektroforeza omogoča ločevanje kompleksnih vzorcev proteinov. Tako že na prvi pogled ločimo sliko kazeinov kravjega mleka od proteinske slike kazeinov kobiljega mleka. Posamezne lise, ki predstavljajo posamezen protein, se na slikah proteinov med vrstama razlikujejo v poziciji. Razlike nastanejo zaradi različne izoelektrične točke in molekulske mase posameznega proteina. Posamezne lise, ki predstavljajo različne proteine, smo identificirali z Edmanovo degradacijo, ter tako določili zaporedje aminokislin na N-koncu proteina in tako identificirali posamezne kazeine (Restani in sod., 2009).

Kobiljemu mleku posvečajo veliko pozornosti tudi zaradi njegove nizke alergenosti, saj naj bi bilo kobilje mleko manj alergeno kot kravje mleko in mleko drugih prežekovalcev. Znano je namreč, da nekateri proteini kravjega mleka močno reagirajo s človeškimi IgE. V mleku naj bi bilo vsaj 30 proteinov z antigenskim delovanjem. Nekateri proteini mleka lahko sprožijo nastanek IgE, IgA, IgM in IgG protiteles, ki povzročijo kompleksne in spremenljive imunske odzive. Med važnejše alergene spadajo kazeini in β -laktoglobulin, omenjene pa so bile tudi alergije na manj pomembne proteine, kot so imunoglobulini in albumin (Restani in sod., 2009).

V drugem delu naloge smo želeli s primerjavo beljakovin kravjega in kobiljega mleka identificirati alergene proteine v mleku prežekovalcev. V ta namen smo zbrali serume otrok, občutljivih na proteine kravjega mleka in jih uporabili za identifikacijo potencialnih alergenov v kravjem in kobiljem mleku.

1.1 HIPOTEZE

- Alternativno vključevanje eksonov je posledica polimorfizmov v regulatornih regijah genov za kazeine kobiljega mleka in povečuje proteinsko pestrost v kobiljem mleku.
- Z 2D elektroforezo lahko ločimo in identificiramo variante kazeinov in jih vzročno povežemo z DNA variantami, ki vplivajo na alternativno vključevanje eksonov.
- Kazeini kobiljega mleka se značilno razlikujejo od kazeinov kravjega mleka na mestih, ki predstavljajo potencialne alergene.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SESTAVA MLEKA

Evolucijski razvoj sesalcev v različnih okoljih je povzročil nastanek njihove biološke raznolikosti. Izoblikovale so se za vrsto specifične potrebe po hranilnih snoveh. Glede na različne prehranske potrebe, se je izoblikovala tudi za vrsto specifična sestava mleka. Materino mleko je za novorojenega mladiča njegova edina hrana, ki ga preskrbuje s potrebnimi hranilnimi snovmi. Vsebnosti posameznih sestavin v mleku so sledile fiziološkim potrebam mladičev pri posamezni vrsti. K medvrstnim razlikam v sestavi mleka je prispevala tudi selekcija (O'Mahony in Fox, 2014).

Mleko je zelo kompleksna tekočina, sestavljena iz več sto vrst molekul. Glavne sestavine mleka so voda (>80 %), beljakovine, maščoba in laktoza, v manjših količinah pa še minerali in vitamini. Količina beljakovin in laktoze je genetsko pogojena in je ves čas laktacije bolj ali manj konstantna. Količina maščobe v mleku je bolj odvisna od materine prehrane, zato je bolj variabilna sestavina mleka, ki se spreminja tekom laktacije. Vsebnosti posameznih sestavin mleka se med vrstami razlikujejo. Razlikuje se tudi razmerje posameznih sestavin mleka. Vsebnost maščobe v mleku se giblje od 2 % pa do 55 %, vsebnost beljakovin od 1 % do 20 % ter vsebnost laktoze od 0 % do 10 %. Prav tako so razlike v sestavi mleka znotraj posamezne vrste. Na sestavo mleka vplivajo tudi pasma, stadij laktacije, prehrana in zdravstveno stanje živali. Precejšnje spremembe v sestavi mleka se zgodijo v prvih dneh po porodu, še posebej v količini imunoglobulinov (O'Mahony in Fox, 2014).

Glavni ogljikov hidrat v mleku večine vrst je disaharid laktoza, ki je sestavljen iz galaktoze in glukoze. Vsebnost laktoze je v kobiljem mleku večja v primerjavi z vsebnostjo le te v mleku prežvekovcev (Preglednica 1). Glede na vsebnost laktoze v mleku sta si bolj podobna kobilje in človeško mleko (Potočnik in sod., 2011).

Maščoba se v mleku nahaja v obliki maščobnih kroglic, obdanih z membrano. Maščobne kroglice so v mleku različnih vrst živali različno velike. Njihov premer sega od 0,1 do 20 µm (Bajt in Golc-Teger, 2002). Premer maščobne kroglice kobiljega mleka je od 2 do 3 µm (Malacarne in sod., 2002; Kharitonova, 1970, cit. po Park in sod., 2006). Maščobne kroglice kravjega mleka so večje, njihov premer je od 3 do 5 µm. Povprečna velikost maščobnih kroglic v človeškem mleku pa je 4 µm (Malacarne in sod., 2002; Welsch in sod., 1988, cit. po Park in sod., 2006). Ugotovili so medvrstno variabilnost v sestavi membrane maščobnih kroglic. Glavne komponente membrane so fosfolipidi in proteini. Lipidno jedro obdaja notranji proteinski plič, sledi lipidna membrana in nato zunanj, izrazito filamentozni glikokaliks. V membrani maščobnih kroglic kobiljega mleka so pokazali prisotnost visokomolekularnih glikoproteinov (butirofilin, laktaderin). Na površini teh glikoproteinov je razvijana ogljiko hidratna struktura (Solaroli in sod., 1993, cit. po Malacarne in sod., 2002). Takšna struktura zunanjega glikoproteinskega sloja maščobne kroglice je značilna tudi za maščobne kroglice človeškega mleka, vendar ne kravjega. Ugotovili so, da struktura zunanjega sloja maščobne kroglice vpliva na prebavo maščobnih kroglic, ki je v primeru človeškega in kobiljega mleka boljša (Jensen in sod., 1992, cit. po Malacarne in sod., 2002). Vsebnost maščobe je v kobiljem mleku manjša v primerjavi z vsebnostjo le te v mleku prežvekovcev in človeškem mleku (Preglednica 1).

Mleko vsebuje velike količine beljakovin, ki vsebujejo esencialne aminokisline. V osnovi razlikujemo dve vrsti mlečnih beljakovin; kazeine in sirotkine beljakovine. Kazeini in sirotkine beljakovine se močno razlikujejo po svojih lastnostih ter njihovi vsebnosti v mleku različnih vrst živali. Glede na količino posameznih beljakovin v mleku razlikujemo kazeinsko in albuminsko mleko (Bajt in Golc-Teger, 2002). Kobilje mleko je albuminsko mleko. Delež sirotkinih proteinov je v kobiljem mleku okoli 39 %, v kravjem pa le okoli 18 %. Skupna vsebnost surovih beljakovin je v kobiljem mleku večja kot v človeškem vendar manjša kot v mleku prežvekovalcev (Preglednica 1).

Kemijska sestava mleka nekaterih vrst sesalcev je prikazana v preglednici 1.

Preglednica 1: Kemijska sestava kobiljega, kravjega, ovčjega, kozjega in človeškega mleka – srednjia vrednost, minimalne in maksimalne vrednosti (Malacarne in sod., 2002; Park in sod., 2006; Trancoso in sod., 2010 cit. po Potočnik in sod., 2011; Simos in sod., 1996 cit. po Potočnik in sod., 2011)

Table 1: Chemical composition of equine, cow, ovine, goat and human milk – mean value, min and max values (Malacarne et al., 2002; Park et al., 2006; Trancoso et al., 2010, cited in Potočnik et al., 2011; Simos et al., 1996, cited in Potočnik et al., 2011)

Sestavina	Kobilje mleko	Kravje mleko	Ovče mleko	Kozje mleko	Človeško mleko
Maščoba (g/kg)	12,1 (5-20)	36,1 (33-54)	75 (50-90)	51,4 (44-56)	36,4 (35-40)
Surove beljak. (g/kg)	21,4 (15-28)	32,5 (31-39)	54,5 (45-70)	37,5 (33-41)	14,2 (9-17)
Laktoza (g/kg)	63,7 (58-70)	48,8 (44-49)	49 (41-59)	47 (42-50)	67,0 (63-70)
Surovi pepel (g/kg)	4,2 (3-5)	7,6 (7-8)	8,5 (8-9)	8,14 (7,7-8,4)	2,2 (2-3)

*Pod srednjimi vrednostmi so v oklepajih zapisane še min in max vrednosti

Glede na vsebnosti hraničnih snovi v mleku različnih vrst sesalcev sta si najbolj podobna kobilje in človeško mleko, ki v primerjavi z drugimi vrstami sesalcev vsebujeta največ laktoze in najmanj maščobe. Kobilje in človeško mleko vsebujeta tudi manj beljakovin kot mleko prežvekovalcev (krave, ovce, koze) (Potočnik in sod., 2011).

2.1.1 Kobilje mleko

Kobilje mleko se kot hrana prvič omenja v 8. stol. pred našim štetjem v Homerjevi Ilijadi (Hanser, 1988, cit. po Brezovečki in sod., 2014). Prvi zapisi o molži kobil in predelavi mleka v fermentirane izdelke, kot je kumis, segajo v obdobje pred dva in pol tisoč leti na območju Azije, v Mongoliji (Ivanković, 2004 cit. po Brezovečki in sod., 2014). Prva dokumentirana uporaba kobiljega mleka v terapevtske namene je bila leta 1858 v Samari. Do leta 1962 je bilo na bivšem ozemlju Sovjetske Zveze okoli 50 tako imenovanih "kumisnih bolnišnic" (Hanser, 1988 cit. po Brezovečki in sod., 2014). Čeprav je reja konj razširjena po vsem svetu, je prireja kobiljega mleka v glavnem razširjena le na območju Rusije in v Mongoliji. Širi se tudi v nekaterih državah Evrope, kot so Belorusija, Ukrajina, Madžarska, Avstrija in Nemčija ter tudi v ZDA. Ocenjujejo, da naj bi več kot 30 milijonov ljudi po vsem svetu redno uživalo kobilje mleko (Doreau in Martin-Rosset, 2002).

Cisterna kobiljega vimena je majhna, zato se v njej lahko nabere le malo mleka. Mlečna žleza kobile (leva in desna polovica) ima štiri mlečne cisterne, v katere se sprošča mleko iz mlečnih alveol. Večji del namolzenega mleka je tako alveolarnega. Molža kobile je odvisna od količine sproščenega oksitocina, ki ga lahko uravnavamo s prisotnostjo žrebeta v času molže. Caroprese in sod. (2007) so primerjali količino namolzenega mleka ter sestavo mleka med skupinama ročno molženih ter strojno molženih kobil. Ugotovili so, da s strojno molžo, v primerjavi z ročno molžo, namolzejo več mleka, ki vsebuje več maščobe (Caroprese in sod., 2007).

Tako kot pri vseh drugih vrstah domačih živali, ki jih uporabljam za prirejo mleka, je ta odvisna od genetskih in okoljskih dejavnikov. Najpomembnejši genetski dejavnik je pasma, ki vpliva na količino mleka in lastnosti molznosti kobil. Večji vpliv imajo okoljski dejavniki, kot so prehrana, tehnologija reje, dolžina laktacije, način in pogostnost molže. Laktacija pri kobili traja nekaj manj kot enajst mesecev (do naravne presušitve). Na dolžino laktacije vpliva število molž na dan, večje je število molž, daljša je laktacija (ponekod molzejo tudi vsake tri ure ponoči in podnevi). Največkrat se uporablja tehnologija, kjer kobile presušijo nekaj tednov pred žrebitvijo (Caroprese in sod., 2007). Količina dnevno prirejenega mleka pri kobili z dnevom laktacije pada, spreminja pa se tudi razmerje med sirotkinimi proteini in kazeini (Zicker in Lonnerdal, 1994; Gibbs in sod., 2010). Gibbs in sod. (2010) so spremljali dnevne količine mleka 10., 30., 45., 60., 90., 120., in 150. dan laktacije. Največjo dnevno količino mleka so izmerili 30. dan laktacije (11,8 kg). Nato se je dnevna količina namolzenega mleka z dnevom laktacije zmanjševala in je 150. dan laktacije znašala 10,1 kg. Največjo vsebnost proteinov v mleku so izmerili 10. dan laktacije (2,7 %), nato se je vsebnost proteinov zmanjševala in 150. dan dosegla 1,8 %. Na vsebnost proteinov v mleku prehrana kobile ni značilno vplivala, ugotovili pa so statistično značilne razlike med zaporednimi laktacijami. Kobile v prvi in drugi zaporedni laktaciji so priredile mleko s povprečno 2,2 % proteinov, kobile v tretji in višji zaporedni laktaciji pa 2,1 %. V 150 dnevnom obdobju laktacije je bila povprečna vsebnost maščobe v mleku 1,3 %. Največjo vsebnost maščobe v mleku so izmerili 45. dan laktacije (1,6 %), nato se je vsebnost maščobe v mleku zmanjševala in 150. dan laktacije znašala le še 1,0 % (Gibbs in sod., 2010).

Kobilje mleko je lahko prebavljivo, bogato z esencialnimi hranilnimi snovmi, razmerje med sirotkinimi proteini in kazeini pa je podobno kot v človeškem mleku. Zato je kobilje mleko tudi zelo primerno za prehrano otrok (Uniacke-Lowe in sod., 2010). Ker kobilje mleko vsebuje velik delež sirotkinih proteinov, ga imenujemo albuminsko mleko. V primerjavi s kravjim mlekom kobilje mleko vsebuje več sirotkinih proteinov. Približno razmerje kazeini in sirotkinimi proteini je v kobiljem mleku 50:50, v človeškem 40:60, v kravjem mleku pa 80:20 (Fox in sod., 2015). Mleko prežvekovcev vsebuje od 70 % do 77 % kazeinov (77,23 %-krave; 77,5 %-ovce; 70,6-koze %) in od 17 % do 21 % (17,54 %-krave; 20 %-ovce; 21,7 %-koze) sirotkinih proteinov (Brezovečki in sod., 2014). V preglednici 2 prikazujemo vsebnosti glavnih proteinskih frakcij kobiljega, kravjega in človeškega mleka.

Preglednica 2: Glavne proteinske frakcije in neproteinski dušik (NPN) v kobiljem, človeškem in kravjem mleku (Park in sod., 2006; Malacarne in sod., 2002)

Table 2: Main nitrogen fractions of mare milk and non protein nitrogen (NPN) in mare, human and cow milk (Park et al., 2006; Malacarne et al., 2002)

	Kobilje mleko	Človeško mleko	Kravje mleko
Surove beljakovine (g/kg)	21,4 (15-28)	14,2 (9-17)	32,5 (31-38)
Sirotkine beljakovine (g/kg)	8,3 (7,4-9,1)	7,6 (6,8-8,3)	5,7 (5,5-7,0)
Kazeini (g/kg)	10,7 (9,4-12,0)	3,7 (3,2-4,2)	25,1 (24,6-28,0)
NPN x 6,38 (g/kg)	2,4 (1,7-3,5)	2,9 (2,6-3,2)	1,7 (1,0-1,9)
V % od skupnih beljakovin:			
Sirotkine beljakovine (%)	38,79	53,52	17,54
Kazeini (%)	50,00	26,06	77,23
NPN x 6,38 (%)	11,21	20,42	5,23

*Pod srednjimi vrednostmi so v oklepajih zapisane še min in max vrednosti, ki smo jih našli v literaturi

Zaradi visokega deleža sirotkinih proteinov, je kobilje mleko bogat izvor esencialnih aminokislin, kar je dobrodošlo s prehranskega vidika (Malacarne in sod., 2002). Sirotkini proteini vsebujejo visok delež aminokislin, ki vsebujejo žveplo (Met, Cys). Vsebujejo tudi visoke koncentracije Leu, Ile, Lys in Thr ter majhne vsebnosti aromatičnih aminokislin, kot sta Phe in Tyr. Nasprotno pa kazeini vsebujejo majhne vsebnosti Leu, Ile, Lys, Thr in Cys ter velike vsebnosti Phe in Tyr. Zaradi večje vsebnost esencialnih aminokislin se sirotkini proteini uporabljajo v industriji za pripravo mlečnih nadomestkov v prehrani otrok. Mazhitova in sod. (2015) so ugotovili, da se je vsebnost amino kislin po porodu v kobiljem kolostrumu in prvih 45 dni v mleku zmanjševala. Vsebnost večine esencialnih amino kislin (Thr, Val, Cys, Tyr, Lys) se je zmanjšala, medtem ko se je vsebnost Glu in Pro povečala. Največjo biološko vrednost beljakovin so ugotovili takoj po porodu, zaradi velikih vsebnosti Thr in Lys. Kljub zmanjševanju teh aminokislin tekom laktacije je vsebnost esencialnih aminokislin in biološka vrednost beljakovin iz kobiljega mleka večja v primerjavi s kravjim mlekom (Mazhitova in sod., 2015).

2.2 BELJAKOVINE MLEKA IN MEDVRSTNA PRIMERJAVA

Beljakovine so biološki polimeri aminokislin in imajo veliko različnih struktur in funkcij. Strukturo proteinov določa zaporedje aminokislin, ki je zapisano v genih, ki kodirajo proteine. Informacija o aminokislinskem zaporedju je shranjena v zaporedju nukleotidov v genu. Značilna sestava in zaporedje aminokislin določata tridimenzionalno strukturo proteina, ki jo potrebuje za svojo biokemijsko funkcijo (nativna konformacija proteina). Proteini se kot skupina biomolekul odlikujejo z veliko funkcionalno raznovrstnostjo. Poleg strukturnih proteinov med proteine prištevamo tudi protitelesa (imunoglobuline), encime ter peptidne hormone (Boyer, 2005).

Najpomembnejša vloga proteinov mleka je njihova prehranska funkcija in imunska zaščita novorojenih mladičev v njihovem zgodnjem razvojnem obdobju. Nekateri proteini mleka pomagajo pri absorbciiji vitaminov in mineralov, kalcijev fosfat v kazeinski miceli pa je edini vir kalcija in fosforja za novorojenca (O'Mahony in Fox, 2014).

Proteine mleka (laktoproteine) delimo na dve osnovni skupini; kazeine in sirotkine proteine. Pri večini vrst sesalcev največji delež proteinov v mleku predstavlja kazeini. Sirotkini proteini kažejo večjo stopnjo medvrsstne homologije, medtem ko so kazeini med vrstami precej bolj variabilni. Veliko medvrstno variabilnost pripisujejo α - in β -kazeinu (O'Mahony in Fox, 2014). Za β -kazein človeškega in kobiljega mleka je znanih več fosforilacijskih oblik. Predvidevali so, da je κ -kazein, kot eden izmed glavnih kazeinov, odgovornih za usirjanje, prisoten v mleku vseh vrst. Vsebnost κ -kazeinov je v mleku kobile zelo majhna (Iammetti in sod., 2001; Egito in sod., 2002). κ -kazein človeškega mleka je močno glikoziliran (vsebuje 40-60 % ogljikovih hidratov), medtem ko κ -kazein kravjega mleka vsebuje le 10 % ogljikovih hidratov. Med α -kazeinskimi frakcijami v osličjem in kobiljem mleku so našli veliko heterogenost. Kazeini mleka vseh vrst imajo skupno lastnost, da se nahajajo v mleku v obliki micel (O'Mahony in Fox, 2014).

Kazeini in sirotkini proteini se razlikujejo v nekaterih ključnih lastnostih. Sirotkini proteini so topni pri pH 4,6, medtem ko kazeini niso, kar izkoriščamo pri metodah izolacije (ločevanja) kazeinov od sirotkinih proteinov. Kazeini tvorijo koagulum, medtem, ko sirotkini proteini nimajo te lastnosti. Kazeini so temperaturno stabilni. S segrevanjem mleka s pH 6,7 na 100°C za 24 ur kazeini ostanejo stabilni. Globularni proteini koagulirajo že pri segrevanju na 90 °C za 10 min. Kazeini vsebujejo velik delež aminokisline prolina (17 % v β -kazeinu). Kazeini so fosforilirani, te lastnosti pri sirotkinih proteinih ni zaslediti. Fosfat je vezan na polipeptidno verigo kazeina kot fosfomonoestrska enota serina. Glavne posledice fosforilacije kazeinov so, da fosforilacija daje molekuli kazeina njen značilen naboj, s katerim so povezane lastnosti proteina in njegova temperaturna stabilnost ter možnost vezave kalcija, kar kazeinom daje njihovo značilno biološko funkcijo (prenos kalcijevega fosfata v topni obliku). Kazeini vsebujejo malo metionina in cisteina (aminokislini, ki vsebujejo žvepla) ter s tem malo žvepla. Največ žvepla vsebuje aminokislina cistein, le te pa je več v sirotkinih proteinih, ki so zato bogatejši z žveplom. Sirotkini proteini se v mleku nahajajo kot majhne monomerne molekule, medtem, ko se kazeini nahajajo v mleku v obliki velikih agregatnih molekul, imenovanih micele (O'Mahony in Fox, 2014).

2.2.1 Sirotkini proteini

Sirotkini proteini so proteini mleka, ki so topni pri pH 4,6 in temperaturi 20 °C. Glavni sirotkini proteini v mleku so α -laktalbumin (α -La), β -laktoglobulin (β -Lg), serumski albumini, imunoglobulini (Ig), lakoferin (Lf) in lizocim (Lyz). α -La ima specifično fiziološko funkcijo v mlečni žlezi, kjer uravnava sintezo laktoze. Serumski albumini mleka so identični albuminom krvnega seruma. Imunoglobulinov je v mleku okoli 1 % od skupnih proteinov in okoli 6 % od skupnih sirotkinih proteinov. Lakoferin ima funkcijo vezave železa in ima skupaj z lizocimom pomembno vlogo pri preprečevanju okužb mlečne žleze v času laktacije (Uniacke-Lowe in sod., 2010).

Vsi ti proteini so v mleku različnih vrst sesalcev prisotni v različnem razmerju (Uniacke-Lowe in sod., 2010). Dokazi o morebitni prisotnosti β -Lg v človeškem mleku niso popolni, potrdili so le delno homolognost s kravjim in tudi kobiljim β -Lg in protein razvrstili v isto družino, v družino lipokalinov, za katere je značilno, da vežejo retinol (Brignon in sod., 1985; Huhtala in sod., 1987; Koistinen in sod., 1999). V primerjavi s kravjim mlekom,

kobilje mleko vsebuje več α -La in Ig in manj β -Lg. Glavna protimikrobnna komponenta kobiljega mleka je lizocim ter v manjši meri laktoferin (Uniacke-Lowe in sod., 2010).

Za primerjavo sestave proteinov sirotke med vrstami v preglednici 3 prikazujemo delež posameznih sirotkinih proteinov v kobiljem, kravjem in človeškem mleku.

Preglednica 3: Delež sirotkinih proteinov (%) v kobiljem, kravjem in človeškem mleku (Park in sod., 2006)

Table 3: Whey proteins (%) in equine, cow's and human milk (Park et al., 2006)

Proteini	Kobilje mleko	Kravje mleko	človeško mleko
Sirotkini proteini-skupaj (g/kg)	8,3	5,7	7,6
α -Laktalbumin (%)	28,55 (27,5-29,7)	20,10 (18,4-20,1)	42,37 (30,3-45,4)
β -Laktoglobulin (%)	30,75 (25,3-36,3)	53,59 (52,9-53,6)	-
Serumski albumin (%)	4,45 (4,4-4,5)	6,2 (5,5-6,7)	7,56 (4,5-9,1)
Imunoglobulini (%)	19,77 (18,7-20,9)	11,73 (10,1-11,7)	18,15 (15,1-19,7)
Laktoferin (%)	9,89	8,38	30,26
Lizocim (%)	6,59	v sledovih	1,66

*Pod srednjimi vrednostmi so v oklepajih zapisane še min in max vrednosti, ki smo jih našli v literaturi

2.2.1.1 β -laktoglobulin

β -Lg je glavni protein v skupini sirotkinih proteinov v mleku prežvekovalcev, prisoten pa je tudi v mleku monogastričnih živali. V človeškem mleku in v mleku miši, podgane, morskega prašička, kamele, lame in alpake ni prisoten (Hochwallner in sod., 2014; O'Mahony in Fox, 2014). Pri β -Lg kravjega mleka sta razširjeni predvsem dve izmed več variant β -Lg, genetska varianta A (BLGA) in B (BLGB). Obe vsebujejo 162 aminokislin in se razlikujeta le na mestu 63 (Asp v varianti A in Gly v varianti B) in 117 (Val v varianti A in Ala v varianti B). Obe varianti β -Lg kravjega mleka se razlikujeta v molekulski masi in izoelektrični točki (Hochwallner in sod., 2014). Varianta BLGA je v populaciji goveda najbolj zastopana, sledi ji varianta BLGB in nato varianta BLGC. β -Lg kravjega mleka je majhen protein velikosti 18,3 kDa, vsebuje 162 amino kislin v naravnvi dimerični obliki. Identificirali so nove variante β -Lg kravjega mleka, ki so poimenovane kot variante H, I, J in W (Farrell in sod., 2004). Ima značilno sekundarno strukturo, ki tvori α -vijačnice in β -list, kar določa njegovo nadaljnje zvitje. Pripisujejo mu različne biološke vloge, kot je vloga promotorja encimske aktivnosti in vloga pri izkoristljivosti vitaminov. β -Lg večine vrst veže retinol (vitamin A), ki je nujno potreben za rast in razvoj. Ker pa spada v skupino lipokalinov, predvidevajo, da veže hidrofobne ligande, kot sta holesterol in vitamin D ter nekatere proste maščobne kisline. Ker je β -Lg kravjega mleka hidrofoben, je zanj značilno, da v svoje hidrofobne zanke veže proste maščobne kisline. Mlečna maščoba se v procesu presnove razgradi preko lipaz na proste maščobne kisline, ki se vežejo na β -Lg, kjer so izpostavljeni nadaljnji presnovnim procesom. Tukaj ima β -Lg najpomembnejšo biološko vlogo (Uniacke-Lowe in sod., 2010). Tako kot pri drugih laktoproteinih poteka sinteza β -Lg v epitelnih celicah mlečne žleze pod kontrolo prolaktina. β -Lg kravjega mleka je odporen proti razgradnji s proteolitičnimi encimi, kar lahko povzroča alergijske reakcije ob konzumiranju kravjega mleka. Odpornost proti razgradnji oz. prebavi je različna med

vrstami, tako so ugotovili, da je β -Lg ovčega mleka lažje prebavljiv kot β -Lg kravjega mleka (El Zahar in sod., 2005, cit. po Uniacke-Lowe in sod., 2010).

Iz kobiljega mleka so izolirali dve različni varianti β -Lg (β -Lg I in β -Lg II), ki vsebujeta 162 oz. 163 aminokislin. Dodatna aminokislina pri β -Lg II je Gly, ki se nahaja na mestu 116. Zaradi različnega števila aminokislin se proteinski varianti β -Lg med sabo razlikujeta v molekulski masi in izoelektrični točki. β -Lg kobiljega mleka je bolj hidrofilen kot β -Lg kravjega mleka (Uniacke-Lowe in sod., 2010).

2.2.1.2 α -laktalbumin

Za α -La je značilna njegova posebna fiziološka funkcija v mlečni žlezi. V epitelijskih celicah mlečne žleze sodeluje v procesu sinteze lakoze. α -La uravnava delovanje encima β -1,4-galaktoziltransferaze pri tvorbi lakoze iz glukoze in UDP-galaktoze. Sinteza α -La poteka v endoplazmatskem retikulumu od koder se trasportira do Golgijskega aparata, kjer ima regulatorno vlogo pri sintezi lakoze (Brew, 2003). Vsebnost α -La v kravjem mleku je 3,5 % od skupnih proteinov mleka in okoli 20 % od skupnih sirotkinih proteinov (Fox in sod., 2015). Nativni α -La kravjega mleka vsebuje 123 aminokislin (Brew, 2003; Fox in sod., 2015). Zanih je več variant α -La kravjega mleka. Varianta A vsebuje Gln na mestu 10, varianta B pa Arg. Varianta B prevladuje v populaciji goveda *Bos taurus*, medtem ko sta obe varianti prisotni v populaciji goveda *Bos indicus*. Obe varianti vsebujeta po štiri disulfidne vezi. Izračunana molekulska masa variante B je 14.178 Da. Poročajo tudi o varianti C v kravjem mleku (Bell in sod., 1981). Značilno za α -La je, da vsebuje veliko esencialnih aminokislin (Trp, Phe, Tyr, Leu, Ile, Thr, Met, Cys, Lys in Val). Vsebnost esencialnih aminokislin v α -La je 63 % od skupne vsebnosti vseh aminokislin, ki jih vsebuje protein. Aminokislinska sestava α -La kravjega mleka je 72 % identična z aminokislinsko sestavo α -La človeškega mleka. Veliko podobnost so ugotovili tudi med α -La kravjega mleka in lizocimom kravjega mleka (62,6 % podobnost in 35,8 % identičnost v aminokislinski sestavi). α -La je kalcijev metaloprotein (angl. *metalloprotein*), kjer Ca^{2+} igra pomembno vlogo pri tvorbi strukture proteina (Brew, 2003). Metaloprotein vsebuje en Ca^{2+} na mol, v žepkih s širimi Asp ostanki. Značilna za kalcijev metaloprotein je visoka toplotna stabilnost. Pri nizkih temperaturah in zmanjšanju pH pod 5 se Asp ostanki pod vplivom proteinaze razgradijo in nimajo več sposobnosti vezave Ca^{2+} . Nastali protein brez Ca^{2+} pri nizkih temperaturah denaturira (O'Mahony in Fox, 2014).

α -La kobiljega mleka je sestavljen iz 123 aminokislin, kar je podobno kot α -La v kravjem, kozjem, ovčjem in človeškem mleku. Med seboj se razlikujejo samo v nekaj aminokislina, lastnosti pa so podobne. Molekula masa α -La se giblje od 14.078 Da v človeškem mleku do 14.249 Da v kobiljem mleku. Izoelektrična točka se giblje od 4,70 v človeškem mleku do 5,11 v kobiljem mleku (Uniacke-Lowe in sod., 2010). V kobiljem mleku se α -La nahaja v treh različnih genetskih variantah; A, B in C, ki se med sabo razlikujejo za samo nekaj aminokislin (Brew, 2003). α -La kravjega in človeškega mleka iz osmih prostih aminokislin Cys tvorita štiri disulfidne vezi na določenih mestih (Cys₆-Cys₁₂₀, Cys₂₈-Cys₁₁₁, Cys₆₁-Cys₇₇, Cys₇₃-Cys₉₃). Ker je α -La kobiljega mleka podoben človeškemu in kravjemu predvidevajo, da tudi α -La kobiljega mleka tvori štiri disulfidne vezi (Uniacke-Lowe in sod., 2010).

2.2.1.3 Laktoferin in lizocim

Laktoferin in lizocim imata glavno vlogo pri obrambi proti okužbam in pri zaščiti mlečne žleze. Laktoferin (Lf) je glikoprotein z vezanim železom. Lf v kravjem mleku ima molekulsko maso 67110 Da. Tvorí ga 689 aminokislin. Vsebuje 17 disulfidnih vezi. Strukturno je zelo podoben transferinu (protein s funkcijo prenosa železa v plazmi), vendar ima veliko večjo afiniteto za železo. Bogat z Lf je predvsem kolostrum. Pomembna biološka funkcija laktoferina je zaviranje bakterijske rasti, poleg tega inhibira tudi virusne okužbe in stimulira razvoj rasti ugodne mikrobiote v prebavnem traktu. V mleku različnih vrst sesalcev ima različno stopnjo glikozilacije, od katere je odvisna njegova molekulská masa (Farrell in sod., 2004). Lokacija in število potencialnih glikoziliranih mest in tistih, ki so dejansko glikozilirana, je različno med Lf kravjega, človeškega in kobiljega mleka. Pri Lf kravjega mleka so glikozilirana štiri od skupno petih potencialnih mest. Pri Lf človeškega mleka sta glikozilirani dve od treh potencialnih glikozilacijskih mest (Uniacke-Lowe in sod., 2010).

Vsebnost Lf je največja v človeškem mleku, sledi mu kobilje mleko in nato kravje (Preglednica 3). Biološka funkcija kobiljega Lf ni toliko raziskana, predvidevajo pa podobno vlogo, kot jo ima Lf kravjega in človeškega (Uniacke-Lowe in sod., 2010). Lf kobiljega mleka vsebuje 689 aminokislin, podobno kot Lf kravjega mleka, in dve več kot Lf človeškega mleka. V primerjavi z drugimi laktoproteini ima Lf visoko izoelektrično točko, ki je 8,32; 8,67; in 8,47 za Lf kobiljega, kravjega in človeškega mleka. Rezultat je pozitivno nabit protein v pH območju mleka (Uniacke-Lowe in sod., 2010).

Vsebnost lizocima (Lyz) je najmanjša v kravjem mleku, sledi človeško mleko, največja pa je v kobiljem mleku. Razumljivo je, da se vsebnost Lyz v človeškem mleku močno povečuje po drugem mesecu laktacije, saj ima Lyz, kot tudi Lf, pomembno vlogo proti okužbam dojenih otrok in proti okužbam same mlečne žleze. Lyz kobiljega mleka je stabilnejši kot Lyz človeškega mleka, kar so ugotovili med 30 minutno termizacijo pri 62 °C. Lyz kobiljega mleka nase veže kalcij, ki poveča stabilnost. Lyz kobiljega mleka je odporen proti kislinam in prebavnim encimom, zato lahko uide presnovnim procesom relativno nespremenjen (Brezovečki in sod., 2014).

2.2.1.4 Imunoglobulini

Od imunoglobulinov se v mleku nahajajo predvsem imunoglobulin A (IgA), G (IgG) in M (IgM). Molekula imunoglobulina je sestavljena iz več polipeptidnih verig in ima značilno "Y" obliko. Značilno za imunoglobuline je, da so sestavljeni iz dveh težkih (angl. *heavy chains*, H) in dveh lahkih (angl. *light chains*, L) polipeptidnih verig (Vozelj, 2000). Molekulská masa težkih verig je od 55 do 76 kDa, molekulská masa lahkih verig pa je od 22,5 do 27,3 kDa (Farrell in sod., 2004). Glavna biološka vloga imunoglobulinov v mlečni žlezi je zaviranje bakterijske rasti, predvsem varovanje mlečne žleze pred vnetjem. Avtorji navajajo, da je koncentracija imunoglobulinov A, G in M poleg stopnje okužbe vimena, odvisna tudi od starosti živali, obdobja laktacije, okoljskih pogojev in prehrane živali (Kociča in sod., 2012).

Delež imunoglobulinov v mleku se med vrstami precej razlikuje (Preglednica 4). IgG je glavni imunoglobulin kobiljega in kravjega mleka ter kolostruma, medtem ko IgA

prevladuje v človeškem mleku in kolostrumu. V kravjem mleku so identificirali tri podrazrede IgG, in sicer IgG1, IgG2 in IgG3. Razmerje IgG1:IgG2 je v kolostrumu 15 do 20:1 v mleku pa 4 do 7:1. Pri človeku se IgG prenese preko placente na zarodek že v embrionalnem razvoju. Pri kobili se IgG od matere na mladiča prenese šele ob zaužitju kolostruma oz. kasneje mleka. Mleko kobile vsebuje več IgG v primerjavi s človeškim mlekom (Widdowson, 1984, cit. po Brezovečki in sod., 2014; Potočnik in sod., 2011).

Preglednica 4: Delež imunoglobulinov (%) v kobiljem, kravjem in človeškem mleku (Brezovečki in sod., 2014; Uniacke-Lowe, 2010)

Table 4: Immunoglobulins (%) in equine, cow's and human milk (Brezovečki et al., 2014; Uniacke-Lowe, 2010)

Delež	Kobilje mleko	Kravje mleko	Človeško mleko
Imunoglobulini-skupaj	1,63	0,80	0,96
IgG	0,38	0,65	0,03
IgA	0,47	0,14	0,96
IgM	0,03	0,05	0,02

2.2.1.5 Serumski albumin

Serumski albumin (SA) je glavni protein krvnega seruma, prisoten pa je tudi v drugih telesnih tkivih in izločkih. Ima pomembno biološko vlogo pri transportu, metabolizmu in uravnavanju krvnega tlaka. Serumski albumin v mleku je fizikalno in imunološko identičen tistemu v krvnem serumu. Vsebnost SA v kravjem mleku je okoli 1,5 % od skupnih proteinov mleka in okoli 8 % od skupnih sirotkinih proteinov. Kravji SA sestoji iz 583 aminokislin in vsebuje 17 disulfidnih vezi, njegova molekulska masa pa je 66399 Da. V zaporedju aminokislin je SA kravjega mleka 92,4 % identičen s SA ovčjega mleka, 76 % identičen s SA človeškega mleka ter 76 % identičen s SA kobiljega mleka (Farrell in sod., 2004).

2.2.2 Kazeini

Kazeini mleka so po definiciji (Jenness, 1979) tisti fosfoproteini, ki ob nakisanju surovega posnetega mleka pri pH 4,6 in pri temperaturi 20 °C izgubijo topnost oz. se oborijo. Delež kazeinov v mleku je različen med vrstami. Kravje mleko vsebuje okoli 80 % kazeinov od skupnih proteinov, človeško mleko okoli 30 % in kobilje okoli 50 % kazeinov od vseh mlečnih proteinov (Preglednica 2). Kazeini so pomemben vir aminokislin, kalcija in fosfata novorojenemu sesalcu. Najpomembnejša biološka funkcija kazeinov je vezava in prenos kalcijevega fosfata, ki je za mladiče v času sesanja pomemben za tvorbo kosti. Na osnovi podobnosti primarnih struktur kazeine delimo v štiri skupine: α_{S1} -, α_{S2} -, β - in κ -kazein, od katerih so prvi trije za kalcij občutljivi kazeini. Prvotno so ločili le tri frakcije kazeinov, ki so jih poimenovali α -, β - in γ -kazeini (Hipp, 1952 cit. po Fox in sod., 2015). Kasneje sta Hippel in Waugh (1956, cit. po Fox in sod., 2015) ugotovila da frakcija α -kazeina sestoji iz dveh proteinov. Prvega sta ločila pri nizki koncentraciji Ca^{2+} in, ker je zelo občutljiv za kalcij, so ga poimenovali α_S -kazein (s-angl. *sensitive* ali občutljiv za kalcij). Drugi protein pa ni bil občutljiv za kalcij, poimenovali so ga κ -kazein. Kasneje so ugotovili, da α_S -kazein sestoji iz dveh kazeinov, ki so ju poimenovali α_{S1} - in α_{S2} -kazein. Deleži posameznih kazeinov v kravjem mleku so v povprečju 38 %, 10 %, 35 % in 15 % za α_{S1} -, α_{S2} -, β - in κ -kazein (Fox, 2003; Fox in sod., 2015). Hidrofilni deli kazeinov so evolucijsko bolj ohranjeni. Na hidrofilnih delih se nahaja fosforiliran serin, na katerega se veže kalcij. Tako se kazeini preko kalcijevega fosfata povezujejo v micele. Pri vezavi in

prenosu kalcijevega fosfata imata največjo vlogo α_{S1} - in α_{S2} -kazein, saj vsebujeta največ fosforilacijskih mest (Holt, 1992).

Kazeini se v mleku nahajajo v obliki koloidno razpršenih delcev, ki jih imenujemo kazeinske micele. V micelah so prisotne vse štiri skupine kazeinov, ki se povezujejo s hidrofobnimi interakcijami in preko povezav s kalcijevim fosfatom. Micele so sestavljene iz dveh različnih vrst micelnih podenot. Bolj hidrofobna micelna podenota je sestavljena iz α_s - in β -kazeina. Bolj hidrofilna micelna podenota je sestavljena iz α_s - in κ -kazeinov. Slednja je bolj hidrofilna zaradi sladkornih ostankov na κ -kazeinskih molekulah. Rast kazeinskih micel je odvisna od κ -kazeina, ki je lociran na površini kazeinske micele. Njegovi C-terminalni konci štrlico iz površine micele in oblikujejo sterično površino, ki z elektrostatskim odbijanjem preprečuje nadaljnje zlepjanje micelnih podenot. Premer kazeinske micele je od 50 do 500 nm (Uniacke-Lowe in sod., 2010; Jasińska in Jaworska, 1991). Kazeinske micele kobiljega mleka so največje v primerjavi z kravjim in človeškim mlekom (Preglednica 4). Za kravje in kobilje kazeinske micele je ugotovljena tako imenovana gobasta struktura, ki je pri kazeinskih micelah iz krovjega mleka bolj urejena, zaprta, pri kazeinskih micelah kobiljega mleka pa bolj odprta. Odprta struktura kazeinske micele je značilna tudi za človeško mleko. Značilnost kazeinske micele z odprto strukturo je večja občutljivost za proteolitične encime, zato jih pepsin hitreje razgradi. Tako se kazeinske micele v človeškem mleku ob prisotnosti pepsina najhitreje razgradijo, sledi mu kobilje in nato kravje mleko (Holt in sod., 2013)

Kazeinska frakcija kobiljega mleka sestoji v glavnem iz α_s -kazeina (α_{S1} - in α_{S2} -kazein) in β -kazeina (Preglednica 4). Delež κ -kazeina je v kobiljem mleku manjši kot v mleku prežvekovcev in človeškem mleku (Egito in sod., 2001). Ker je delež κ -kazeina v kobiljem mleku manjši, njegov C-terminalni konec pa ni močno hidrofilen, ni popolnoma jasno kako se površina kazeinske micele iz kobiljega mleka stabilizira (Uniacke-Lowe in sod., 2010). Doreau in Martin-Rosset (2002) sta ugotovila, da je za sterično stabilizacijo kazeinske micele iz kobiljega mleka odgovoren poleg κ -kazeina še nefosforiliran β -kazein, ki nadomesti pomanjkanje κ -kazeina. Kravje mleko je bogato z α_{S1} -kazeinom, s katerim so povezane alergijske reakcije pri otrocih ob konzumaciji krovjega mleka. Kravje in ovčje mleko imata velik delež α_s -kazeina, med tem ko ima človeško mleko večji delež β -kazeina. Večjo vsebnost β -kazeina v primerjavi z α_s - in κ -kazeinom ima tudi kozje mleko. Tudi kobilje mleko je relativno bogato z β -kazeinom (podoben delež α_s -kazeina in β -kazeina) (Doreau in Martin-Rosset, 2002).

Preglednica 5: Kazeinske frakcije kobiljega, kravjega, ovčjega, kozjega in človeškega mleka (Creamer, 1991, Boland in sod., 1992, Abd El-Salam in sod., 1992, Cuilliere in sod., 1999, Pirisi in sod., 1999, Ochirkhuyag in sod., 2000, Malacarne in sod., 2002, Bramanti in sod., 2003, Park in sod., 2007, Moatsou in sod., 2008, vsi cit. po Potočnik in sod., 2011).

Table 5: Casein fraction of equine, cow's, ovine, goat's and human milk (Creamer, 1991, Boland et al., 1992, Abd El-Salam et al., 1992, Cuilliere et al., 1999, Pirisi et al., 1999, Ochirkhuyag et al., 2000, Malacarne et al., 2002, Bramanti et al., 2003, Park et al., 2007, Moatsou et al., 2008, all cited in Potočnik et al., 2011).

Parameter	Kobilje mleko	Kravje mleko	Ovčje mleko	Kozje mleko	Človeško mleko
kazein-skupaj (g/kg)	10,7	25,1	44	24	3,7
α_s -kazein (%)	46,65 (40,2-59,0)	48,46 (48,3-48,5)	50,23	(21,2-32) 19,7 (18,4-21)	11,75 (11,1-12,5) /
α_{s1} -kazein (%)	/	38,45 (37,6-39,5)	35		
α_{s2} -kazein (%)	/	9,82 (7,8-12,1)	8	12,3 (11-13,6)	/
β -kazein (%)	45,64 (40,1-51,4)	35,7 (35,8-37,9)	39,95	(48-60)	64,75 (62,5-66,7)
κ -kazein (%)	7,71	12,69 (12,7-13,8)	9,82	(12-20)	23,5 (22,2-25,0)
Velikost micele (nm)	255	182	210	260	64

*Pod srednjimi vrednostmi so ponekod v oklepajih zapisane min in max vrednosti

Primerjava zaporedja aminokislin treh kazeinov (α_{s1} -, β - in κ -kazeina) iz kobiljega mleka, s kazeini kameljega, prašičjega, človeškega, kravjega, ovčjega in kozjega mleka je pokazala medvrstno homolognost med 40 % in 67 %. κ -kazein kobiljega mleka ima najbolj ohranjeno zaporedje, sledi mu β -kazein. Ohranjenost zaporedja posmeznega kazeina je v veliki meri povezana z njegovo biološko funkcijo. Kazeini kobiljega mleka so bolj podobni kazeinom človeškega, kameljega in prašičjega mleka kot pa kazeinom kravjega, ovčjega ali kozjega mleka (Preglednica 6). Relativno visoka identičnost aminokislinskega zaporedja kazeinov kobiljega in človeškega mleka je lahko deloma vzrok za boljšo prebavljivost kobiljega mleka (Doreau in Martin-Rosset, 2002).

Preglednica 6: Primerjava zaporedij aminokislin za α_{s1} -, β - in κ -kazein* (Lenasi in sod., 2003)

Table 6: Pair-wise amino acid sequence alignment of α_{s1} -, β - and κ -casein* (Lenasi et al., 2003)

	α_{s1} -kazein		β -kazein		κ -kazein	
	Konj	Človek	Konj	Človek	Konj	Človek
Konj	100	54	100	59	100	65
Kamela	46	43	53	60	67	58
Prašič	44	38	59	60	62	56
Človek	54	100	59	100	65	100
Krava	42	34	55	54	57	52
Ovca	40	31	55	56	60	51
Koza	42	34	54	55	57	51

*Za vsak kazein je sekvenca kobiljega in človeškega kazeina v paru primerjana s sekvenco istega proteina pri drugih vrstah (kamela, prašič, človek, krava, ovca, koza). Identičnost sekvenč je prikazana v odstotkih (%).

*For each casein, equine amino acid sequence and human amino acid sequence are pair-wise compared with corresponding sequences in other species. Sequence identities are shown in percents (%).

2.2.2.1 α_{S1} -kazein

V kravjem mleku predstavlja α_{S1} -kazein okoli 40 % celotne kazeinske frakcije. Sestoji iz 199 aminokislin, njegova molekulska masa je 23615 Da. Identificiranih je več genetskih variant, poimenovanih od A do H (Farrell in sod., 2004). Varianta B prevladuje v populaciji *Bos taurus*, varianta C prevladuje pri *Bos indicus*, varianta D je zastopana pri različnih francoskih in italijanskih pasmah goveda, kot tudi pri Jersey pasmi. Črno bela pasma ima več kot 95 % variante B, Jersey pasma pa 60 % variante B in 40 % variante C (Ginger in Grigor, 1999). Varianta A je nastala kot posledica alternativnega vzorca vključevanja eksonov, pri katerem so bili določeni eksoni izpuščeni iz vključevanja v zrelo mRNA. Odkar so poznane različne genetske variante kazeinov je mnogo raziskav usmerjenih v preučevanje korelacij med genetsko varianto določenega kazeina in proizvodnjo mleka ter genetsko varianto kazeina in tehnološkimi lastnostmi pri usirjanju mleka. Ugotovili so pozitivno korelacijo med genotipom α_{S1} -kazein BB in večjo pritejivo mleka, poleg tega varianta B tvori tudi bolj čvrst koagulum (Farrell in sod., 2004). Značilnost α_{S1} -kazeina pri večini vrst je njegova visoka stopnja fosforilacije (Gorodetskii in sod., 1987; Ginger in Grigor, 1999). α_{S1} -kazeini različnih vrst vsebujejo več fosforilacijskih mest, večinoma na mestih od 100 do 110 aminokislinskih ostankov. Fosforilirana mesta so na serinskih ali treoninskih ostankih. Kravji α_{S1} -kazein najdemo v dveh fosforilacijskih oblikah, z 8 ali 9 fosfatnimi skupinami (Ginger in Grigor, 1999).

Zaporedje aminokislin α_{S1} -kazeina kobiljega mleka so ugotovili na podlagi sekvence cDNA, ki so jo določili Milenkovic in sod. (2002) ter Lenasi in sod. (2003). α_{S1} -kazein kobiljega mleka vsebuje 205 amino kislin, njegova molekulska masa pa je 24.614 Da. Zaporedje aminokislin določenega proteina se razlikuje med vrstami, razlikuje pa se tudi znotraj vrste. Vzrok za nastanek različnega zaporedja aminokislin določenega proteina znotraj vrste pripisujejo specifičnemu vzorcu vključevanja eksonov v zrelo mRNA, značilnem za posamezno vrsto (Milenkovic in sod., 2002; Lenasi in sod., 2003). Tako je za α_{S1} -kazein kobiljega mleka značilno alternativno vključevanje eksonov 3, 5, 6, 13 in 14. Milenkovic in sod. (2002) so ugotovili, da je ekson 13 (ekson 13 je pri prežvekovalcih dvojnik eksona 10) izključen iz cDNA kobile. Ta ekson manjka tudi v cDNA za α_{S1} -kazein človeka in prašiča. Vzrok za manjkajoči ekson v cDNA kobile pripisujejo mutaciji na mestu v bližini eksona ali pa le odsotnosti podvojitve eksona 10. Vzorec vključevanja eksonov za α_{S1} -kazein pri kobili je bolj podoben vzorcu vključevanja eksonov pri kuncu kot vzorcu vključevanja eksonov pri prežvekovalcih. Ko primerjamo med seboj sekenco cDNA α_{S1} -kazeina med različnimi vrstami ugotovimo 61 % - 93 % podobnost (Milenkovic in sod., 2002). Zaporedje nukleotidov eksona 9 α_{S1} -kazeina kobile se 75 % ujema z nukleotidnim zaporedjem istega eksona pri kozi, kuncu in prašiču. Ko ta ekson primerjamo s človeškim eksonom je primerljivost pod 65 %. Eksona 15 in 18 α_{S1} -kazeina kobile se v več kot 85 % ujemata z eksonoma 15 in 18 drugih vrst (Milenkovic in sod., 2002).

Tudi pri α_{S1} -kazeinu kobile je ugotovljena visoka stopnja fosforilacije. Našli so fosforilacijske oblike z od 2 do 6 oz. od 2 do 8 fosfatnih skupin, odvisno od genetske variante (Matéos in sod., 2009b). Pri α_{S1} -kazeinu kobile obstaja veliko genetskih variant, v odvisnosti od alternativnega vključevanja eksonov 7 in 14 (Milenkovic in sod., 2002; Lenasi in sod., 2003; Miranda in sod., 2004; Matéos in sod., 2009b). Matéos in sod. (2009b) so ugotovili 36 različnih oblik α_{S1} -kazeina v kobiljem mleku haflinger pasme, kot

rezultat post-translacijskih modifikacij (število oblik glede na alternativno vključevanje eksonov in glede na število fosfatnih skupin).

Kobila	1	MKLLILTCVALVALRPKLPHRQ---PEIIQNEQDSREKV-LKERKFPS-FALEYINELN	55
Krava	1H.IKHQGL.QEVL..NLL.FF.---AP..EV.GK.KV...S	56
človek	1	.R.....L.Y---RL..PSE.S.PIP.ES.E-----M.GM.	50
kobila	56	RQRELLKEKQKDEHKEYLIEDPEQQESSSTSSEEVVPINTEQKRIPREDM---LYQHTL	112
krava	57	K--DIGS.STE.QA---M..IK.M.AE.I.....I..NSV...H.QKD.VPSER.LGY.	110
človek	51	...NI.R...T.----K.TRNESTQNCVVA.PEK--MESSISSSS.E---SLSKCA	100
kobila	113	EQLRRLSKYNQLQLQAI--HAQEQLIRMKEN--SQRKPMRVVNQEQAYFYLEPFQPSYQ	167
krava	111	...L..K..KVP..EIVPNS.E.R.HS...GIHAQ.KE..IG....L....P.L.RQF..	170
človek	101	..FC..NE.....A--....IR..N.....HVQ-----V...QLN.	141
kobila	168	LDVYPYAAWFHPAQIMQHVAYSPFHDTAKLIASENSEKTDIIPW	212
krava	171	..A..SG..YYVPLGT.YTDAPS.S.IPNP.G....G..-TM.L.	214
človek	142	.AA....V.YY.-....Y.PFP..S.ISNPT.H..Y..NNVMLQ.	185

Slika 1: Primerjava zaporedij aminokislin za α_{S1} -kazein kobile, krave in človeka (Primerjava je bila narejena z orodjem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, 2016) pri NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Figure 1: Amino acid alignment of equine, cows and human α_{S1} -casein (Alignment was made by Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, 2016) at NCBI (National Center for Biotechnology Information).

2.2.2.2 α_{S2} -kazein

Za α_{S2} -kazein je značilno, da je bolj podoben β -kazeinu kot α_{S1} -kazeinu pri vseh vrstah. Medvrstna primerjava je pokazala veliko razliko v zaporedju nukleotidov ter veliko število nukleotidnih zamenjav. Pri α_{S2} -kazeinu kravjega mleka so prvič ugotovili ponavljajoče se zaporedje nukleotidov. Ponovljivost zaporedja nukleotidov je bila predvsem izražena na kodonih od 43 do 124 in od 125 do 204. Rezultat ponavljajočega se zaporedja nukleotidov so eksoni od 12 do 16, ki so nastali kot rezultat podvojitve eksonov od 7 do 11 (Martin in sod., 2003). Podobne ugotovitve so našli tudi pri α_{S2} -kazeinu kamele, podgane in morskega prašička, vendar ne pri miši in kuncu. Pri miši in kuncu je gen za α_{S2} -kazein krajši in ne vsebuje podvojitev eksonov, značilnih za α_{S2} -kazein krave (Dawson in sod., 1993).

Najpomembnejša biološka vloga α_{S2} -kazeina je sposobnost tvorbe disulfidnih mostov, ki nastanejo zaradi bližine dveh Cys, in sicer na mestu 36 in 40 pri α_{S2} -kazeinu krave (Martin in sod., 2003).

Tudi α_{S2} -kazein je visoko fosforiliran kazein. Kravje mleko vsebuje štiri različne fosforilacijske oblike α_{S2} -kazeina, ki vsebujejo 10 – 13 fosfatnih skupin. α_{S2} -kazein predstavlja precej bolj neskladno skupino, kot α_{S1} -kazein (Ginger in Grigor, 1999).

Zaporedje aminokislin α_{S2} -kazeina kobile so prvi identificirali Ochirkhuyag in sod. (2000) in objavili zaporedje 15 aminokislin N-terminalnega konca. Delno zaporedje teh 15-ih aminokislin α_{S2} -kazeina kobile so kasneje potrdili tudi Miranda in sod. (2004). V letu 2015

pa so objavili celotno zaporedje aminokislin α_{S2} -kazeina kobile za varianti A in B (Brinkmann in sod., 2015).

Kobila B	1	MKFFIFTCLLAVALAKHNMEHRSSSEDSVNISQEKFQEKYVVIPTSKESICSTSCEEAT	60
krava	1NT....-V..SEESI....TY....NMA.NP...VVRNANE..YS	59
koza	1K...I...EPI..F..IY....NMA.HPR..KL.T....VV	60
kobila A	1	60
kobila B	61	RNINE-----MESAKFPTE-----REEKEVEEKHHHLKQLNKINQ	94
krava	60	IGSSS-----E...EVA.....EVKIT.DD..YQ.A..E...	93
koza	61	..A..EEYSIRSSSE...EVAP.....EIKIT.DD..YQ.A..E...	103
kobila A	61VYSSSSSSEESAKFPTE.....	111
kobila B	95	FYEKLNFLQYLQALRQPRIVLTPWDQTKTGDSPFIPIVNTEQLFTSEEIPKKTVDMESTE	154
krava	94	..Q---P....Y.Y.GP...N....V.RNAV.IT.TL.R...S....NS.....	151
koza	104	..Q---P....YPY.GP...N....V.RNAG..T.T..R...S....NS..I.....	161
kobila B	112	171
kobila B	155	VVTEKTELTEEEKNYLKLL----YYEKFTLPQYFKIVRQHQTTMDPRSHRKTSYQIIP	209
krava	152	.F.K..K.....R.NF.KKISR.Q..A....L.T.Y...KA.K.WIQP...--KV..	208
koza	162	.F.K..K.....R.NF.KKISQ..Q..AW...L.T.D...KA.K.WTQP..A---..	218
kobila A	172	226
kobila B	210	VLRYF 214	
krava	209	YY..L 213	
koza	219	YY..L 223	
kobila A	227 231	

Slika 2: Primerjava zaporedij aminokislin za α_{S2} -kazein kobile (varianta A in B), krave in koze (Primerjava je bila narejena z orodjem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, 2016) pri NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Figure 2: Amino acid alignment of equine (variant A and B), cows and goat α_{S2} -casein (Alignment was made by Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, 2016) at NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Primerjava zaporedja aminokislin α_{S2} -kazeina (varianata B) kobile z α_{S2} -kazeinom krave je pokazala 55 % homolognost, primerjava zaporedja aminokislin α_{S2} -kazeina (varianata B) kobile z α_{S2} -kazeinom koze pa 57 % homolognost. Med variantama A in B α_{S2} -kazeina kobile pa se je pokazala 93 % identičnost.

2.2.2.3 β -kazein

Vsebnost β -kazeina v kravjem mleku predstavlja kar 45 % od skupnih kazeinov. Ob cepitvi s proteazo plazminom so identificirali tri kazeinske frakcije (fragmente β -kazeina), ki so jih poimenovali kot γ_1 -, γ_2 - in γ_3 -kazein. Fragment γ_1 -kazein sestoji iz aminokislin od 29 do 209, fragment γ_2 -kazein sestoji iz aminokislin od 106-209, tretji fragment pa iz aminokislin od 108 do 209. Polipeptidno verigo β -kazeina, najpogosteje prisotne variente A2 (referenčni protein β -CN A2-5P), sestavlja 209 aminokislin, njegova molekulska masa pa je 23.983 Da. Identificirali so več variant β -kazeina kravjega mleka, A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G, H1, H2, I. Fragmenti γ_1 -, γ_2 - in γ_3 -kazeina so prisotni le pri A1, A2, A3 in B varianti. β -kazein je najbolj hidrofoben izmed vseh kazeinov. Na N-terminalnem koncu β -kazeina prevladujejo nabite aminokisline in fosfoserinski ostanki, na C-koncu pa nevtralne in hidrofobne aminokisline. Zaradi te nenavadne razporeditve aminokislin se pri nižjih temperaturah β -kazein sprosti iz kazeinskih micel (Eigel in sod., 1984; Farrell in sod.,

2004). β -kazein je bogat z Gln na lokacijah, ki so dobro ohranjene. Dobro ohranjen je tudi fosforilacijsko mesto blizu N-terminalnega konca polipeptidne molekule. β -kazein kravjega mleka vsebuje 5 fosfatnih skupin in obstaja v polno fosforilirai obliki. Varianti A1 in B vsebujejo His na mestu 67, medtem, ko ima varianta A2 na tem mestu Pro. Varianta B vsebuje Arg na mestu 122, pri variantah A1 in A2 pa je na istem mestu aminokislina Ser (Ginger in Grigor, 1999).

Zaporedje aminokislin β -kazeina kobile je poznano na podlagi več raziskav. Poznane so tri genetske variente β -kazeina (oblike, izoforme). Dolga oblika β -kazeina (angl. *full length β -casein*) ima 241 aminokislinsko skupino (Egito in sod., 2002; Lenasi in sod., 2003; Miranda in sod., 2004; Girardet in sod., 2006; Miclo in sod., 2007; Matéos in sod., 2010). β -kazein krave in človeka vsebuje 209 oz. 211 amino kislin. Druga oblika β -kazeina kobiljega mleka je nastala iz mRNA z manjkajočim eksonom 5 (β -CN $^{\Delta 5}$) in so jo identificirali pri ponijih pasme Welsh (Miranda in sod., 2004). Tretja oblika β -kazeina pa je nastala iz mRNA, kjer manjka 75 % eksona 7 (Lenasi in sod., 2006; Miclo in sod., 2007). Lenasi in sod. (2006) so domnevali tudi prisotnost četrte oblike, kjer naj bi bila izključena eksona 5 in 8, a te oblike niso potrdili.

Pri β -kazeinu so prav tako ugotovili visoko stopnjo fosforilacije. Za razliko od β -kazeina kravjega mleka, ki je popolnoma fosforiliran in na gelu tvori eno veliko liso, je β -kazein kobiljega mleka prepoznaven po tem, da tvori pet lis, kar je posledica različne ravni fosforilacije (Egito in sod., 2003). Tako β -kazein vsebuje od 3 do 7 fosfatnih (P) skupin (3P do 7P; Girardet in sod., 2006). Vseh pet fosforiliranih oblik β -kazeina so tudi karakterizirali s pomočjo masne spektrometrije in tako glede na raven fosforilacije določili oblike z masami 25755, 25834, 25914, 25994 in 26073 Da za 3P, 4P, 5P, 6P in 7P (Egito in sod., 2003; Matéos in sod., 2010). Izoelektrična točka različnih fosforilacijskih oblik β -kazeina iz kobiljega mleka se giblje od 4,74 do 5,30 (Girardet in sod., 2006).

β -kazein je občutljiv za aspartatne proteinaze, kot je kimozin. Vez levcin-tirozin (Leu₁₉₀-Tyr₁₉₁) v β -kazeinu pri konju se hitro cepi ob prisotnosti kimozina. Nastala dva produkta pa sta odporna proti nadaljnji hidrolizi s kimozinom pri pH 6,5 (Egito in sod., 2001). Vez Lys₄₇-Ile₄₈ je najbolj dovetna za hidrolizo s plazminom (Egito in sod., 2003).

β -kazein kobiljega mleka je podvržen tudi neencimatski deamidaciji, ki poteče spontano pri inkubaciji pri 37 °C in rahlo bazičnem pH (Girardet in sod., 2006). Deamidacija večinoma poteče na Asn₁₃₅ aminokislinskem ostanku v zaporedju Asn-Gly. β -kazein krave in človeka ne vsebuje Asn-Gly zaporedja in zato ni podvržen deamidaciji (Sood in sod., 1997; Uniacke-Lowe in sod., 2010).

Kobila 1	MKILILACLVALALAREKEELNVSETVESLSSNEPDSSS-EEKLQKFHKHEGQQQREVER	59
Krava 1	..V.....L.....PG.I.....S.E.SITRINK.IE.QS.E.T.D.L	60
Človek 33	KQ.VE.V...D...G.D.H	51
Kobila 60	QDKISRFVQPQPVVYPYAEPPVYAVVPQSILPLAQPPI-L--PFLQPEIMEVSQAKETIL	116
Krava 61HP.A.T.SL...FPG.I-HNSL..N.P..T.T.V-VVP.....V.G..KV..AMA	118
človek 52YPSF....LI..FV..I..GFL..N.....AVV.--.VP.....PK..D.VY	109
kobila 117	PKRKVMPFLKSPIVPFSERQILNPNTNGENLRLPVHLIQPFMHQVPQSLLQTLMLPSQPV	176
krava 119	..H.E...P.Y.VE..T.S.S.TL.DV...H..LP.L.SW...PH.P.PP.V.F.P.S..	178
človek 110	T.GR....V....TI..FDP..PKL.DL...H..LP.L..L.Q....PIP...A..P..LW	169
kobila 177	SPPQSKVAPFPQPVVPYQPQRDTPVQAFLLYQDPRLGPTGELDPATQPIAVHNPVIV	233
krava 179	.LS....L.V..KA.....M.I.....E.V...	215
človek 170	.V..P..L.I..Q.....AV....L..N.ELL.N..HQIY.V....LAP....IS.	226
Človek 210	E..LG.VRG.F.II.	224

Slika 3: Primerjava zaporedij aminokislin za β -kazein kobile, krave in človeka (Primerjava je bila narejena z orodjem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, 2016) pri NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Figure 3: Amino acid alignment of equine, cows and human β -casein (Alignment was made by Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, 2016) at NCBI (National Center for Biotechnology Information; NCBI).

Primerjava zaporedja aminokislin β -kazeina kobile in krave ali kobile in človeka je pokazala 58 % podobnost v obeh primerih.

2.2.2.4 κ -kazein

κ -kazein je fosforiliran in glikoziliran kazein. V skupini κ -kazeinov se proteini med seboj razlikujejo v stopnji fosforilacije in glikozilacije. Glikozilacija κ -kazeina poteče šele po njegovi fosforilaciji. O-glikozilacijo katalizirajo specifični encimi, kot so galaktoziltransferaze in sialiltransferaze. Dodani ogljikovi hidrati se med seboj razlikujejo po številu, sestavi in razvejanosti verig. Definirali so pet različnih glikozilnih motivov in na protein se preko Thr vežejo z O-glikozidno vezjo. κ -kazein kravjega mleka (referenčni protein; κ -CN A-1P) sestavlja 169 aminokislin in ima molekulsko maso 19037 Da, je enkrat fosforiliran in ni glikoziliran. Identificirali so različne genetske variante κ -kazeina, od A do J. Najbolj pogosti sta varianti A in B. Varianta A prevladuje pri večini mlečnih pasem goveda razen pri jersey pasmi. Varianta B se razlikuje od variante A v zamenjavi Ile z Thr na mestu 136 in v zamenjavi Ala z Asp na mestu 148. Vez med Phe₁₀₅ in Met₁₀₆ je občutljiva za cepitev s kimozinom. Pri hidrolizi nastaneta para- κ -kazein (1-105) in glikomakropeptid (106-169) (Uniacke-Lowe in sod., 2010).

κ -kazein so prvi izolirali iz kobiljega mleka Iametti in sod. (2001) in Lenasi in sod. (2003), ter določili njegovo zaporedje aminokislin. Primarno strukturo κ -kazeina kobile tvori 165 amino kislinskih ostankov (štiri manj kot κ -kazein krave in tri več kot κ -kazein človeka). Njegova molekulskga masa (pred post-translacijskimi modifikacijami) je ocenjena na 18.844 Da (Uniacke-Lowe in sod., 2010). Zaporedji aminokislin κ -kazeina, ki sta ju, s sodelavci določila imenovana raziskovalca, sta med seboj 97 % identični. Na podlagi visoke identičnosti κ -kazeina še z drugimi vrstami so Iametti in sod. (2001) predpostavili, da se v κ -kazeinu nahajajo tri fosforilacijska mesta (Thr¹²⁷, Thr¹⁵⁰ in Ser¹⁶⁰). Glikozilacija lahko pri κ -kazeinu poteče na petih Thr ostankih. Poleg tega je zaporedje, ki je občutljivo za cepitev s kimozinom, zelo dobro ohranjeno (Iametti in sod., 2001).

Mesto, občutljivo za cepitev s kimozinom (Phe-Ile), je pri κ -kazeinu kobile enako kot pri človeku, kameli in prašiču, vendar ni enako kot pri kravi (to mesto je pri kravi na Phe-Met). κ -kazein kobile vsebuje dva cisteinska ostanka za razliko od α_{S1} - in β -kazeina, ki vsebuje le en cisteinski ostanek. κ -kazein človeškega mleka prav tako vsebuje le en cisteinski ostanek. Zaradi teh razlik, κ -kazein kobiljega mleka tvori disulfidne vezi v kazeinski miceli (homomultimere), κ -kazein človeškega mleka pa se povezuje z α_{S1} -kazeinom (heteromultimere), ki ima štiri cisteinske ostanke (Uniacke-Lowe in sod., 2010).

Kobila	1	MKSFFLVVNILALTLPLGAEVQNQEQQPTCHKNDERFFDLKTVKYIPIYYVLNSSPRYEP	60
Krava	2T.....QE.....IRCEK.....SD.IA.....Q...SRY.S.GL	61
Človek	1L....A.....AV.....K..A..E....P.YQ..AP.V.M...P..Y.Y.GT	60
Kobila	61	IYYQHRLALLINNQHMPYQYYARPAVRPHVQIPQWQVLPNIYPS-----TVVRHPC	112
Krava	62	N...QKPVA.....FL..P...K.....SPA..L.....S.TV.AKSCQAQPT.MA...H	121
Človek	61	NL..R.P.IA...PYV.RT...N..V....A....R.Y...SH.P-----...R.N	112
Kobila	113	PHPFSFIAIPPKKLQEITVIPKINTIATVEPTPIPTPEPTVNNAVIPDASSEFIIASTPET	172
Krava	122	..L..M.....N.DK.E..T.....SG...ST..T..-A.EST.ATLED.PEV.E.P..I	180
Človek	113	L.....I.DKII..T.....T.AT....DSV.T.E.F..S..T....	171
Kobila	173	TTVPVTSPVV	182
Krava	181	N..Q....TA.	190

Slika 4: Primerjava zaporedij aminokislin za κ -kazein kobile, krave in človeka (Primerjava je bila narejena z orodjem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, 2016) pri NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Figure 4: Amino acid alignment of equine, cow's and human κ -casein (Alignment was made by Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, 2016) at NCBI (National Center for Biotechnology Information; NCBI).

Primerjava zaporedja aminokislin κ -kazeina kobile in krave je pokazala 58 % homolognost, primerjava zaporedja aminokislin κ -kazeina kobile in človeka pa je pokazala 66 % homolognost. κ -kazein kobiljega mleka je torej po aminokislinski sestavi bolj podoben κ -kazeinu človeškega mleka kot κ -kazeinu kravjega mleka.

2.3 KAZEINSKI GENI

Kazeinski geni se pri, do zdaj preučevanih vrstah, nahajajo v kazeinskem sklopu, ki je pri različnih vrstah različno obsežen (od 250 do 350 kb). Skupina genov je pri vseh vrstah na enem samem kromosomu. V kazeinskem sklopu genov so tudi drugi geni, ne samo kazeinski, saj so področja med posameznimi kazeinskimi geni velika (Rijnkels, 2002). Tako so Sabatini in sod. (1993) potrdili tri gene, ki so locirani med genom za β -kazein (CSN2) ter genom za α_{S2} -kazein, (CSN1S2). Ti geni so geni za histatin 1 in 2 (HIS1 in HIS2) ter gen za statherin (STATH), ki se izražajo v žlezi slinavki. Vsak kazeinski gen ima v genomu samo en zapis in vsi kazeinski geni so na istem kromosomu. Regija s kazeinskimi geni je bogata z bazami A in T, baz G in C vsebuje manj kot 37% (Rijnkels, 2002).

2.3.1 Primerjava kazeinskih genov

Kazeinski geni predstavljajo eno izmed najbolj raznolikih genskih družin. Vzrok za raznolikost kazeinskih genov so polimorfizmi in pojav alternativnega izrezovanja intronov, ki vodi do različnih translacijskih produktov. Najbolj raziskani so geni za kazeine kravjega

mleka, kjer kazeinski sklop pokriva 200-250 kb na šestem kromosomu. Kazeinski geni so sklopljeni in si sledijo v zaporedju α_{S1} -kazeinski gen (CSN1S1), β -kazeinski gen (CSN2), α_{S2} -kazeinski gen (CSN1S2) in κ -kazeinski gen (CSN3), pri čemer ležita CSN1S1 in CSN2 na 5' koncu sklopa genov in sta orientirana v nasprotni smeri kot CSN1S2 in CSN3 (Rijnkels, 2002). Zaporedja nukleotidov za α_{S1} -, β - in κ -kazein imajo dobro ohranjena zaporedja za signalni peptid in fosforilacijska mesta. Signalna peptida za α_{S1} - in β -kazein sta enako dolga, razlikujeta se le v treh od 15 aminokislin, kar potrjuje hipotezo o skupnem evolucijskem izvoru za kalcij občutljivih kazeinov (Lenasi in sod., 2003).

Primerjava sekvene cDNA je pokazala, da je homolognost med ortologi (isti geni pri različnih vrstah) večja kot homolognost med paralogi (Mercier in Vilotte, 1993). Ohranjenost ortognih kazeinskih genov je v glavnem v 5'- in 3' nekodirajočih regijah, signalnih peptidih in v fosforilacijskih mestih (Mercier in Vilotte, 1993). Pri vseh kazeinskih genih prvi ekson vsebuje zapis za 5' nekodirajočo regijo. Značilno za vse kazeinske gene je, da noben triplet (kodon) ni prekinjen z mejami ekson/intron (Rijnkels, 2002). V genih za kalcij občutljivih kazeinov sta zaporedji nukleotidov za fosforilacijski mesti pogosto na koncu enega eksona in na začetku naslednjega eksona. Na tem mestu nastane pri izrezovanju vmesnega introna glavno fosforilacijsko mesto. Ostali deli zaporedja se med vrstami bolj ali manj razlikujejo, kar je odvisno od filogenetske razdalje med vrstami sesalcev. Kazeinski geni pri različnih sesalcih zajemajo transkripcijske enote med 8,5 in 18,5 kb. Vsebujejo od 4 do 18 eksonov, ki so dolgi med 20 in 530 bp. Pri kazeinskih genih, ki imajo večje število eksonov, so le ti krajsi (gena za α_{S1} - in α_{S2} -kazein). Dolžina intronov v kazeinskih genih je med 80 in 5800 bp. Najbolj ohranjena so mesta na mejah med eksoni in introni, ki so tudi najbolj pomembna pri izrezovanju eksonov (Rijnkels, 2002). Eden od teh je poliadenilacijski signal AATAAA, ki mu sledi signal za konec transkripcije (na področju, ki je bogato z GC). Zaradi ohranjenih mest in drugih podobnosti med kazeinskimi geni so domnevali, da ta kazeinska družina izhaja iz skupnega gena. Predhodnik kazeinskih genov naj bi se razvil v funkcionalni gen s povezovanjem najmanj štirih eksonov. Prva podvojitev tega prvotnega gena je bil gen za α_{S1} -kazein. Naslednji gen, ki se je razvil iz predhodnika, je bil gen za α_{S2} -kazein, kot zadnji pa se je razvil gen za β -kazein. Struktura β -kazeina je bolj ohranjena zaradi njegove specifične funkcije. β -kazein je pomemben za vzdrževanje elektrostatskih interakcij znotraj kazeinske micle. Znano je, da je β -kazein močno fosforiliran, fosforilirani del pa sodeluje pri obarjanju micel po cepitvi s kimozinom. Funkcija α -kazeinov pa je predvsem vezava kalcijevega fosfata in interakcija med kazeini, kar ne zahteva evolucijskega ohranjanja aminokislinskega zaporedja (Pearse in sod., 1986). Za kalcij občutljivi kazeini so torej evolucijsko povezani. Kazeinski geni za α_{S1} -, β - in κ -kazein ležijo pri koncu na istem kromosomu 3 v neposredni bližini (Lenasi in sod., 2003).

Nukleotidno zaporedje in struktura (ekson/intron) kazeinskih genov je dobro preučena pri govedu. Struktura kazeinskih genov pa je vedno bolj preučevana tudi pri drugih vrstah, kot so prašič, kune, konj, glodavci in človek. Primerjava strukture eksonov in sekvene cDNA posameznega proteina med različnimi vrstami (človek, konj, kamela, prašič, kune, govedo, miš in podgana) je pokazala visoko homolognost v strukturiranosti gena CSN1S1. Če primerjamo število eksonov v CSN1S1 med govedom, ovco, kozo, konjem in človekom, je le to zelo podobno (od 16 do 19). Pri miši in podgani je značilno podvojevanje eksona 14, kjer je opazna tudi velika podobnost med kopijami. Pri podgani je

kar 6 od 9 podvojenih eksonov (kopij) 100 % identičnih v zaporedju aminokislin, pri ostalih treh kopijah pa so razlike samo v eni aminokislini. Prisotnost veliko majhnih eksonov in podvojevanje le teh, je vplivala na današnjo strukturo gena CSN1S1 pri sesalcih. Pri prepisovanju gena CSN1S1 je pogosto tudi alternativno izrezovanje intronov. Kot rezultat izpustitve eksona 4 je pri govedu nastala varianta A α_{S1} -kazeina. Tudi pri ovcah in kozah poročajo o različnih variantah zaradi alternativnega izrezovanja intronov (Rijnkels, 2002). Primerjava dveh kodogenih zaporedij gena CSN1S1 pri konju nakazuje na alternativno vključevanje eksonov (8 in 15) tudi pri konju (Lenasi in sod., 2003).

Med ortologi je najbolj ohranjena struktura gena za β -kazein (CSN2). Za razliko od gena CSN1S1, gen CSN2 ne vsebuje pogostih podvojitev eksonov, pri CSN2 gre največkrat za zamenjave nukleotidov. Gen CSN2 pri človeku, govedu, miši in podgani ima 9 eksonov, od katerih samo pri človeku zasledimo skrit ekson 3. Ekson 4 pri vseh primerjanih vrstah vsebuje fosforilacijsko mesto, v eksonu 7 pa je kodirajoče zaporedje za hidrofobni del proteina (Rijnkels, 2002). Za gen CSN2 so ugotovili, da je nabolj podoben predniku kazeinskih genov in da je struktura CSN1S1 nastala kot produkt premikov in duplikacij eksonov gena CSN2 (Groenen in sod., 1993).

Pri miši, podgani in človeku so identificirali dva gena, podobna α_{S2} -kazeinu (CSN1S2). Poimenovali so ju CSN1S2A in CSN1S2B. Pri govedu so v kazeinskem sklopu identificirali le en gen CSN1S2. Medvrstna primerjava gena CSN1S2 je pokazala visoko ohranjenost genske strukture. Večinoma so vsi eksoni prisotni pri vseh vrstah, kjer so preučevali in primerjali gen CSN1S2 (človek, govedo, miš, podgana). Domnevajo, da je do podvojevanja prednika gena CSN1S2 prišlo že pred evolucijsko ločitvijo sodoprstih kopitarjev ter človeka in glodavcev (Rijnkels, 2002). Pri podgani in miši je struktura gena CSN1S2 zelo podobna. Gen CSN1S2 pri podgani in miši kodira protein s 169 aminokislinsimi, njuna aminokislinska identičnost pa je 55 %. Največja razlika med genoma CSN1S2 miši in podgane je, da pri miši manjka ekson 3 (ki kodira glavno fosforilacijsko mesto), pri podgani pa se ekson 8 alternativno vključuje. Nastale razlike v strukturi gena CSN1S2 med miško in podgano so zaradi alternativnega vključevanja eksonov. Primerjava strukture gena CSN1S2 med človekom, govedom in glodavci kaže na visoko ohranjenost gena med preučevanimi vrstami, kljub podvojevanju. Domnevajo, da je podvojevanje genov in podvojevanje eksonov, v kombinaciji z alternativnim vključevanjem eksonov, najpomembnejša pot pri nastanku funkcionalne raznolikosti v evolucijskem razvoju (Rijnkels, 2002). α_{S2} -kazein ima izmed za kalcij občutljivih kazeinov največ fosforilacijskih mest. Njegova najpomembnejša biološka funkcija je prenos kalcijevaga fosfata. Domnevajo, da tudi število fosforilacijskih mest vpliva na funkcionalno raznolikost nastalih proteinov. Na podlagi števila fosforilacijskih mest (P-mest) v genih CSN1S2, so le te razdelili v tri skupine. V prvi skupini so geni, ki kodirajo proteine z 2-3 P-mesti, v drugi skupini so geni, ki kodirajo proteine z 2 P-mestoma, v tretji skupini pa so geni, ki imajo fosforilacijsko mesto le v eksonu 3 (Rijnkels, 2002).

Gen za κ -kazein (CSN3) ni evolucijsko povezan z za kalcij občutljivimi kazeinskimi geni, čeprav je lociran v istem kazeinskem sklopu. Njegova biološka funkcija je stabilizacija za kalcij občutljivih kazeinov v kazeinski miceli. Struktura gena CSN3 je ohranjena pri vseh preučevanih vrstah (človek, govedo, miš, podgana), najbolj je ohranjen signalni peptid, dobro pa je ohranjeno tudi zaporedje, ki kodira za kimozin občutljivo področje v zrelem

proteinu (Rijnkels, 2002). κ -kazein ima pomembno vlogo v strukturi kazeinske micele, zaradi česar je na gen CSN3 usmerjen tudi velik selekcijski pritisk. Vsebnost κ -kazeina vpliva na velikost kazeinske micele, prebavljivost mleka in tehnološke lastnosti mleka (Swaisgood, 1993). Tudi stopnja glikozilacije proteina vpliva na fiziološke lastnosti mleka in kazeinske micele (Rijnkels, 2002).

2.3.2 Alternativno izrezovanje intronov

Variabilnost mRNA in končnega proteina lahko, poleg zamenjav nukleotidov, v največji meri pripisemo alternativnemu izrezovanju intronov, duplikacijam in insercijam/delecijam v genu. Alternativno izrezovanje intronov iz nezrele mRNA je proces, kjer se introni izrežejo na različnih mestih. Posledica izrezovanja je več oblik zrele mRNA. Variante mRNA se med seboj razlikujejo po dolžini oziroma po vsebnosti eksonov ali delov posameznih eksonov. Vse oblike mRNA so rezultat prepisovanja istega gena. Po procesu alternativnega izrezovanja intronov se eksoni združijo v zreli mRNA v enakem vrstnem redu kot v DNA. Mutacije, ki nastanejo v eksonih, neposredno vplivajo na zaporedje aminokislin proteina. Mutacije v intronih ne vplivajo neposredno na zaporedje aminokislin proteina, lahko pa preprečijo spajanje eksonov. Nastali izomorfni proteini se razlikujejo v strukturi, lastnostih in imajo lahko različne biološke funkcije (Lewin, 2004). Kar 95 % človeških genov producira alternativne oblike mRNA, vendar pa v večini primerov ni znano, ali imajo te različne oblike tudi potrjene različne biološke funkcije. Za odgovor na to vprašanje so potrebne *in vivo* raziskave (Brown in sod., 2011).

Alternativno izrezovanje intronov je zelo pogost pojav, kar dokazujejo naslednji podatki. Za človeški genom je v statistični bazi ASD (Alternative Splicing Database) vpisanih okoli 26.000 primerov 5' ali 3' alternativnega izrezovanja, 12.000 primerov preskokov eksonov za 137.197 različnih eksonov (Fox-Walsh in sod., 2005). Za vinsko mušico je v bazi podatkov ASD vpisanih 1.332 primerov izpuščanja exonov in 1.563 primerov 5' ali 3' alternativnih izrezovanj za 40.758 eksonov (Fox-Walsh in sod., 2005).

Prve raziskave o procesu alternativnega izrezovanja intronov so temeljile na preučevanju spola pri vinski mušici. Ugotovili so, da je uravnavanje vključevanja eksona 4, gena *dsx* (angl. *doublesex*), odvisno od *cis* elementa, na katerega se veže kompleks proteinskih faktorjev, ki prispeva k vključitvi eksona v mRNA. Odločilno vlogo pri tem ima protein Tra, ki se izraža samo pri samicah (ekson 4 se torej vključi samo pri samicah) (Bell in sod., 1991). *Cis* in *trans* elementi so neposredno vključeni v proces izrezovanja eksonov. *Cis* elementi (akceptorsko mesto, donorsko mesto, mesto razvejanja v bližini 3' konca introna) so na različnih delih gena. Pogosto je pospeševalni *cis* element v samem eksonu (šibkem eksonu) in ga imenujemo ESE (angl. *enhancer splicing element*). V eksonih so ugotovili tudi *cis* elemente, ki zavirajo vključevanja šibkih eksonov (ESS) (angl. *exonic splicing silencer*). Pri preučevanju celotnega gena so ugotovili, da so *cis* elementi tudi v intronih, kjer so pospeševalne *cis* elemente poimenovali ISE (angl. *intronic splicing enhancer*), zaviralne pa ISS (angl. *intronic splicing silencer*) (Miriam in sod., 2003).

Za preučevanje aktivnosti *cis* elementov se najpogosteje uporablja metode *in vitro*. ESE element, ki je v samem eksonu (po navadi šibkem eksonu), aktivira mesto izrezovanja. Izoblikovali so serije različnih pre-mRNA, ki so se razlikovale v dolžini intronov (od 120 do 425 bp). Znotraj vsake serije so se pre-mRNA razlikovale med sabo v prisotnosti ali

odsotnosti 13 bp dolgega ESE elementa (iz genoma vinske mušice). Celotni ekson je izključen iz procesa izrezovanja, če je obdan z dvema dolgima intronoma. Ugotovili so statistično značilno vključevanje celotnega eksona v primerih, kjer je bil eden od intronov dovolj kratek, da je podpiral prepoznavno mesto izrezovanja v samem intronu. V primeru, kjer ekson obdajata dva kratka introna, je verjetnost vključevanja eksona za 30 x večja kot v primeru, kjer sta ob eksonu dolga introna. Obratno pa so potrdili, da je 90 x večja verjetnost, da bo ekson izključen, če je obdan z dvema dolgima intronoma (Fox-Walsh in sod., 2005).

Vpliv dolžine introna so raziskovali tudi Bell in sod. (1998) na primeru limfocitnega receptorja CD44 (angl. *lymphocite homing receptor*) pri miši, kjer je kar 10 od 20 eksonov vključenih v procesu alternativnega izrezovanja, kombinacije izrezovanja pa dajo več kot 1.000 možnih oblik mRNA. CD44 deluje kot adhezivna molekula z afiniteto za komponente ekstracelularnega matriksa, vključno z hialuronsko kislino, kolagenom in fibronektinom. Ugotovili so, da se nekatere izoformne oblike pojavljajo bolj pogosto kot druge. Eksoni, ki ležijo bliže 3' koncu polipeptidne verige, se bolj pogosto vključujejo v mRNA kot tisti eksoni, ki ležijo bliže 5' koncu verige. Ko so podrobnejše preučevali vključevanje eksona V3, za katerega je bilo dokazano, da veže rastne faktorje in pospešuje razvoj metastaz tumorja, so ugotovili, da je njegovo vključevanje močno odvisno od dolžine intronov. V ta namen so klonirali šest različnih konstruktorjev ter jih transformirali v celice. Ugotovili so, da se V3 ekson vključuje vedno, ko je obdan z dvema kratkima intronoma, ko pa je obdan z dvema dolgima intronoma pa je v procesu izrezovanja izključen. Na proces vključevanja eksona V3 vpliva tudi element ESE, ki je bogat s purinom. Pri mutaciji ta sekvenca mutira v s pirimidinom bogato regijo. Da bi ugotovili vpliv te mutacije na vključevanje V3, so konstruirali tri različne konstrukte glede na mesto mutacije (mutacija na 3' koncu, mutacija na 5' koncu in mutacija na obeh straneh). V primeru, ko je mutacija na enem od koncov verige, se vključevanje eksona zmanjša za 70 % do 100 %. Kjer pa je mutacija na obeh straneh, se ekson popolnoma izključi iz procesa alternativnega vključevanja (Bell in sod., 1998).

V celotnem genomu pri vinski mušici (*Drosophila*) je več kot 85 % eksonov obdanih z vsaj enim kratkim intronom. Veliko kratkih intronov vsebuje tudi genom človeka. Najmanjši intron v genomu človeka je na isti lokaciji kot največji intron v genomu vinske mušice (Fox-Walsh in sod., 2005).

2.3.3 Alternativno izrezovanje intronov pri kazeinskih genih konja

Alternativno izrezovanje intronov je pogost pojav tudi pri genih za kazeine kobiljega mleka, občutljive za kalcij. Največ različnih oblik mRNA so našli pri genih za α_{S1} - in α_{S2} -kazein (Johnsen in sod., 1995; Passey in sod., 1996; Ferranti in sod., 1997; Bouniol in sod., 1993; Milenkovic in sod., 2002; Lenasi in sod., 2003, Lenasi in sod., 2006). Pri α_{S1} - in β -kazeinu se alternativno vključujeta v zrelo mRNA po dva eksona; eksona 8 (42 bp) in 15 (33 bp) α_{S1} -kazeinskega gena in eksona 5 (24 bp) in 8 (42 bp) β -kazeinskega gena pri konju (Lenasi in sod., 2003; 2006). Pri kombinaciji vključevanj dveh eksonov gre pričakovati štiri možne izoformne oblike. Pri genu za α_{S1} -kazein so ugotovili štiri možne oblike mRNA, pri genu za β -kazein pa so ugotovili osem možnih oblik mRNA. Dodatna alternativna oblika β -kazeina je nastala kot posledica alternativnega akceptorskega mesta znotraj eksona 7. Pri uporabi donorskoga mesta znotraj eksona 7 se slednji skrajša za 396

bp, kljub vsemu se bralni okvir ne spremeni, zato se verjetno tudi ta oblika mRNA prevede v protein (Lenasi in sod., 2003, 2006). Različne oblike mRNA so nastale po različnih vzorcih vključevanja eksonov, kjer se lahko vključita oba eksona, se oba izključita ali pa se vključujeta alternativno. Vzrok za nastanek različnih vzorcev vključevanja eksonov so iskali v polimorfizmih na mestih, ki so vključena v proces izrezovanja intronov (donorsko mesto, akceptorsko mesto), v promotorju in intronih ob šibkih eksonih ter v eksonih ob šibkih eksonih (Lenasi in sod., 2003).

V primeru β -kazeina so ugotovili, da na vzorec vključevanja eksonov 5 in 8 vplivata polimorfizma v intronu 1 (Lenasi in sod., 2006). Vpliv polimorfnih mest v intronu 1, na izrezovanje intronov celotnega gena, so pripisali tudi bližini promotorja in s tem mesta začetka transkripcije. Ko so preučevali nukleotidno zaporedje introna 1, so ugotovili, da sta polimorfni mesti v intronu 1 znotraj *cis* elementa, ki se praviloma pojavlja znotraj eksona (ESE) in v procesu izrezovanja intronov pospešuje vključevanje šibkih eksonov v zrelo mRNA. V prvo polimorfno mesto sta vključeni dve zaporedji ESE v drugo pa eno zaporedje ESE. V primeru polimorfizmov v intronu 1 se poruši zaporedje vseh treh elementov ESE. Vpliv polimorfizmov v intronu 1 so nadalje preučevali še v heterolognem vektorskem sistemu. Pripravili so tri konstrukte vektorja, ki je vseboval začetni del promotorja, ekson 1 in začetni del introna 1 za vsako od variant introna 1. S konstrukti so izvedli transfekcijo celične linije epitela mlečne žleze krav in sintetizirano mRNA preučevali z metodo RT-PCR. Ugotovili so, da oba polimorfizma vplivata na količinsko razmerje med krajšimi in daljšimi oblikami mRNA. Poleg elementov ESE v intronu so potrdili tudi najpomembnejše aktivatorske in receptorske elemente, ki sodelujejo pri prepisovanju genov in sicer v promotorju za β - in κ -kazein. Za vse kazeinske promotorje je značilno, da se elementi *cis* pojavljajo v promotorju blizu drug drugemu, zaradi česar se njihov aktivacijski učinek poveča. Po številu vezavnih mest za najpomembnejši aktivator STAT5 je β -kazeinski promotor pri konju enak promotorju pri prežvekovalcih in promotorju pri človeku. V preostalem delu zaporedja promotorja ni dodatnega vezavnega mesta za STAT5, v čemer se promotor pri konju razlikuje od promotorja pri prežvekovalcih. V promotorju β -kazeina sta v bližini vezavnega mesta za aktivator STAT5 še dve vezavni mesti, in sicer vezavni mesti za C/EBP in GR. V tem delu promotorja je še vezavno mesto za STAT6, ki je prav tako aktivator prepisovanja laktoproteinskih genov. Ko so analizirali vezavo aktivatorjev (npr. mišji STAT5) na elemente *cis* promotorja pri konju so ugotovili evolucijsko ohranjenost transkripcijskih faktorjev med različnimi vrstami (Lenasi in sod., 2006).

V primeru α_{S1} -kazeina so z uporabo primernih parov začetnih oligonukleotidov ugotovili dva produkta PCR različnih velikosti. Na območju regije med 4. in 10. eksonom so potrdili krajšo obliko, kjer je manjkal celotni ekson 8. Na območju med 14. in 18. eksonom pa drugo obliko, kjer se v procesu vključevanja v zrelo mRNA ni vključil ekson 15 (Lenasi in sod., 2003).

2.4 ANALITSKE METODE KARAKTERIZACIJE PROTEINOV

Pojem proteom je definiran kot celokupni nabor proteinov v določeni celici, tkivu ali organizmu. Veda, ki se ukvarja z analizo celokupnega proteoma pa je proteomika. Proteomske analize izvajamo z različnimi metodami, delimo pa jih na metodo ločevanja kompleksnih zmesi proteinov in metode za strukturno karakterizacijo polipeptidov. Trenutno še ni razvite metode, ki bi omogočala identifikacijo in kvantifikacijo proteinov v enem preprostem koraku. Pri metodah identifikacije proteinov v vzorcu sta pomembna dva ključna koraka, ločevanje proteinov iz celičnega ali tkivnega vzorca in njihova identifikacija. Kot najbolj uveljavljene metode za ločevanje proteinov iz kompleksnega vzorca so poliakrilamidna gelska elektroforeza (PAGE), tekočinska kromatografija (LC) in dvo-dimenzionalna (2-D) elektroforeza (Križaj, 2008).

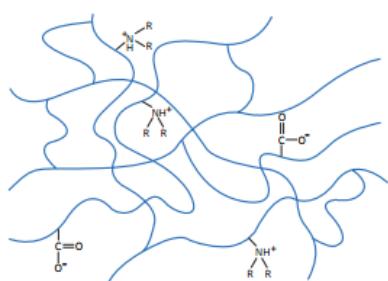
Glavna metoda za identifikacijo proteinov je masna spektrometrija (MS). Meritve se izvajajo z ioniziranimi molekulami v plinski fazi. Rezultat meritve je masni spekter. Najbolj poznane in uporabne metode za ionizacijo proteinov so, npr. ionizacija z elektroni (EI), kemijska ionizacija (CI) in ionizacija s hitrimi atomi (FAB). Najpogosteje pa se uporablja dve, elektrosprej ionizacija (ESI) in ionizacija s pomočjo laserske svetlobe (MALDI). Način dodajanja vzorca v ionizator pa omogoča enostavno sklopitev različnih vrst tekočinske kromatografije (LC) z analizo MS (LC-MS in LC-MS/MS) (Križaj, 2008).

2.4.1 2-D elektroforeza

Dvo-dimenzionalna (2-D) elektroforeza je metoda za ločevanje kompleksnih proteinskih vzorcev, ki jo je prvi uvedel O'Farrell (1975) in je kombinacija metode v prvi dimenziji, ki je izoelektrično fokusiranje (IEF) in metode v drugi dimenziji, ki je poliakrilamidna gelska elektroforeza (SDS-PAGE). Proteini se v prvi dimenziji najprej ločijo glede na izoelektrično točko (pI) v drugi dimenziji pa jih ločimo glede na molekulsko maso (MW). Odvisno od velikosti gela in gradiента pH, ki ju uporabimo, metoda omogoča ločevanje več kot 5.000 različnih proteinov hkrati. Metoda omogoča detekcijo manj kot 1 ng proteinov. Poleg tega lahko s to metodo ločimo tudi različne izoformne oblike proteinov ali pa oblike proteinov, ki so nastale zaradi post-translacijskih modifikacij (fosforilacija, glikozilacija). Te oblike proteinov so pogosto prepoznavne na 2-D gelu kot verige lis v horizontalni ali vertikalni osi. Končno pa lahko tako ločene proteine na gelu uporabimo za nadaljnje analize, kot so MALDI-TOF-MS, ESI-MS ali sekveniranje po Edmanu (Görg in sod., 2007).

2-D elektroforezo so v letih po uvedbi izboljševali. Prvotno so težave povzročali nestabilni gradijeni pH v gelih, zaradi česar laboratorijske analize niso bile primerljive. Klasična diferencialna proteomika je temeljila na ločeni 2-D analizi primerjanih sistemov pri karseda enakih pogojih. Kljub temu je pri primerjanju gelov pogosto prihajalo do napak, kot posledice slabe ponovljivosti izvedbe separacije in detekcije vzorcev. Število napak se je zmanjšalo ob zamenjavi tekočih amfilitov za pripravo gradienata pH v gelih za prvo dimenzijo z imobilizacijo gradienata pH v gelu samem. Imobilini so definirane kemijske molekule, ki so ko-polimerizirane z akrilamidom in skupaj tvorijo mrežo ter na ta način ustvarijo stabilno območje pH (gradient) v samem gelu (Križaj, 2008). Prvotna metoda za IEF je bila odvisna od tako imenovanih amfilitov (angl. *carrier ampholyte*), molekul, ki so vzpostavljale gradient pH. To so majhne, topne, amfoterične molekule z visoko pufersko

kapaciteto blizu njihove pI. Ko so te molekule izpostavljene visokim napetostim, so molekule (amfoliti) z največjo pI (najbolj negativen nabo) migrirale proti anodi, tiste z najmanjšo pI (najbolj pozitiven nabo) pa proti katodi. Ostali amfoliti so se razporedili v električnem polju med anodo in katodo na svoji pI. Amfoliti so vzdrževali okolje v gelu pri pripadajočem pH in tvorili pH gradient, ki pa je sčasoma postal nestabilen. Imobiliziran gradient pH so vzpostavili s kovalentno vezanimi kislimi in bazičnimi skupinami (imobilini) že v času vlivanja poliakrilamidnega gela. Splošna molekula imobilina je $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}$, kjer R predstavlja karboksilno ali amino skupino (Görg in sod., 2007).



Slika 5: Imobiliziran gradient pH v poliakrilamidnem gelu s karboksilnimi in amino skupinami (GE Healthcare, 2004)

Figure 5: Immobilized pH gradient polyacrylamide gel matrix showing attached buffering groups GE Healthcare, 2004)

Na ta način so razvili izjemno stabilne gradiente pH, ki so omogočali veliko boljšo ločljivost, saj so s to tehniko lahko vzpostavili gradient pH z zelo majhnimi razlikami ($\Delta\text{pI}=0,001$), kar je omogočalo ločevanje tudi zelo alkalnih proteinov. Uvedba gelov (trakov) z imobiliziranimi gradienti pH (IPG) je omogočila tudi nanos proteinov v večjih količinah (Bjellqvist in sod., 1982). Protokol za izvedbo 2-D elektroforeze z imobiliziranimi gradienti pH so opisali Görg in sod. (1988; 2000). Ta protokol se v veliki meri uporablja še danes, z določenimi izboljšavami in komercialno dostopnimi različnimi IPG trakovi. Prva dimenzija se izvaja na 3 mm širokih in različno dolgih (do 24 cm) IPG gelih, ki so vlti v kalup na tako imenovanem GelBond PAGfilm (Görg in sod., 2007). Danes uporabljamo predvsem komercialno dostopne trakove s posušenim gelom, ki imajo imobiliziran gradient pH (GE Healthcare, 2004). Obstajajo IPG trakovi s širšim (pH 3-10) ali ožjim (pH 4-7 (kisci proteini), pH 6-12 (bazični proteini)) gradientom pH (Ong in Pandey, 2001).

Pri gelski elektroforezi gre za ločevanje molekul, v našem primeru proteinov, na osnovi naboja in velikosti. Proteini potujejo skozi poliakrilamidni gel, ki je izpostavljen električnemu polju. Elektroforeza poteka v eksperimentalnih razmerah (bazični pH), ko so vsi proteini negativno nabiti in zato potujejo proti anodi (pozitivni elektrodi). Molekule v poliakrilamidnem gelu so prečno povezane, zato notranjost gela deluje kot mreža oz. molekulsko sito. Takšno molekulsko sito dovoljuje, da se majhne molekule gibljejo hitreje kot velike. Molekule se pri potovanju skozi gel ločujejo tako na osnovi naboja kot tudi velikosti. Pri SDS-PAGE proteine pred elektroforezo obdelamo z natrijevim dodecilsulfatom (SDS), negativno nabitim detergentom, ki ima lastnost, da veže proteine v količinah, ki so proporcionalne molekulski masi proteina. Na ta način lahko določimo

molekulsko maso proteina. Detergent SDS razbije nativno konformacijo proteina in jo sprosti v linearno obliko. Vsak protein tako pridobi približno enako razmerje med nabojem in maso ter približno enako obliko. Zaradi prisotnosti SDS tako ločevanje poteka samo na osnovi velikosti molekul. Iz prepotovanih razdalj lahko ocenimo velikost molekul (in s tem molekulsko maso) neznanega proteina. V ta namen na gel, poleg našega vzorca, nanesemo še mešanico standardnih proteinov z znanim velikostnim razredom (Boyer, 2005).

Za vizualizacijo je potrebno gele pobarvati. Gele obarvamo z barvilom, ki se specifično veže na prisotne proteine. Najpogosteje se uporablja za preparativne gele barvanje s Coomassie Brilliant blue (CBB), za analitske gele, z manjšo količino vzorca pa barvanje s srebrom nitratom, ki je bolj občutljivo. Za še večjo občutljivost se uporabljajo barvila s fluorofori, npr. SYPRO Ruby (GE Healthcare, 2004).

Identifikacijo proteinov, ločenih z eno od metod PAGE, najpogosteje izvedemo z masno spektrometrijo (MS) lahko pa tudi z Edmanovo degradacijo (Križaj, 2008).

2-D elektroforeza je zelo razširjena in uporabna metoda v proteomiki. Uporabna je kot metoda za preučevanje prisotnih oblik proteinov, kot orodje za pojasnitve interakcij z zdravili pri zdravljenju bolezni, za analizo imunoprecipitatov, za identifikacijo komponent celičnih organelov, za analizo celotnega proteoma enostavnih organizmov ter v imunoencimskih testih (Križaj, 2008; Kočevar in Komel, 2008). Kljub hitremu razvoju tehnik 2-D elektroforeze pa vendarle danes še ne obstaja standardiziran sistem 2-D elektroforeze, ki bi lahko enako natančno ločil vse vrste proteinov; hidrofilne, hidrofobne, proteine z majhno molekulsko maso, proteine z veliko molekulsko maso (López, 2007). 2-D elektroforeza ima sicer mnogo prednosti pred drugimi alternativnimi metodami, ima pa tudi nekaj pomanjkljivosti. Zaradi molekularnih procesov v celici, kot so post-translacijske modifikacije ali posledice alternativnega izrezovanja intronov, lahko nastanejo različne oblike določenega proteina. 2-D elektroforeza omogoča ločevanje različnih oblik proteina, ki nastanejo zaradi post-translacijskih modifikacij, ne pa vseh. Razvoj 2-D elektroforeze je usmerjen v pridobivanje čim večjega števila primerljivih gelov. Za doseganje primerljivih gelov je ključnega pomena priprava vzorcev ter količina nanesenih proteinov, ki določa velikost in intenziteto lise. Večje kot je število primerljivih gelov, z večjo natančnostjo lahko potrdimo ali ovržemo identiteto vizualiziranega proteina na gelu (Ong in Pandey, 2001; López, 2007).

2.5 KARAKTERIZACIJA KAZEINOV KOBILJEGA MLEKA

V zadnjem času je precej raziskav o strukturi kazeinov, izoliranih iz mleka različnih vrst (Miranda in sod., 2004; Månnsson in sod., 2005; Vincenzetti in sod., 2008). Največ tovrstnih raziskav je na področju kazeinov kravjega mleka, ki služijo kot referenčni proteini pri identifikaciji novo odkritih. Novo odkrite kazeine drugih vrst sesalcev največkrat začasno poimenujejo kar α_S , β ali κ , odvisno od izoelektrične točke, molekulske mase, aminokislinske sestave. Področje raziskav proteinov kravjega mleka pokriva American Dairy Science Association Committee z objavo novo odkritih proteinov v tako imenovanih revizijah člankov z naslovom "Nomenclature of the protein of cows' milk" (Eigel in sod., 1984; Farrell in sod., 2004), ki so mnogim raziskovalcem osnova pri njihovem delu.

Začetki ločevanja kazeinov kobiljega mleka so potekali v cilindričnih poliakrilamidnih gelih v prisotnosti SDS (Visser in sod., 1982). Visser in sod. (1982) so oborili kazeine iz kobiljega mleka tako, da so dodali HCl (do pH 4,6) in dobili precipitat kazeinov, ki so ga nadalje ločili v posamezne sub-frakcije kazeinov I, II in III. Skupni kazeini so se na gelu ločili v treh lisah, kar so potrdili z elektroforezo posameznih frakcij na posameznem gelu. Tako so ugotovili, da so kazeini z molekulskimi masami od 23.000 do 33.000 Da v frakciji I, frakcija II vsebuje proteine z molekulsko maso 30.000 Da, frakcija III pa proteine z molekulsko maso 23.000 Da. Na podlagi aminokislinske sekvene so proteine frakcije II označili kot homolog β -kazeinu kravjega mleka. β -kazein kobiljega mleka ni vseboval triptofana, vseboval pa je več arginina in alanina in manj metionina (Visser in sod., 1982).

Miranda in sod. (2004) so ločili frakcije proteinov kobiljega mleka z uporabo kombinacije metod tekočinske kromatografije RP-HPLC (angl. *reversed phase-high-performance liquid chromatography*) v prvi dimenziji in SDS-PAGE v drugi dimenziji. Dobljenim frakcijam kazeinov so določili zaporedje aminokislin po Edmanu in molekulsko maso z uporabo MS ter tako s pomočjo baze proteinov identificirali kazein. Kombinacija teh dveh metod se je izkazala kot hitra in učinkovita pri identifikaciji kazeinov kobiljega mleka. Na ta način so identificirali α_{S1} -, α_{S2} -, β - in κ -kazein, lizocim C, α -laktalbumin, in β -laktoglobulin I in II v kobiljem mleku. Ugotovili so več polimorfnih oblik α_{S1} - in β -kazeina, katerih nastanek so povezali z alternativnim izrezovanjem intronov, ki je povzročilo preskakovanje določenih eksonov (7 in 14 pri α_{S1} -kazeinu in 5 in 8 pri β -kazeinu).

Za ločevanje in karakterizacijo kazeinov kobiljega mleka se največkrat uporablja metoda izoelektričnega fokusiranja (IEF), ki ločuje kazeine glede na njihovo izoelektrično točko. Za karakterizacijo posameznih kazeinov se lahko uporablja eno-dimenzionalna PAGE v prisotnosti denaturacijskega agensa (urea ali SDS) ali dvo-dimenzionalna, kjer se kombinirata metodi urea- in SDS-PAGE ali IEF in SDS-PAGE. V primeru kombinacije IEF in SDS-PAGE se najprej izvede IEF (prva dimenzija). V drugi dimenziji se kazeini ločijo po velikosti glede na molekulsko maso (Egito in sod., 2002).

Egito in sod. (2002) so preizkusili obe kombinaciji 2-D elektroforeze za ločevanje kazeinov kravjega in kobiljega mleka. S plinsko kromatografijo so najprej ločili skupne kazeine na posamezne frakcije. Posamezne frakcije so nadalje ločili s HPLC in tako dobili štiri podfrakcije. Te štiri podfrakcije so nadalje ločili z urea-PAGE. V primeru ločevanja kazeinov kobiljega mleka na gelu urea-PAGE so dobili najmanj 12 lis, ki so jih razdelili v

sedem razredov glede na ločljivost posamezne frakcije. V primeru ločevanja kazeinov kravjega mleka na gelu urea-PAGE pa so dobili le eno liso. Po prenosu na membrano PVDF so posamezne lise tudi identificirali s pomočjo sekvenciranja N-terminalnega konca. Več lis znotraj posamezne frakcije so povezali z različnimi stopnjami fosforilacije v primeru β - in α_{S1} -kazeina in z različnimi stopnjami glikozilacije v primeru κ -kazeina. Ko so kombinirali urea-PAGE z SDS-PAGE so ugotovili povezavo med lisami iz urea-PAGE in lisami, ki so jih dobili z SDS-PAGE. Po barvanju gela SDS-PAGE z metodo PAS so potrdili tudi glikozilirane oblike κ -kazeina. Ko so kombinirali IEF in SDS-PAGE so ugotovili tudi različne izoelektrične variante pri posameznih frakcijah kazeinov. Ugotovili so, da kombinacija plinske kromatografije in HPLC že omogoči osnovno ločevanje frakcij α_{S1} - in β -kazeina v kobiljem mleku. Tako kot β -kazein kravjega mleka, je tudi β -kazein kobiljega mleka občutljiv za plazmin. Z encimsko hidrolizo nastanejo fragmenti, podobni γ -kazeinom in peptidi podobni PP5. S kombinacijo urea-PAGE in SDS-PAGE so izboljšali ločljivost posameznih frakcij kazeinov (α_{S1} - in β -kazein), oz. glikozilacijskih stopenj (κ -kazein). Kombinacija IEF in SDS-PAGE je pokazala, da imajo variante posameznega kazeina pri kazeinih kobile manjšo izoelektrično točko ($=4,2$), kot v primeru kazeinov kravjega mleka ($=4,6$). S temi metodami so ločili in kasneje identificirali α_{S1} -, β - in κ -kazein kobiljega mleka, niso pa identificirali α_{S2} -kazeina, verjetno zaradi premajhne količine (Egito in sod., 2002).

2.5.1 Karakterizacija fosforilacijskih oblik β -kazeina kobiljega mleka

Na gelih urea-PAGE in 2-D elektroforeze je značilna slika β -kazeina kobiljega mleka, ki kaže več lis oz. pik. Ta kompleksnost β -kazeina kobiljega mleka je posledica različnih stopenj fosforilacije, kar se kaže na gelu kot več pik na različnih izoelektričnih območjih. Več fosforilacijskih stopenj β -kazeina so potrdili tudi pri β -kazeinu človeškega mleka, ki naj bi vseboval od nič do pet fosfatnih skupin (Sood in sod., 2002).

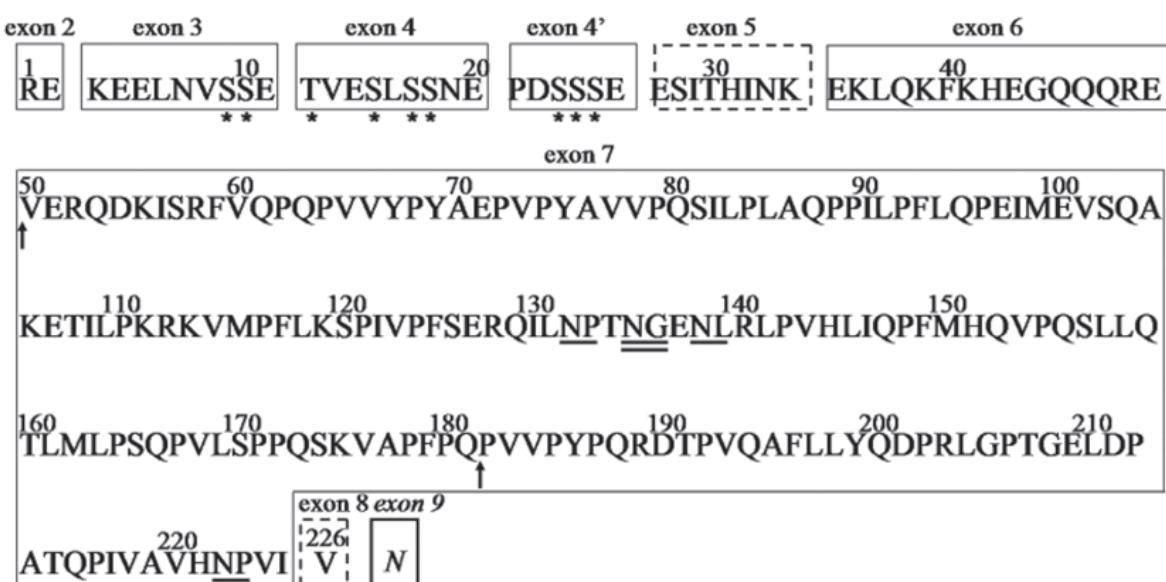
Za β -kazein kobiljega mleka so značilne različne genetske variente, pa tudi različne fosforilacijske oblike, ki lahko vsebujejo od 3 do 7 fosfatnih skupin. Posamezne fosforilacijske oblike β -kazeina kobiljega mleka označimo z xP , kjer x predstavlja število fosfatnih skupin, vezanih na protein, P pa predstavlja oznako za fosfatno skupino. Z metodo masne spektrometrije LC-ESI-MS so potrdili pet različnih fosforilacijskih oblik β -kazeina kobiljega mleka za vsako od variant β -kazeina, ki se med sabo razlikujejo za približno 80 Da (od 25.755 Da do 26.073 Da) (Girardet in sod., 2006). Velikostni razred 80 Da sovpada z molekulsko maso enega fosfatnega ostanka. Za natančnejšo določitev stopnje fosforilacije posamezne oblike β -kazeina kobiljega mleka je potrebna encimska defosforilacija (s kislo in bazično fosfatazo), kjer se odcepijo fosfatne skupine. Pri popolnoma defosforilirani obliki β -kazeina (β -kazein-0P) so na gelu urea-PAGE dobili dve lisi. Dvojno liso so povezali s spontanim procesom deamidacije Asn/Gln, značilnim za β -kazein kobiljega mleka. Najmanjšo molekulsko maso (25.755 Da) so povezali z 3P obliko β -kazeina kobiljega mleka (β -kazein 3P). Stopnja fosforilacije ostalih oblik β -kazeina kobiljega mleka je variirala od 4P do 7P (Girardet in sod., 2006). Z 2-D elektroforezo so nato določili še izoelektrične točke, ki so bile 6,15; 5,63; 5,44; 5,30; 5,17; 5,02; 4,88; in 4,74 za fosforilacijske oblike β -kazeina kobiljega mleka od 0P do 7P. Te fosforilacijske

oblike so na 2-D gelu predstavljale verigo lis na območju 32 kDa in verigo lis na območju 30 kDa. Predpostavili so, da fragmenti (različne oblike β -kazeina zaradi različne stopnje fosforilacije) na območju 32 kDa pripadajo varianti β -kazeina, ki vsebuje ekson 5 (β -kazein - varianta A), (E²⁷SITXINK³⁴, X = H ali R) (Miranda in sod., 2004). Fragmenti na območju manjše molekulske mase (30 kDa) predstavljajo varianto β -kazeina, brez eksona 5 (β -CN^{Δ5}). Glede na relativno pozicijo posamezne lise, ki je predstavljala fosforilacijsko obliko β -kazeina, glede na gradient pH, so bile lise pri varianti β -CN^{Δ5} (pike na območju manjše molekulske mase) bližje anodi. Zaradi manjkajočega zaporedja eksona 5 je varianta β -CN^{Δ5} bolj kisla (teoretična pI=5,63 za β -CN^{Δ5} in pI=5,78 za β -CN), posledično so lise te variante nekoliko bližje anodi. Prisotnost najmanj petih oz., največ sedmih fosfatnih skupin v kazeinu sovpada s primarno strukturo β -kazeina kobiljega mleka. β -kazein kobiljega mleka namreč vsebuje šest serinskih ostankov (Ser⁹, Ser¹⁵, Ser¹⁸, Ser²³, Ser²⁴ in Ser²⁵), lociranih na Ser-Xxx-Glu/SerP (SerP je fosfoserinski ostanek) in en serinski ostanek (Ser¹⁷) lociran na Ser-Xxx-Xxx-Glu. Vzrok za veliko serinskih ostankov v β -kazeinu kobiljega mleka je ekson 4, ki je specifičen za β -kazein kobile, le ta pa vsebuje veliko SerP (Girardet in sod., 2006).

V kobiljem mleku so že identificirali α_{S1} -kazein, β -kazein in κ -kazein, medtem ko α_{S2} -kazein še ni bil karakteriziran. Pri β -kazeinu so identificirali tri oblike. Dolgo obliko β -kazeina (*full-length*) so identificirali v mleku kobil pasme haflinger (Girardet in sod., 2006), druga oblika β -CN^{Δ5} izhaja iz mRNA brez eksona 5 (posledica alternativnega izrezovanja eksona) (Miranda in sod., 2004) in tretja oblika, kjer manjka 75 % eksona 7 (Lenasi in sod., 2006). V mleku kobil pasme lipicanski konj so Lenasi in sod. (2006) ugotovili prisotnost še ene oblike mRNA, kjer manjkata oba eksona, ekson 5 in ekson 8. Kljub odkritju nove oblike mRNA pa protein v mleku še ni bil identificiran (Matéos in sod., 2010).

2.5.2 Karakterizacija deamidirane oblike β -kazeina

β -kazein je podvržen neencimatski deamidaciji, ki poteče spontano med inkubacijo na 37 °C in pri nekoliko bazični vrednosti pH (7,6). Omenjena deamidacija Asn ostanaka (odcepi se NH₃) je ena izmed glavnih poti za razgradnjo peptidov in proteinov. Predvsem je znano, da zlahka poteče deamidacija na sekvenci Asn-Gly. Zaporedje Q¹²⁹ILNPTDGENLR¹⁴⁰ je prisotno v deamidirani obliki β -kazeina, zaporedje Q¹²⁹ILNPTNGENLR¹⁴⁰ pa je prisotno v naravnih oblikah β -kazeina. Zaradi spontane deamidacije β -kazeina kobiljega mleka je njegova karakterizacija otežena. β -kazein kravjega in človeškega mleka ne vsebuje Asn-Gly sekvence, zato tam deamidacija ne poteče spontano (Matéos in sod., 2009a).



Slika 6: Eksonска struktura β -kazeina (Miranda in sod., 2004). Možna mesta fosforilacije so označena z zvezdico. Mesto neencimske deamidacije je dvojno podčrtano. Hipotetična mesta za možnost deamidacije so podčrtana enojno. Eksona, ki se alternativno vključujejo v zrelo mRNA, sta v črtkanem okvirju.

Figure 6: Exon modular structure of equine β -casein (Miranda et al., 2004). The putative phosphorylation sites are indicated with an asterisks. The nonenzymatic deamidationsite is double underlined. Other hypothetical deamidation sites, which would undergo peptide bond cleavage are single underlined. The exons that can be alternatively spliced are framed with a dotted line.

Urea-PAGE in 2-D profil β -kazeina kobiljega mleka je težko interpretirati zaradi kompleksnosti proteina, saj obstajajo različne variente, ki so posledica različne stopnje fosforilacije ali pa so posledica alternativnega izrezovanja eksonov ali kombinacija obojega. Poleg vseh teh možnih variant obstaja še možnost deamidacije kazeina (Matéos in sod., 2009a).

Matéos in sod. (2009a) so preučevali proces deamidacije β -kazeina kobiljega mleka s poskusom *in vitro*. Posamezne fosforilacijske variante β -kazeina (5P in 6P), frakcionirane s pomočjo metode IEC (angl. *ion-exchange chromatography*), so raztopili v 150 mM pufru PBS. Tako pripravljeni raztopini β -kazeina 5P in 6P so inkubirali pri 37 °C ter povzročili spontano neencimsko deamidacijo. Vzorce so nato preučevali *in vitro*. Končno so s pomočjo urea-PAGE in 2-D elektroforezo ločili naravno in deamidirano obliko β -kazeina. Pri pogojih, kot je nekoliko bazičen pH (7,4) in temperaturi 37 °C je bilo več kot polovica β -kazeina 5P in 6P deamidirana v 48 urah. Deamidacija je posledica odprte strukture kazeina, zaradi česar je ta manj stabilen oz. bolj občutljiv za proteolitično razgradnjo. Deamidacijo lahko preprečimo tako, da rehidracijo trakov IPG in metodo IEF izvajamo pri temperaturi 10 °C namesto pri sobni temperaturi (Matéos in sod., 2009a).

Preglednica 7: Molekulske mase (M_r) posameznih fosforilacijskih oblik β -kazeina identificiranih z LC/ESI-MS (angl. *liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry*) (Matéos in sod., 2009a)

Table 7: molecular masses (M_r) of the different ion-exchange chromatography subfractions of equine β -casein determined by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (Matéos et al., 2009a).

Frakcija	Ocenjena M_r	Identifikacijska oznaka fosforilacijske variante β -CN	Teoretična M_r
F2.1	25.832	β -CN 4P	25.831
	25.751	β -CN 3P	25.751
	24.908	β -CN ^{Δ^x} 4P	24.908
F2.2	25.831	β -CN 4P	25.831
	24.908	β -CN ^{Δ^x} 4P	24.908
F2.3	25.911	β -CN 5P	25.911
	25.832	β -CN 4P	25.831
	24.988	β -CN ^{Δ^x} 5P	24.988
F2.4	25.991	β -CN 6P	25.991
	25.912	β -CN 5P	25.911
	25.069	β -CN ^{Δ^x} 6P	25.068
F2.5	26.072	β -CN 7P	26.071
	25.991	β -CN 6P	25.991
	25.151	β -CN ^{Δ^x} 7P	25.148

$M_r \pm 1 (\pm 3 \text{ znotraj } \beta\text{-CN}^{\Delta^x} 7P); \Delta^x = \text{delecijska regija kodirana z eksonom X; P = fosfatna skupina}$

$M_r \pm 1 (\pm 3 \text{ with } \beta\text{-CN}^{\Delta^x} 7P); \Delta^x = \text{deletion of the region encoded by exon X; P = phosphate group}$

2.6 ALERGIJA NA PROTEINE KRAVJEGA MLEKA

Alergija na kravje mleko (CMA; angl. *cow milk allergy*) je pogosta bolezen pri otrocih. Pojavlja se najpogosteje v zgodnjem otroštvu, do starosti treh let. V primerih, kjer novorojenčka ne moremo prehranjevati z materinim mlekom, je pogosto poleg komercialnih nadomestkov mleka (otroške formule) prvo nadomestilo ravno kravje mleko. Grobo oceno o pogostnosti alergij na kravje mleko so opravili s pomočjo telefonske ankete v državah po Evropi, kjer je več kot 5 miljonov ljudi potrdilo znake alergij na kravje mleko (Fiocchi in sod., 2010). V raziskavi z bolj znanstvenim pristopom so simptome alergij najpogosteje potrdili pri predšolskih (0,6 % - 2,5 %), šolskih otrocih in mladostnikih (0,3 %) in manj kot 0,5 % pri odraslih ljudeh (Hochwallner in sod., 2014). Høst in Halken (2014) v svojem preglednem članku ocenjujeta, da je delež alergij na kravje mleko (v obdobju zgodnjega otroštva) v razvitih državah 2-3 %. O geografski razširjenosti CMA težko povzamemo natančne podatke, saj se raziskave med seboj zelo razlikujejo, predvsem v merilih diagnosticiranja. Z namenom, da bi poenotili metode diagnosticiranja in prepoznavanja alergij so v letu 2005 začeli s projektom EuroPrevall (Kummeling in sod., 2009). V osmih državah po Evropi so vzpostavili diagnostične centre ter začeli spremljati razširjenost alergij na hrano z identičnimi diagnostičnimi metodami (Kummeling in sod., 2009). Vse alergije, povezane s hrano, so potrdili z metodo DBPCFC (angl. *double blind placebo controlled food challenge*). Vključene so bile države z različnim socialnim statusom ter iz območij, ki so se razlikovala v podnebnih značilnostih. Tako so pokrili območja z alpskim vplivom podnebja (Švica), mediteranskim (Španija, Grčija), področja iz centralne Evrope (Bolgarija, Poljska, Litvanija), na severu Islandijo in obmorsko Nizozemsko. Kasneje so se priključile še Nemčija, Italija in Velika Britanija. Delež otrok s CMA se je gibal od 0 % do 1,3 % (Schoemaker in sod., 2015). V Grčiji niso potrdili nobenega primera s CMA, sledile so Litvanija (0,23 %), Nemčija (0,28 %), Italija

(0,30 %), Poljska (0,60 %), Islandija (0,62 %), Španija (0,69 %), Nizozemska (1,08 %) in Velika Britanija (1,26 %) (Schoemaker in sod., 2015). V večini primerov klinični znaki alergije s starostjo otrok izzvenijo. Poročajo, da pri okoli 45-50 % primerov alergija izzveni že v prvem letu starosti, pri 60-75 % v drugem letu starosti in pri 85-90 % v tretjem letu starosti (Hochwallner in sod., 2014). Razširjenost bolezni se povečuje, saj je vedno manj otrok dojenih in vedno več takih primerov, kjer v prehrani dojenčkov uporabljajo kravje mleko kot nadomestek materinemu. Potreba po iskanju alternative kravjemu mleku je sprožila več raziskav, namenjenih identifikaciji primernega vira proteinov za otroke, alergične na kravje mleko (Restani in sod., 1999; Businco in sod., 2000; Bernard in sod., 2000; El-Agamy in sod., 2009).

Pri alergijah na hrano so vključeni imunski mehanizmi, med katerimi imajo pomembno vlogo protitelesa razreda E (IgE). Alergijski simptomi, povezani s preobčutljivostjo na proteine kravjega mleka, se kažejo v treh različnih imunskeih mehanizmih. Najpogosteje (50 do 70 %) so reakcije na koži (urtikaria), pogoste (50 do 60 %) so motnje v prebavnem traktu (slabost, bruhanje, diarea), lahko pa je prizadet dihalni sistem (astma; 20 do 30 %) (Fiocchi in sod., 2010; Høst in Halken, 2014). Diagnozo za alergijo na proteine kravjega mleka lahko potrdijo z različnimi kožnimi in krvnimi testi, kot so vodni test (angl. *skin prick test*; SPT), provokacijski tets, imunoencimski test (*enzyme linked immuno-sorbent assay*; ELISA). Kožni testi so pozitivni le v primerih, kjer je mediator imunosti IgE, pri ljudeh, ki imajo zakasnelo imunsко reakcijo, kožni test ne pokaže pozitivnega rezultata, čeprav gre za alergijo. Alergij zakasnelega tipa je pri otrocih več kot 60 %. S krvnimi testi merijo koncentracijo prisotnih protiteles (IgE) v serumu ljudi, alergičnih na kravje mleko (Cantisani in sod., 1997; Høst in Halken, 2014).

Alergijski simptomi se lahko pojavijo takoj po zaužitju, to je t.i.m. takojšnja imunska reakcija (angl. *immediate reaction type*) ali v nekaj dneh po zaužitju, t.i.m. zakasnela imunska reakcija (angl. *delayed reaction type*). Bolezen lahko poteka s kliničnimi znaki, ki so posledica protitelesnih imunskeih reakcij (angl. *IgE-mediated*) ali celičnih imunskeih reakcij (angl. *cell-mediated*). Reakcije, ki nastanejo v okviru takojšnje imunske reakcije, so povezane s protitelesi IgE in povzročajo reakcije na koži, respiratorne simptome, v nekaterih primerih tudi anafilaktično reakcijo. Reakcije, ki se pokažejo šele čez nekaj ur ali dni v okviru zakasnele imunske reakcije pa so posledica delovanja celic T (El-Agamy, 2007; Høst in Halken, 2014). V različnih raziskavah najdemo podatke o razvrščanju bolnikov glede na njihov protitelesni imunske odziv (Sletten in sod., 2007; Fiocchi in sod., 2010). Najpogosteje je delitev bolnikov glede na simptome ob reakciji, ki jih povezujejo z vsebnostjo IgE (Sletten in sod., 2007). Ob zaključku raziskave, opravljene v okviru EuroPrevall projekta, so pri večini otrok zasledili simptome kožnih reakcij v obliki koprivnice (66,7 %), pordečelete kože (42,9 %), izpuščajev (11,9 %) in angioedema-otekline mehkih tkiv, kot so ustnice, jezik, grlo, črevesna sluznica (9,5 %). Motnje v prebavnem traktu so se pokazale kot pogoste, saj so pri 9,5 % otrok zasledili bruhanje in pri 2,4 % tudi diarejo. Zabeležili so dihalne težave pri 9,5 % otrok ter vnetja očesnih sluznic pri 11,9 % otrok (Schoemaker in sod., 2015).

Sletten in sod. (2007) so na podlagi kliničnih simptomov bolnikov, alergičnih na kravje mleko, ter na podlagi vsebnosti IgE v serumu, bolnike razdelili v štiri skupine. Bolnike s takojšnjo imunsko reakcijo (*IgE-mediated patients*) so razvrstili v dve skupini, na tiste z

visokimi vsebnostmi specifičnih IgE ($>0,35$ kU/l) in pozitivnim kožnim testom (angl. *reactive IgE-mediated patients*), ter na tiste z manjšimi vsebnostmi IgE ($<0,35$ kU/l) in negativnim kožnim testom (angl. *tolerized IgE-mediated patients*). Pri bolnikih z zakasnelo imunsko reakcijo (angl. *non IgE-mediated patients*) je bila vsebnost specifičnih IgE pri 11 od 14 bolnikov manjša od 0,35 kU/l (pri dveh bolnikih je bila vsebnost specifičnih IgE=2 kU/l ter pri enem 0,5 kU/l). Bolnike z zakasnelo imunsko reakcijo so razvrstili v dve skupini na podlagi simptomov, ki so se v tej skupini kazali v obliki diareje (angl. *reactive non IgE-mediated patients*), ali pa simptomov ni bilo (angl. *tolerized non IgE-mediated patients*).

Poleg IgE so preučevali tudi vsebnosti nekaterih drugih imunoglobulinov (Ig) v serumu bolnikov, alergičnih na kravje mleko, kot so IgG, IgG₁, IgG₄ in IgA (Sletten in sod., 2007). Ko so primerjali reaktivnost posameznih Ig z α_{S1-} , β - in κ -kazeinom so ugotovili, da imajo pacienti s takojšnjo imunsko reakcijo 160 x večjo vsebnost specifičnih protiteles IgE za kazein v primerjavi z tolerantnimi bolniki s takojšnjo imunsko reakcijo ter 200 x večjo vsebnost protiteles IgE specifičnih za kazein v primerjavi s kontrolno skupino bolnikov. Poleg povečane vsebnosti specifičnih protiteles IgE pri bolnikih s takojšnjo imunsko reakcijo so ugotovili tudi povečane vsebnosti IgG₁ (10x več kot v skupini tolerantnih pacientov) in IgG₄ (11 x več kot v skupini tolerantnih bolnikov). V skupini bolnikov z zakasnelo imunsko reakcijo so se pokazale povečane vsebnosti IgG₁ (8x večja vsebnost), IgG₄ (6x večja vsebnost) in tudi 3,5 x večja vsebnost za α -kazein specifičnih IgE v primerjavi s kontrolno skupino. Povečanje protiteles IgG₁, IgG₄ in IgE je bilo v skupini bolnikov z zakasnelo imunsko reakcijo precej manjše v primerjavi s povečanjem teh protiteles v skupini bolnikov s takojšnjo imunsko reakcijo. V obeh skupinah tolerantnih pacientov (tolerantni pacienti znotraj skupine s takojšnjo imunsko reakcijo in tolerantni pacienti znotraj skupine z zakasnelo imunsko reakcijo) so ugotovili tudi povečane vsebnosti protitesles IgA. Specifičnim protitesom IgA so pripisali varovalno vlogo. Rezultat zmanjšanja za kazein specifičnih IgE in IgG v skupini tolerantnih pacientov je prevladovanje protites IgA ter temu primerno večje razmerje IgA/IgE (Sletten in sod., 2007).

2.6.1 Alergeni kravjega mleka

Alergeni so snovi, ki povzročajo alergijske reakcije. Med alergene snovi prištevamo tudi proteine kravjega mleka (antigen). Rekcija med antigenom in ustreznim protitesom je medsebojno vezanje obeh in v primerih, ko je antigen alergen, je to alergijska reakcija. Protitesa se vežejo samo s specifičnim delom makromolekule, ki jo imenujemo antigenska determinanta ali epitop. Med naravne antigene prištevamo proteine. O njihovih epitopih, ki jih je navadno veliko na eni molekuli, je znanega zelo malo. K poznavanju imunskega odziva so v največji meri prispevala ravno preučevanja proteinskih antigenov. Pri proteinskih antigenih so ocenili, da linerana determinanta, ki se veže s specifičnim protitesom, obsega približno šest aminokislin. Epitopi, ki jih spoznajo celice B, (B-celični epitopi) so odvisni od prostorske in linerane porazdelitve aminokislin na izpostavljenih mestih polipeptidne verige. Epitopi, ki jih spoznajo celice T (T-celični epitopi) pa izhajajo iz notranjosti molekule proteina (Vozelj, 2000).

Kravje mleko vsebuje okoli 20 proteinov, potencialno prepoznavnih kot alergeni. To so predstavniki sirotkinih proteinov kot tudi kazeinov (Preglednica 7). Glavni alergeni so izmed kazeinov α_{S1} - in β -kazein in izmed sirotkinih proteinov α -laktalbumin ter β -laktoglobulin. Ljudje so na določene proteine občutljivi zelo različno, predvsem zaradi specifičnosti protiteles (IgE) in njihove afinitete (intenziteta vezanja na antigen) (Hochwallner in sod., 2014). V večini primerov gre za bolnike, občutljive za različne kazeine. Čeprav je homolognost amino kislinskega zaporedja med človeškimi in kravjimi kazeini kar 90 % je aleregenost kravjih kazeinov precej visoka. Alergenost kravjega mleka je odvisna tudi od razmerja med kazeini in sirotkinimi proteini, zato predpostavlja, da bi alergenost kravjega mleka lahko zmanjšali tudi z modifikacijo tega razmerja (Lara-Villoslada in sod., 2005).

Na kazeinih kravjega mleka so našli štiri epitope, ki vežejo protitelesa IgE (dva epitopa na α_{S1} -kazeinu, en epitop na α_{S2} -kazeinu in en epitop na κ -kazeinu). Ta vezavna mesta za IgE so bila pri α_{S1} -kazeinu na območju aminokislinskega zaporedja od 123-132, pri α_{S2} -kazeinu na območju 171 do 180 in pri κ -kazeinu na območju od 155 do 164. Poznana so tudi zaporedja aminokislin na epitopih, ki jih prepoznajo IgE na α -La (štiri mesta) in na β -Lg (sedem mest) (Jarvinen in sod., 2002).

Preglednica 8: Glavni predstavniki alergenov v kravjem mleku ter nekatere značilnosti (Hochwallner in sod., 2014)

Table 8: Main characteristics of cows milk allergens (Hochwallner et al., 2014)

	Ime alergena	Protein	Vsebnost (g/L)	Velikost (kDa)	Št. amino kislín	pI	Prevalenca (%) obolelih)	Aktivnost alergena (%) obolelih)
Sirotkini Proteini (20 %) (≈5g/L)	Bos d 4 Bos d 5 Bos d 6 Bos d 7	α -La β -Lg BSA Immunog. Laktoferin	1-1,5 3-4 0,1-0,4 0,6-1 0,09	14,2 18,3 66,3 160 80	123 162 582 /	4,8 5,3 4,9-5,1 /	0-67 13-62 0-76 12-36 0-35	12 19 1 /
Kazeini (80 %) (≈30 g/L)	Bos d 9 Bos d 10 Bos d 11 Bos d 12	α_{S1} -kazein α_{S2} -kazein β -kazein κ -kazein	12-15 3-4 9-11 3-4	23,6 25,2 24 19	199 207 209 169	4,9-5 5,2-5,4 5,1-5,4 5,4-5,6	/	26 /

Alergeni potencial β -Lg povezujejo z njegovo visoko stabilnostjo v kravjem mleku. Stabilnost je posledica prisotnih disulfidnih vezi, ki preprečujejo proteolitično razgradnjo ali hidrolizo. Poleg tega pa β -Lg v človeškem mleku ni prisoten, zato zato tudi nimamo nobene primerjave (Hochwallner in sod., 2014).

Bolj pomemben alergen, kot β -Lg je α -La. α -La je (14 kDa) kisel protein, ki veže Ca^{2+} , monomerne oblike in stabiliziran s širimi disulfidnimi vezmi. Ima regulatorno vlogo v galaktoziltransferaznem sistemu pri sintezi lakteze. Vzpostavi lahko medsebojno interakcijo z lipidnimi membranami, stearinsko in palmitinsko kislino. Sekvenčna analiza je pokazala visoko homologijo (75 %) med α -La človeškega in kravjega mleka. IgE

prepoznavajo epitope na α -La, ki se nahajajo večinoma na N- in C-terminalnem koncu proteina. Oba konca sta locirana v bližnji soseščini, na površini proteina in tvorita močno IgE reaktivno območje (Hochwallner in sod., 2014).

Vpliv nekaterih alergenov v mleku lahko izničimo, če mleko segrevamo na višje temperature. Segrevanje namreč lahko pomembno vpliva na strukturo proteinov ali pa vpliva na kemijske modifikacije proteinov, kar povzroči manjšo možnost vezave specifičnih IgE na posamezne proteine in posledično vpliva na manjšo alergenost mleka (Taheri-Kafrani in sod., 2009; Morisawa in sod., 2009; Restani in sod., 2009). Zaradi segrevanja sirotkinih proteinov na 100 °C do 115°C za 30 min se pri morskih prašičkih niso več pojavljali znaki alergij in ni bilo več anafilaktične reakcije (Heppell in sod., 1984). Nasprotno pa pri segrevanju kozjega mleka na 100 °C za 30 min niso izničili vpliva alergenosti za α -La in β -Lg (El-Agamy, 2007). V primeru kravjega mleka je segrevanje zmanjšalo alergenost β -Lg zaradi sprememb na epitopih, ki jih spoznajo celice B, ni pa zmanjšalo alergenost α -kazeina, za katerega je značilna odpornost proti visokim temperaturam (Morisawa in sod., 2009). Zaradi segrevanja je prišlo do denaturacije β -Lg, kar je povzročilo konformacijsko spremembo, zaradi katere je prišlo do sprememb na epitopih, ki jih prepoznajo celice B (Morisawa in sod., 2009; Restani in sod., 2009). Porušenje konformacije proteina z denaturacijo ne prizadene epitopov, ki jih spoznajo celice T, zaradi česar segrevanje ni najboljša izbira tehnologije, s katero bi lahko zmanjšali alergenost nekega proteina oz. mleka. Vsekakor pa segrevanje ne more biti dobra alternativa za zmanjšenje alergenosti mleka, saj s segrevanjem na visoke temperature zmanjšamo prehransko vrednost živila (Restani in sod., 2009).

Poleg segrevanja mleka so imunogenost skušali zmanjšati tudi z encimatsko razgradnjo polipeptidnih verig. Izkazalo se je, da v procesu proteolitične razgradnje nastanejo novi alergeni, živilu pa se poslabšajo senzorične lastnosti, kot je vonj, okus in aroma. Pri razgradnji s pepsinom ali pepsinom in tripsinom nastanejo peptidi, ki vežejo IgE (Restani in sod., 2009).

2.6.2 Kobilje mleko kot alternativa kravjemu mleku

Sestava človeškega mleka je drugačna od sestave mleka drugih vrst sesalcev, tako v razmerju kot tudi v zgradbi osnovnih sestavin. Vsebnost proteinov je v človeškem mleku manjša kot v mleku prežvekovalcev, vendar zelo podobna vsebnosti proteinov v osličjem in kobiljem mleku (El-Agamy in sod., 1997). Delež kazeinov znotraj skupnih proteinov je v človeškem mleku manjši, delež sirotkinih proteinov pa večji v primerjavi s kravjim ali ovčjim mlekom. Človeško mleko je, glede na delež kazeinov in sirotkinih proteinov, bolj podobno kobiljemu in osličjemu mleku. Večja podobnost po sestavi in zgradbi osnovnih sestavin človeškega mleka z osličjim, kobiljim in kameljim mlekom te tri vrste mleka uvršča med možne alterative kravjemu mleku v prehrani dojenčkov in otrok (Businco in sod., 2000).

Glavni predstavniki sirotkinih proteinov v kravjem mleku so β -Lg (55 %), α -La (20 %) in BSA (7 %) glede na delež skupnih proteinov sirotke. Ti proteini se razlikujejo v zgradbi in deležih med vrstami. V človeškem mleku β -Lg še niso identificirali, le ta pa je eden od najbolj pogostih alergenov v kravjem mleku (El-Agamy in sod., 1997). El-Agamy in Nawar (2000) sta ugotovila, da kamelje mleko ne vsebuje β -Lg. Za razliko od človeškega

in kameljega mleka, pa kobilje mleko vsebuje β -Lg. Kljub dejству, da je β -Lg prisoten v kobiljem mleku in je poleg tega tudi potencialen alergen, je kobilje mleko vendarle prepoznamo kot manj alergeno (Businco in sod., 2000).

Pri preučevanju oz. prepoznavanju vezave protiteles (IgE iz seruma otrok, ki so občutljivi za proteine kravjega mleka) na posamezne proteine (angl. *cross-reactivity between proteins different species*) različnih vrst mleka so reakcije potrdili v primeru ovčjega, kozjega in bivoljega mleka. Nekoliko slabšo reakcijo so prepoznali v primeru proteinov kobiljega in osličjega mleka. Nobene reakcije pa niso zaznali v primeru proteinov kameljega mleka (Restani in sod., 1999). Protitelesa IgE iz seruma otrok, alergičnih na ovčje mleko, niso prepoznala proteinov iz kameljega mleka. El-Agamy in sod. (1997) so raziskovali imunološke reakcije proteinov človeškega mleka in proteinov kozjega, ovčjega, kravjega, bivoljega, kameljega, osličjega in kobiljega mleka. Ugotovili so podobnosti med kazeini človeškega mleka in kazeini osličjega in kobiljega mleka, nekoliko manjša je bila podobnost s kozjim in kameljim mlekom, nobene imunološke podobnosti pa niso ugotovili med proteinimi kravjega, bivoljega in ovčjega mleka.

Zelo malo je raziskav, v katerih bi ugotavliali morebitno alergenost kobiljega mleka pri otrocih, ki so bili alergični na proteine kravjega mleka (Businco in sod., 2000). Businco in sod. (2000) so v raziskavo vključili 25 otrok, ki so imeli alergijo na proteine kravjega mleka. Za namen potrditve takojšnje imunske reakcije so pri vseh otrocih izvedli kožni vbodni test, kjer so uporabili pasterizirano sveže kravje in kobilje mleko. Za ločevanje proteinov iz kravjega in kobiljega mleka so uporabili metodo SDS-PAGE, ter tako ločili proteine glede na njihovo molekulsko maso. Z imunoencimskim testom so ugotavliali morebitne reakcije med specifičnimi protitelesi IgE iz seruma otrok z različnimi proteini kravjega ali kobiljega mleka. Kožni test je bil v primeru nanosa kravjega mleka pozitiven pri vseh otrocih, v primeru nanosa kobiljega mleka pa le pri 2 od 25 otrok. V primeru kravjega mleka so nekateri proteini močno reagirali s specifičnimi človeškimi protitelesi IgE. Pri 72 % otrok so ugotovili pozitivno reakcijo med človeškimi protitelesi IgE in α -laktalbuminom kravjega mleka. Pri 68 % otrok so pozitivno reakcijo potrdili tudi v primeru β -laktoglobulina in kazeinov kravjega mleka. Ko so serume testirali še s kobiljim mlekom, je bil delež pozitivnih reakcij veliko manjši. Pri 24 % otrok so ugotovili pozitivno reakcijo med človeškim IgE in α -laktalbuminom ali β -laktoglobulinom kobiljega mleka. V primeru kazeinov kobile so pozitivno reakcijo potrdili le pri 20 % otrok. Zaključili so, da bi lahko bilo kobilje mleko primerna alternativa kravjemu mleku v 76 % primerov otrok, alergičnih na proteine kravjega mleka. Manjšo alergenost kobiljega mleka pri otrocih, ki so alergični na kravje mleko, so pripisali predvsem razlikam v zaporedju aminokislin med proteinimi kravjega in proteini kobiljega mleka. Zaporedja aminokislin epitopov na proteinih kobiljega mleka so namreč lahko popolnoma drugačna ali pa določenih zaporedij v epitopu sploh ni, če jih primerjamo s proteinimi kravjega mleka (Businco in sod., 2000).

Poleg kobiljega mleka je primerna alternativa tudi kamelje mleko. Morebitne antigenske podobnosti med kravjimi in kameljimi proteini so preučevali z različnimi imunološkimi metodami (El-Agamy in sod., 2009). Z metodo Western blot so s kunčjim imunskim serumom proti kameljim kazeinom detektirali vse frakcije kazeinov kameljega mleka. V primeru kazeinov kravjega mleka reakcije niso zaznali. Avtorji menijo, da rezultati kažejo na popolnoma drugačno strukturo kazeinov kameljega in kravjega mleka. Enako so

ugotovili tudi za sirotkine proteine. V nadaljevanju raziskave so z metodo ELISA preučevali ali IgE iz serumov otrok, alergičnih na kravje mleko, prepoznamo vezavna mesta na alergenih kameljega in kravjega mleka. Proteini kravjega mleka so v veliki meri reagirali z IgE, prisotnimi v serumu. V primeru kazeinov kravjega mleka je bilo od 41 % do 83 % reakcij, v primeru sirotkinih proteinov pa 23 % do 59 %. V primeru proteinov kameljega mleka (tako kazeinov kot sirotkinih proteinov) ni bilo nobene reakcije z IgE iz serumata otrok, alergičnih na kravje mleko.

V raziskavi Spuergin in sod. (1997) so preučevali povezavo med α -kazeinom kozjega, ovčjega in kravjega mleka ter njihovim alergijskim potencialom. V primeru preiskave serumata otrok, alergičnih na proteine kravjega mleka, so ugotovili signifikantno večje količine IgE in IgG, ki so se vezali na α -kazein ovčjega in kozjega mleka. S tem so potrdili hipotezo, da ovče in kozje mleko nista vedno primerni alternativi kot nadomestilo kravjemu mleku v prehrani otrok. Spet v drugi raziskavi so potrdili reakcijo med protitelesi in epitopi na kazeinah kozjega in človeškega mleka (El-Agamy, 2007). Bevilacqua in sod. (2001) so ugotovili, da polimorfizmi v cDNA za določen protein vplivajo na razvoj alergijskih stanj. Kozje mleko z α_{S2} -kazeinskim genotipom je povzročalo manj črevesnih obolenj in sistemskih občutljivosti pri morskih prašičkih (*Cavia porcellus*), kot pa kozje mleko z α_{S1} -kazeinskim genotipom. Alergijske odzive so ugotovili tudi v primeru laktoperina in nekaterih encimov kravjega mleka. Le lizocim ni bil pojasnjen kot alergen (El-Agamy, 2007). Čeprav so karakterizirali epitope na α_{S2} -, β - in κ -kazeinu, so alergene aktivnosti teh proteinov redke.

Med posameznimi raziskavami najdemo veliko nasprotnih trditev v zvezi z razširjenostjo specifičnih protiteles IgE in njihovo reakcijo s posameznimi proteini kravjega mleka. Razlogi za različne trditve se verjetno skrivajo v sami variabilnosti poskusov, kjer je pogosto v obravnavi le majhna skupina otrok, alergičnih na kravje mleko (Hochwallner in sod., 2014).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 VZORCI MLEKA

Kobilje mleko smo pridobili v kobilarni Lipica od 19 kobil lipicanske pasme. Mleko smo namolzli ročno, v vzorčne posodice, po približno 50 ml od vsake kobile. Vzorce smo takoj po odvzemu shranili na suhem ledu in jih transportirali do genetskega laboratorija na Biotehniški fakulteti, Oddelku za zootehniko v Domžalah. Vzorce mleka smo nato zamrznili pri -80 °C. V času vzorčenja so bile kobile v različnih stadijih laktacije (od 1 tedna do največ dva meseca po porodu).

3.2 IZOLACIJA GENOMSKE DNA

Genomsko DNA smo izolirali iz venozne krvi konjev. Vzorci krvi so bili odvzeti z vakuntejnerskimi epruvetami, ki so vsebovale antikoagulant citrat. Alikvote vzorcev po 200 µl smo zamrznili na -20 °C, do uporabe. Po odtajanju in blagem mešanju smo 200 µl krvi dodali 800 µl TE pufra (1 M tris HCl, pH 8,0; 0,5 M EDTA, pH 8,0) in vzorce centrifugirali 1 min na 12000 x g (centrifuga Eppendorf 5417). Supernatant smo odlili in postopek ponovili 2-3 krat. Na koncu smo pelet očiščenih levkocitov resuspendirali v 200 µl pufra za lizo (1 M Tris, pH 8,3; 2 M Mg₂Cl₂, 1 M KCl, 0,5 % Tween) s proteinazo K (10 µg/µl). Suspenzijo smo preko noči inkubirali pri 54 °C in pri rahlem stresanju. Naslednji dan smo suspenzijo inkubirali še 10 min pri 94 °C. Koncentracijo in čistost DNA smo določili spektrofotometrično, z merjenjem optične gostote pri valovnih dolžinah 260 in 280 nm: 1 O.D. 260 nm = 50 ng DNA/µl, pri čemer mora biti razmerje A260 nm / A280 nm > 1,7. Raztopino DNA smo shranili pri -20°C, uporabljali pa smo jo kot matrico pri pomnoževanju DNA s PCR.

3.3 DOLOČANJE POLIMORFIZMOV V ZAPOREDJU NUKLEOTIDOV KAZEINSKIH GENOV PRI KONJU

Za določanje polimorfizmov v zaporedju nukleotidov kazeinskih genov smo uporabili metodo verižne reakcije s polimerazo (Polimerase Chain Reaction, PCR). Izbrali smo področja posameznih kazeinskih genov za katere so bili dokazani polimorfizmi, ki vplivajo na izrezovanje intronov. Pri genu za β-kazein smo izbrali področje introna 1, saj sta bila na tem delu najdena dva polimorfizma (Lenasi in sod., 2003; 2006), ki vplivata na alternativno izrezovanje intronov v zreli mRNA. V verižni reakciji s polimerazo smo pomnožili polimorfna mesta. Kot matrico za pomnoževanje DNA s PCR smo uporabili genomsko DNA v kombinaciji z različnimi pari začetnih oligonukleotidov. Dobljenim odsekom smo določili zaporedje nukleotidov.

Tako smo za par začetnih oligonukleotidov za določanje zaporedja nukleotidov introna 1 β-kazeina izbrali:

- - BIN1-R 5'-CCCATAGTTATTCATATTGCCAAA-3'
- - BIN1-F 5'-GGCAATATGAATACTATGGGAAA-3'

Vzorcem DNA devetnajstih kobil smo določili zaporedje nukleotidov omenjenih področij.

Reakcijska zmes za pomnoževanje fragmentov DNA s PCR s končnim volumnom 20 µl je vsebovala:

- 100 µM zmes deoksinukleotidov (dATP, dCTP, dGTP in dTTP)
- 1,5 mM MgCl₂
- 0,5 µM obeh začetnih oligonukleotidov
- 100 ng genomske DNA
- 0,5 polimeraze DNA AmpliTaq(Perkin Elmer)
- 10 x PCR pufer
- bidestilirano vodo do končnega volumna

Reakcija je potekala v mikroprocesorsko vodenem termostatu. Pomnoževanje se je začelo s 5-minutno denaturacijo DNA pri 94 °C, ki mu je sledilo 30 ciklov s profilom:

- denaturacija (94 °C, 1 min)
- prileganje (57 °C, 1 min)
- sinteza (72 °C, 40 s)

Reakcija se je končala s 5-minutno zaključno sintezo DNA pri 72 °C.

Reakcijske zmesi smo nato nanesli na 2 % agarozni gel za preverjanje dolžine dobljenih fragmentov DNA.

3.4 ELEKTROFOREZA NA AGAROZNEM GELU

Elektroforeza na agaroznem gelu je metoda, ki se uporablja za ločevanje molekul DNA ali RNA glede na njihovo velikost. To dosežemo s premikanjem negativno nabitih molekul nukleinskih kislin skozi agarozni gel v električnem polju. Ker je molekula DNA negativno nabita, se pod vplivom enosmenega električnega toka giblje proti anodi (+). Pri tem je pomembna hitrost gibanja molekul DNA, ki je odvisna od velikosti, oblike, gostote agaroznega gela in jakosti električnega polja. Krajše molekule se premikajo hitreje in posledično pripotujejo dlje od daljših.

Elektroforezo na agaroznem gelu smo uporabljali za preverjanje uspešnosti reakcije PCR in za ločevanje fragmentov DNA, dobljenih s PCR. Pripravili smo agarozni gel v horizontalnih elektroforeznih enotah (Biorad) v dimenziji kalupa 5,5 x 7,5 cm. Za elektroforetski pufer smo uporabili 0,5 x TBE (50 mM Tris baza-Sigma, 50 mM borna kislina, 1 mM EDTA, pH 8,0). Za ločevanje fragmentov DNK dobljenih s PCR, smo pripravili 2 % agarozni gel. Mešanico agaroze in elektrodnega pufra smo segrevali v mikrovalovni pečici in jo nato ohlajali na mešalu. Še tekočemu nekoliko že ohlajenemu gelu smo dodali 2 µl Silber Safe in še tekočo agarozo vlili v pripravljen model. Strjevanje agaroznega gela je trajalo 10-20 min pri sobni temperaturi.

Vzorcem fragmentov DNA smo pred nanosom na gel dodali nalagalni pufer (0,25-odstotno bromofenol modro (BP)) in jih previdno odpipetirali v luknjice v gelu. Za ocenjevanje dolžin fragmentov smo poleg vzorcev nanesli na gel še velikostni standard (*1kb DNA ladder*). V elektrodnem pufru (0,5 x TBE) in pri napetosti 100 V je elektroforeza tekla približno 30 min. Po končani elektroforezi smo gel fotografirali na UV transiluminatorju.

3.5 DOLOČANJE ZAPOREDJA NUKLEOTIDOV

Pri reakciji določanja zaporedja nukleotidov uporabljamo samo en začetni nukleotid in mešanico nukleotidov, ki vsebujejo tudi deoksiribonukleotid-trifosfate (ddNTP-je) s fluorescentno značko. Polimeraza sintetizira vzorčni DNA komplementarno verigo, dokler ne vstavi vanjo prve molekule ddNTP, ki prepreči nadaljnje podaljševanje verige. Enoveržne molekule DNA, ki se končujejo z monomeri ddNTP, nato potujejo skozi električno polje in se razporedijo po velikosti. Laser oddaja svetlobo določene valovne dolžine (vzbujevalna svetloba), detektor pa zazna svetlobo spremenjene valovne dolžine, ki jo oddajajo fluorescentne značke (sevalna svetloba). Za vsako od štirih molekul ddNTP se uporablja štiri različna fluorescentna barvila, tako lahko na podlagi emisije fluorescentne svetlobe določimo zaporedje nukleotidov vzorčne DNA.

Sekvenčno reakcijo smo izvedli v cikličnem termostatu (Perkin Elmer). Produkte PCR smo pred sekvenčno reakcijo očistili preostanka začetnih prostih nukleotidov in morebitnih nespecifičnih produktov PCR. Očiščenim produktom PCR (5 µl) smo dodali 1,5 µl mešanice encimov ExoI in SAP ter vode. Po 45 min inkubaciji na 37 °C, ko so se začetni oligonukleotidi razgradili, smo inkubirali še 15 min na 80 °C za deaktivacijo encimov.

Za sekvenčno reakcijo smo uporabili:

- Začetni oligonukleotid (Forward ali Reverse) 0,5 µl
- Big Dye 1,5 µl
- Očiščen produkt PCR 5 µl
- Vodo do 10 µl

Sekvenčna reakcija, ki se je izvajala v cikličnem termostatu, se je začela z začetno 1 min denaturacijo pri 96 °C. Sledilo je 35 ciklov: denaturacija pri 95 °C, 30 s; vezava začetnih oligonukleotidov pri 50 °C, 15 s; sinteza komplementarne verige pri 60 °C, 4 min.

3.6 ČIŠČENJE PRODUKTOV SEKVENČNE REAKCIJE

V 1,5 ml reagenčne posodice smo dodali 25 µl 96 % etanola in 1 µl 3M raztopine Na acetata s pH 4,6. Mešanici smo dodali po 10 µl sekvenčne reakcije in vse skupaj vorteksirali. Sledila je inkubacija 10 min v temi na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali 20 min na 20500 g (Eppendorf) pri temperaturi 15 °C in odpipetirali supernatant. Nevidnemu peletu smo dodali 250 µl 70 % etanola in centrifugirali 5 min na 20500 g pri 15 °C. Odpipetirali smo supernatant in posušili na zraku pri sobni temperaturi. Dodali smo po 12 µl formamida in dobro premešali. Sledila je še denaturacija v termobloku na 94 °C za 2 min. Vzorce smo takoj po denaturaciji postavili na led in kot taki so bili pripravljeni za določitev zaporedja nukleotidov.

3.7 IZOLACIJA RNA IZ MLEKA

Zamrznjeno mleko smo odtajali na sobni temperaturi. Po 14 ml mleka smo centrifugirali 10 min pri temperaturi 4 °C in 3000 x g v centrifugi Allegra X-12R (Beckman Coulter). Supernatant smo odlili, vsedlini pa dodali 1 ml *TRIzol* (Gibco, BRL). Vzorce smo inkubirali 5 min pri sobni temperaturi ter jim dodali 200 µl kloroform in jih močno premešali. Vsebino (okoli 1,2 ml) smo prestavili v 1,5 ml epice. Po 3 minutni inkubaciji na sobni temperaturi smo nato vzorce centrifugirali 15 min pri 4 °C in 12000 x g v centrifugi

5417 C (Eppendorf). Vodno fazo (okoli 600 µl) smo prenesli v nove epice in ji dodali 500 µl izopropanola. Vzorce smo nato inkubirali 10 min na sobni temperaturi ter centrifugirali 10 min pri 4 °C in 12000 x g v centrifugi 5417 C (Eppendorf). Supernatant smo odlili, oborjeno RNA pa sprali s po 1 ml 75 % etanolom. Po 5 minutnem centrifugiranju pri 4 °C in 12000 x g v centrifugi 5417 C (Eppendorf), smo supernatant odlili in oborino posušili na zraku (5-10 min). RNA smo raztopili v 20 µl vode brez RNA (RNA free water). Tako izolirano RNA smo shranili na – 80 °C in jo uporabili za sintezo cDNA (RT PCR).

3.8 SINTEZA cDNA

Iz RNA, izolirane iz mleka, smo z reakcijo obratnega prepisovanja sintetizirali cDNA, ki je komplementarna mRNA.

Pripravili smo reakcijsko zmes (20 µl):

- 6 µl zmesi deoksinukleotidov (dATP, dCTP, dGTP in dTTP)
- 4,4 µl MgCl₂ s koncentracijo 25 mM
- 2 µl 10 x PCR pufra (Perkin Elmer)
- 1 µl obeh začetnih oligonukleotidov
- 0,5 µl reverzne transkriptaze MuLV (*Murine Leukemia Virus*), 50 U/µl (Perkin Elmer)

Reakcijski zmesi smo dodali 5 µl iz mleka izolirane RNA. Zmes smo inkubirali 45-60 min pri 42 °C. S 5 min segrevanjem pri 95 °C smo ustavili reakcijo prepisovanja mRNA in hkrati denaturirali hibride med molekulami mRNA ter novo nastalimi molekulami cDNA. Enoverižno cDNA smo shranili pri -20°C. Tako sintetizirano cDNA smo uporabili kot matrico pri pomnoževanju DNA s PCR za ugotavljanje vzorcev vključevanja šibkih eksonov.

3.9 DOLOČANJE VZORCEV VKLJUČEVANJA ŠIBKIH EKSONOV β-KAZEINA

Za preverjanje vzorcev alternativnega vključevanja obeh šibkih eksonov (eksona 5 in 8) β-kazeinskega gena smo za matrico uporabili sintetizirano enoverižno cDNA ter različne pare začetnih oligonukleotidov. Za ekson 5:

Bex1-F 5'-CATCCACTTACCTACTCCTTC-3'
Bex6-R 5'-CTCTCTTGCTGCTGTCCCTC-3'

Bex1-F 5'-CATCCACTTACCTACTCCTTC-3'
Bex7-R 5'-CTTCCATTATTCGGGCTGA-3'

Za ekson 8:

Bex7-KF 5'-CCTGTCCAAGCTTTCTGCT-3'
Bex9-R 5'-CAGATTGGAAAGATGCCACA-3'

3.10 MERJENJE KOLIČINE FRAGMENTOV Z BIOANALIZATORJEM

Za merjenje velikosti in količine posameznih fragmentov DNA smo uporabili Agilent 2100 Bioanalizator (Agilent Technologies, USA), ki deluje po principu kapilarne elektroforeze. Instrument uporablja novejšo tehnologijo namesto dragih kapilarnih elektroforetskih enot, njegova uporaba pa je enostavna. Za nanašanje vzorcev se pri tej metodi uporabljo mikročipi, ki so izdelani iz stekla in vsebujejo mrežo medsebojno povezanih mikro-

kanalov. Na en mikročip lahko nanesemo 12 vzorcev DNA, katerih količine lahko izmerimo v 30 minutah. Vsak mikročip vsebuje skupno 16 luknjic; 3 za nanos ustreznega polimera z dodanim barvilom za DNA, 1 za velikostni standard (ladder) in 12 za nanos vzorcev DNA. Velikostni standard vsebuje spodnji in zgornji označevalci (marker), ki ju biolanalizator uporabi kot referenco za merjenje velikosti fragmentov DNA. Zgornji marker se uporabi tudi kot referenca za izračun koncentracije fragmentov DNA v posameznem vzorcu. Gibanje DNA po kanalih je kontrolirano z računalniško vodenem serijo elektrod. Vsaka od elektrod je neodvisno povezana z napajalnikom. Laserski detektor na izteku čipa meri fluorescenco barvila, ki se je vgradilo v fragment DNA. Na osnovi količine oddane svetlobe ter izmerjenega elucijskega časa bioanalizator izračuna jakost signala in na ta način določi količino in velikost posameznega fragmenta DNA. Obstajajo različni DNA mikročipi, označeni glede na velikost fragmentov, ki jih želimo izmeriti. Glede na območje velikosti fragmentov DNA ločimo DNA 1000 (25-1000 bp), DNA 7500 (100-7500 bp) ali DNA 12000 (100-12000 bp). Pri DNA 1000 mikro-plošči mešanica označevalcev vsebuje spodnji marker velikosti 15 bp in zgornji v velikosti 1500 bp.

Pred vsakim začetkom merjenja smo elektrode bioanalizatorja sprali v 350 µl vode DEPC, ki smo jo nanesli na poseben mikročip za spiranje. Elektrode smo spirali 1 min in jih nato osušili. Za analizo smo uporabili DNA 1000 LabChip® Kit (Agilent Technologies, USA), kamor smo nanesli vzorce po protokolu proizvajalca. Mrežo mikročipa smo najprej zapolnili z ustreznim polimerom z dodanim barvilm za DNA, ki smo ga pod pritiskom razporedili po celiem čipu. V posamezni mikročip smo nato nanesli velikostni standard ter vzorce za analizo (po 1µl PCR zmesi). Tako pripravljen mikročip smo nato vstavili na vrtinčno mešalo (Vortex Ika Works, Agilent Technologies, USA) ter vzorce in reagente premešali s 60 sekundnim stresanjem pri 2400 rpm. Po končanem stresanju smo mikročipe prestavili v bioanalizator in začeli analiziranje. Vzorci so pri visoki napetosti potovali skozi mikrokanale v čipu, kar je uravnavala računalniško vodenem seriju elektrod. S pomočjo laserskega detektorja naprava meri fluorescenco barvila, ki se je vgradilo v fragmente DNA. Končno bioanalizator na osnovi količine oddane svetlobe ter izmerjenega elucijskega časa ob primerjavi s standardi v čipu, izračuna jakost signala. Na osnovi jakosti signala je bioanalizator določil količino in velikost preiskovanega fragmenta.

3.11 IZOLACIJA KAZEINOV IZ MLEKA

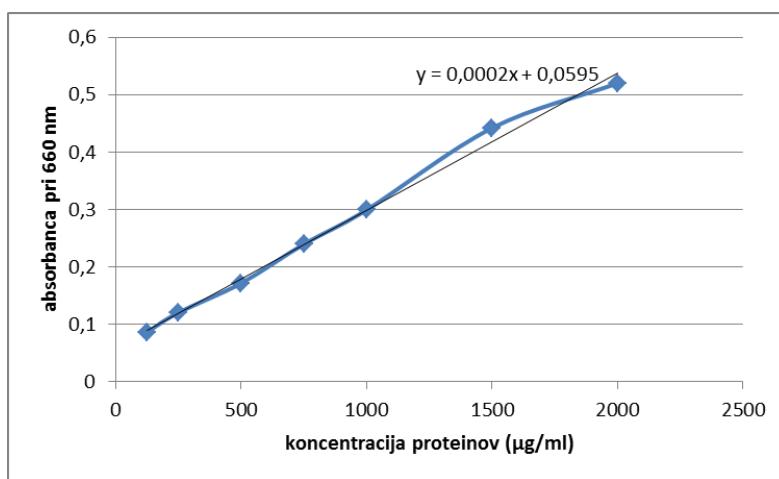
V literaturi smo poiskali osnovna navodila za pripravo proteinskih vzorcev, ki so nam bili kot vodilo. Proteine smo izolirali iz mleka vedno na enak način, kot je opisano v metodi postopka izolacije kazeinov. Pri sami izolaciji kazeinov iz mleka je pomembna odstranitev maščob, kar pri kobiljem mleku ni povzročalo težav, saj je vsebnost maščob v kobiljem mleku majhna. Nekoliko več težav je v postopku izolacije povzročala odstranitev maščob iz kravjega mleka. Pri odstranitvi maščobe iz mleka smo si pomagali s čisto spatulo, s katero smo odstranili plast maščobe. Pred tem smo vzorce zamrznili, saj smo zamrzljeno maščobo s spatulo še lažje odstranili. Da so vzorci hitreje zamrzli, smo zamrzovali pri - 80 °C.

Po več izvedenih metodah izolacije kazeinov iz mleka, ki jih je preizkusila in opisala Šmerc (2007), smo se odločili za metodo, ki jo je predlagala kot najboljšo:

V centrifugirko smo odpipetirali 1,3 ml mleka ter vzorce inkubirali 50 min pri 40 °C. Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali 15 min pri 20600 g ter jih nato zamrznili pri -80 °C. vzorce smo posamično jemali iz zamrzovalnika in odstranili plast maščobe s spatulo in filter papirjem omočenim z acetonom. Vzorce brez maščobe smo inkubirali 5 min pri 40 °C ter dodali 8 µl 32 % HCl. Nato smo vzorce centrifugirali 10 min pri 20200 g. Po centrifugiranju smo supernatant odlili (sirotkini proteini) ter vsedlino (kazeini) sprali z 1 ml dH₂O. Vsedlino smo raztoplili v 500 µl 8 M uree.

3.11.1 Merjenje koncentracije kazeinov

Koncentracijo kazeinov, izoliranih iz mleka, smo izmerili s pomočjo Pierce 660 nm Protein Assay metode (Thermo Scientific, 2016). Metoda temelji na kolorimetričnem merjenju skupne količine proteinov (Thermo Scientific, 2016). Koncentracijo proteinov smo ocenili na podlagi izmerjene absorbance posameznega vzorca glede na absorbanco standardnih proteinov (za katere je koncentracija znana). V mikroploščo smo tako nanesli 7 standardnih proteinov (Thermo Scientific) z znanimi koncentracijami (od 50 do 2000 µg/ml) ter naše vzorce in vzorec uree. V luknjice na mikroplošči smo nanesli po 10 µl posameznega standarda, po 10 µl vzorca kazeinov in 10 µl uree v kateri so bili raztopljeni vzorci kazeinov. Nato smo v vsako luknjico dodali 150 µl reagenta (angl. *Protein Assay Reagent*) proizvajalca Thermo Scientific. Mikroploščo smo nato pokrili s pokrovom in stresali na stresalniku pri srednji hitrosti 1 minuto. Vzorce smo nato inkubirali 5 min pri sobni temperaturi. Mikroploščo smo nato vstavili v spektrofotometrski čitalec (ELx808, Bio-Tek Instruments, Inc.), izmerjene absorbance pa odčitali s pomočjo računalniškega programa KC junior (KC Junior, 2002). Na podlagi znanih koncentracij standardnih proteinov in njihovih izmerjenih absorbanc smo narisali umeritveno krivuljo in s pomočjo linearne regresijske enačbe izračunali neznanko x (koncentracijo proteinov v našem vzorcu). Pred tem smo vsaki izmerjeni absorbanci pri posameznem vzorcu odšteli absorbanco uree.



Slika 7: Standardna krivulja koncentracije proteinov

Figure 7: Standarde curve of the protein measured concentration

Primer za izmerjeno absorbanco $y = 0,338$:

$$x = (y - 0,0595) / 0,0002$$

$$x = 1392 \mu\text{g/ml}$$

3.12 2-D ELEKTROFOREZA

Proteine smo najprej ločili v prvi dimenziji z izoelektričnim fokusiranjem znotraj gradiента pH od 4 do 7. V drugi dimenziji je ločevanje potekalo s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS-PAGE) na 12 % homogenem gelu.

3.12.1 Izoelektrično fokusiranje (IEF) - 1.dimenzija

Za 1. dimenzijo smo uporabili Protean IEF Cell elektroforezni sistem (PROTEAN® IEF System, BIO RAD), ki omogoča ločevanje proteinov glede na njihovo izoelektrično točko. Uporabili smo komercialne 3 mm široke in 18 cm dolge trakove z imobiliziranim gradientom pH od 4–7 (IPG -Immobiline DryStrips, LKB, Vertriebs GmbH). Do uporabe smo trakove shranili na -20 °C. Postopek sestoji iz dveh korakov:

- Rehidracija trakov z imobiliziranim gradientom pH (rehidracija trakov IPG)
- Izoelektrično fokusiranje

Za rehidracijo trakov smo uporabili podstavek z režami. V sredino reže smo odpipetirali 340 µl rehidracijske raztopine (Preglednica 9) z vključenim vzorcem proteinov. Količina nanesenega vzorca na trakove IPG je bila 50 µg kazeinov. S traku smo z anodnega konca najprej odstranili plastično folijo, ki prekriva gel in ga previdno, brez tvorbe mehurčkov, položili z gelom navzdol v režo. Tako položene trakove smo nato prekrili s po 3 ml mineralnega olja. Podstavek z režami smo prekrili s pokrovom ter ga prenesli na električni napajalnik (BIO-RAD Power PAC 300), kjer je rehidracija trakov potekala čez noč (najmanj 10,5 h) na konstantni temperaturi 10°C.

Preglednica 9: Osnovna raztopina za rehidracijo trakov

Table 9: Rehydration stock solution

Sestavina	Končna koncentracija	količina
Urea	7M	8,4 g
Thiourea	2M	3,04 g
CHAPS	2% (w/v)	0,4 g
IPG pufer	2% (w/v)	400 µl
1 % brom fenol modro	0,002 %	1 kristalček
Dodamo ddH ₂ O do:		20 ml

Osnovno raztopino za rehidracijo smo hranili na temperaturi pri -20 °C v primernih alikvotih glede na število gelov. Pred uporabo smo osnovno raztopino za rehidracijo odtajali na sobni temperaturi in dodali 0,004 g DTT na 1,5 ml alikvot raztopine. V tako pripravljeno raztopino smo zamešali vzorec in pustili stati 0,5 h na sobni temperaturi.

Po rehidraciji smo pod trakove na elektrodne žičke na anodni in katodni strani vstavili z bidestilirano vodo navlažene elektrodne trakove, pokrili s pokrovom (vzpostavili stik med anodo in katodo ter gelom) ter priključili napajalnik na napetost za potek IEF. IEF je potekalo pod visoko napetostjo v štirih stopnjah, s postopnim zviševanjem napetosti do 3500 V. Proteini so tako v električnem polju potovali toliko časa, dokler niso dosegli področja gela (traku), kjer je pH natančno enak vrednosti njihove izoelektrične točke (pI). IEF je potekalo 10,5 h pod konstantnim električnim tokom 0,5 mA/trak, v stopnjah, ki jih prikazujemo v preglednici 10.

Preglednica 10: Stopnje izoelektričnega fokusiranja

Table 10: Running conditions steps

1. stopnja	500 V	1 min
2. stopnja	500 V	2 h
3. stopnja	500-3500 V	1,5 h
4. stopnja	3500 V	7 h
SKUPAJ		10,5 h

T = 10 °C, tok = 0,5 mA/trak

T = 10 °C, current = 0,5 mA/trak

Po končanem IEF smo trakove z gelom hranili v nepredušno zaprti foliji na temperaturi pri -80 °C.

3.12.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS-PAGE)- 2. dimenzija

V 2. dimenziji smo proteine ločevali s pomočjo električnega polja v poliakrilamidnih gelih, na osnovi njihove molekulske mase, v prisotnosti anionskega detergenta natrijevega dodecil sulfata (SDS). Pred uporabo za SDS-PAGE smo trakove odmrznili in jih najprej sprali 4-krat z 1xSDS pufrom (Preglednica 11). Trakove smo po spiranju prenesli v 15 ml pufra za uravnoteženje I (15 min na stresalniku) in nato v 15 ml pufra za uravnoteženje II (15 min na stresalniku). Po uravnoteženju trakov smo trakove prenesli na filter papir (z gelom navzgor) in jih dobro osušili, še posebej konce trakov. Na površino že pripravljenega gela smo najprej vstavili filter papir z nanesenim proteinskim markerjem. Nato smo na površino gela do vrha steklene plošče vlili še 0,5 % raztopino agaroze. Skozi raztopino agaroze smo spustili trak, tako, da se je usedel na površino ločevalnega gela. Ko se je raztopina agaroze strdila, smo kalup z gelom prenesli v elektroforezno posodo, kjer se nahajata obe elektrodi. Kalup, vstavljen v posodo, je tako tvoril dve posodi, spodnjo in zgornjo. V obe posodi smo nalili 1xSDS elektroforezni pufer (Preglednica 12). Kalup z gelom je umeščen ob posodi z vodo, ki neprestano kroži preko hladilnega sistema ter tako omogoča konstantno želeno temperaturo. Potovanje vzorcev je potekalo v smeri anode najprej 20 min pri konstantnem toku 20 mA/gel ter priključenem hladilnem sistemu (T=10 °C) in nato pri konstantnem toku 40 mA/gel (4,5 h do 5 h).

Preglednica 11: SDS pufer za uravnoteženje – osnovni

Table 11: SDS equillibration buffer solution

Sestavina	Končna koncentracija	količina
1,5 M raztopina Tris-HCl, pH=8,8	75 mM	5 ml
Urea (Sigma)	6 M	36 g
Glicerol (Sigma)	30 % (v/v)	30 ml
SDS (Sigma)	2 % (w/v)	2 g
Bromofenol modro (Sigma)	0,002 % (w/v)	1 kristalček
Dodamo ddH ₂ O do 100 ml		

Pufer za uravnoteženje smo hranili v primernih alikvotih pri T = -20 °C

Pufer za uravnoteženje I (65 mM DTT)

Za uravnoteženje enega traku (dolžine 18 cm) smo v falkonko zatehtali 0,15 g DTT in dodali 15 ml osnovnega pufra za uravnoteženje.

Pufer za uravnoteženje II (260 mM JAA)

Za uravnoteženje enega traku (dolžine 18 cm) smo v falkonko zatehtali 0,72 g JAA in dodali 15 ml osnovnega pufra za uravnoteženje.

Za vsako analizo smo pripravili sveže pufre za uravnoteženje I in II.

Raztopina agaroze

V infuzijsko steklenico smo zatehtali 0,5 g agaroze in dodali 100 ml 1xSDS elektroforeznega pufra. Raztopino smo segrevali v mikrovalovni pečici, da se je agariza lažje raztopila in dodali 1 kristalček barvila bromfenol modro. Raztopino agaroze smo razdelili v plastične centrifugirke s pokrovčkom (po 30 ml) in hranili na sobni temperaturi.

Preglednica 12: 1xSDS elektroforezni pufer

Table 12: 1xSDS electrophoresis buffer

Sestavina	Končna koncentracija	količina
Tris baza (Sigma)	25 mM	3 g
Glicin (Merck)	192 mM	14,4 g
SDS (Sigma)	0,1 % (w/v)	1,0 g
Dodamo ddH ₂ O do		1000 ml

Vlivanje gelov

Ločevalni SDS PAGE gel (Preglednica 13) smo pripravili dan pred potekom elektroforeze, tako, da se je gel čez noč lepo strdil. Med stekleni plošči, ki sta skupaj z ostalimi sestavnimi deli tvorili kalup, smo vlili gel (35 ml za en gel debeline 1 mm, 20x20 cm) z ustrezno koncentracijo akrilamida (raztopine za pripravo ločevalnega gela). Na zgornjo površino gela smo s pipeto nanesli tanko plast destilirane vode, da smo preprečili stik s kisikom in s tem omogočili enakomerno polimerizacijo. Ko je bil gel polimeriziran (naslednji dan) smo vodo odlili in površino gela dobro osušili s sušilnikom. Tako je bil kalup z gelom pripravljen na vstavljanje traku.

Raztopine za pripravo ločevalnega gela:

- **1,5 M raztopina Tris-HCl, pH=8,8** **za pripravo 200 ml**
 - Tris baza (Sigma) 36,3 g
 - Dodamo 150 ml ddH₂O
 - Uravnamo pH na 8,8 s konc. HCl
 - Dodamo ddH₂O do 200 ml
 - Hranjenje: 3 meseci pri T=4 °C v temi (Zavij v folijo)

- **10 % (w/v) raztopina SDS** **za pripravo 100 ml**
 - SDS (Sigma) 10,0 g
 - Dodamo ddH₂O do 100 ml
 - Hranjenje: 6 mesecev pri sobni T

- **Raztopina akrilamid/bisakrilamid (30 %/0,8 %) (Sigma)**
- **TEMED**

- **10 % APS** **za pripravo 1 ml**

APS (Sigma) 0,1 g
Dodamo ddH₂O do 1 ml
Hranjenje: pri -20 °C

Preglednica 13: Raztopina za ločevalni gel (12 %)

Table 13: Gel solution (12 %)

Sestavina	Količina za 1 gel 18x18 cm
Raztopina akrilamid/bisakrilamid (30% / 0,8%)	14 ml
1,5 M raztopina Tris-HCl, pH=8,8	8,75 ml
10 % (w/v) SDS	350 µl
ddH ₂ O	11,74
RAZPLINJANJE 10 min	
10 % (w/v) APS	175 µl
TEMED	17,5 µl
Skupaj	35 ml

APS in TEMED smo dodali k raztopini (vse sestavine zgoraj), ki smo jo predhodno razplinili v ultrazvočni kopeli 10 min.

APS and TEMED add after degassing the solution (all ingredients up) in ultrasound bath.

Barvanje gelov

Barvanje gelov smo izvedli z barvilo Sypro Ruby Protein Stain (Bio Rad). Barvilo Sypro Ruby je fluorescentno barvilo z ekscitacijsko svetlobo valovne dolžine 280 nm in 450 nm ter emisijsko svetlobo valovne dolžine maksimalno 610 nm. S Sypro Ruby obarvani proteini na gelu so lahko vidni z različnimi ekscitacijskimi viri, kot je 300 nm UV, transiluminator ali pa laserski sistemi. Za detekcijo barvila smo kot izvor ekscitacijske svetlobe izbrali UV transiluminator. Barvilo Sypro Ruby smo izbrali zaradi njegove izjemne fotostabilnosti in dolge emisijske dobe.

Gele smo najprej prenesli v posodo s fiksacijsko raztopino. Po fiksaciji (2 x po 30 min) smo gele čez noč barvali v raztopini barvila Sypro Ruby (na stresalniku). Naslednji dan smo gele prestavili v raztopino za razbarvanje, kjer smo razbarvali ozadje 2 x po 30 min. Na koncu smo gele še spirali 3 x po 5 min v bidestilirani vodi.

- **Fiksacijska raztopina**
100 % (v/v) metanol (Merck) 500 ml
100 % (v/v) ocetna kislina (Merck) 70 ml
ddH₂O do 1000 ml

- **Raztopina za razbarvanje**
100 % (v/v) metanol (Merck) 100 ml
100 % (v/v) ocetna kislina (Merck) 70 ml
ddH₂O do 1000 ml

Sledilo je slikanje gelov ter analiziranje slik.

3.12.3 Analiza slik

Slike gelov smo analizirali z računalniškim programom 2-D Dymension (Syngene). S programom Dymension lahko med seboj hkrati primerjamo več slik gelov. V ta namen smo en gel (oz. sliko) določili kot referenčni gel (sliko), s katerim smo nato primerjali vse

ostale slike gelov. Na vseh slikah gelov smo določili območje primerjave ter na ta način zmanjšali število lis in iz analize odstranili vse odvečne ali moteče lise. Območje primerjave smo določili na podlagi znane pozicije β -kazeina iz literature ter na podlagi rezultatov identifikacije proteinov na membrani po Edmanu. Za posamezni vzorec (vzorec vključevanja eksonov; 1,2 in 3 oz variante β -kazeina) smo analizirali 3 biološke ponovitve in za vsako biološko ponovitev še tri tehnične ponovitve.

Program deluje tako, da skupne 2-D lise na slikah gelov prekrije med seboj in jih primerja v intenziteti. Intenziteta lise je prikazana kot normalizirani volumen. Normalizirani volumen predstavlja razmerje med volumnom ene lise in celokupnim volumnom vseh lis na gelu. Vse lise določenega območja primerjave na posameznih slikah gelov smo pregledali in jih preverili ali so ustrezno obkrožene in ali se ujemajo z lisami referenčnega gela. Ko smo imeli tako določene vse normalizirane volumne vseh lis primerjalnega območja, smo izračunali celokupni volumen lis, ki predstavljajo eno obliko β -kazeina in ta volumen primerjali s celokupnim volumnom identičnih lis referenčnega gela. Na ta način smo primerjali volumen ene variante proteina z volumnom druge, med različnimi vzorci.

3.12.4 Identifikacija proteinov

Za določitev identitete proteinov smo izrezane lise posameznih proteinov iz PVDF membrane poslali na identifikacijo proteinov po Edmanu (1950) na Inštitut Jožef Štefan (Ljubljana). Osnova kemijskega procesa je metoda, ki jo je razvil Edman (1950). N-terminalna amino kislina specifično reagira s fenilizotiocianatom (PITC) in se selektivno odcepi od peptidne verige. V vsakem ciklu razgradnje se odstrani le aminokislina na N-terminalnem delu, ki se določi kot feniltiohidantoinski (PTH) derivat.

Procise Protein Sequencing System 492 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) je sestavljen iz štirih integriranih modulov: sekvenatorja proteinov (Procise 492A), HPLC-ja (Model 140C), UV detektorja (Model 785A) in računalnika (Macintosh) s programsko opremo za kontrolo sekvenatorja in analizo rezultatov. Sekvenator zaporedno odceplja N-terminalne aminokisline od proteinske/peptidne verige, ki se analizirajo kot PTH-derivati.

3.13 IMUNOENCIMSKI TESTI

Za detekcijo proteinov se pogosto uporablja protitelesa, najpogostejša pa je detekcija proteinov po Westernu. Ker je običajno v vzorcu več proteinov, je prvi korak ločevanje le teh na gelu. Pripravili smo 2-D gele s profilom kazeinske frakcije kobiljega in kravjega mleka. Proteine smo prenesli na membrano. Tako pripravljeno membrano smo uporabili za detekcijo proteinov s specifičnimi protitelesi IgE iz serumov otrok, ki so alergični na kravje mleko. Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik nam je v raziskovalni namen odstopila serume štirih otrok, pri katerih so potrdili alergijo na proteine kravjega mleka. Serumi otrok so bili uporabljeni v skladu s soglasjem Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko (soglasje št 35/06/14: za projekt Mimotopi za specifična IgE protitelesa, nosilec: dr. P. Korošec).

3.13.1 DIBA in Western analiza

DIBA (angl. *dot-immunobinding assay*) je ena od izvedbenih različic imuno-encimskega testa. Metodo smo uporabili za optimizacijo nadalnjih testov v raziskavi. Želeli smo ugotoviti, ali in koliko (relativno) je v serumih alergičnih otrok protiteles IgE in v drugem poskusu optimizirati koncentracijo proteina, s katero bi lahko zaznali reakcijo antigen-protitelo (Ag-Ab) tudi ob nizkih koncentracijah protiteles. Predvidevali smo namreč, da je koncentracija protiteles IgE v serumih alergičnih otrok nizka. Hkrati smo želeli pridobiti tudi informacijo o primerni redčitvi sekundarnih konjugiranih protiteles (Goat Anti-Human IgE (ϵ -chain) Antybody, Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate, affinity purified, Life Technologies). V ta namen smo izvedli optimizacijska testa po metodi DIBA. V poskus smo vključili vse štiri serume otrok, alergičnih na kravje mleko ter en kontrolni serum človeka, ki ni alergičen na kravje mleko. Na membrano PVDF smo narisali mrežo s kvadratki 0,5 x 0,5 cm, kjer je vsak kvadrat predstavljal polje za eno reakcijo. S prvim testom smo ocenili vsebnost IgE v serumih, v drugem testu pa določili optimalno koncentracijo kazeinov.

Postopek optimizacijskega testa:

1. Membrano smo za nekaj sekund potopili v 100 % metanol, nato pa za 5 min v destilirano vodo; membrano smo nato razrezali na trakove in nekoliko osušili
2. V primeru, ko smo testirali vsebnost IgE v serumih otrok, smo v vsak kvadratek nanesli po 3 μ l posameznega seruma v 5-ih različnih razredčinah (1:2, 1:10, 1:20, 1:50, in 1:100). V primeru ugotavljanja optimalne koncentracije kazeinov pa smo na kvadratke membrane nanesli različne redčitve kazeinov (1:10 in 1:50)
3. Ko je membrana vpila vzorce, smo jo inkubirali 40 min v 0,5 % TweenPBS (TPBS), da so se prekrila prosta vezna mesta
4. V primeru ugotavljanja optimalne koncentracije kazeinov smo membrano s kazeini inkubirali 90 min v vzorcu seruma, kjer smo ugotavljeni prisotnost protiteles (pozitivna kontrola); v vzorcu seruma osebe, ki ni alergična na kravje mleko (negativna kontrola); ter v PBS (negativna kontrola konjugata). Membrano s kazeini smo po inkubaciji še spirali 3x po 10 min v 0,05 % TPBS.

V primeru ugotavljanja vsebnosti IgE v serumih, smo točko 4 izpustili in nadaljevali s točkami 5, 6 in 7.

5. Membrane smo nato inkubirali 45 min v suspenziji sekundarno označenih protiteles v dveh različnih razredčinah 1:2000 in 1:5000, da bi ugotovili primerno redčitev konjugata Ker smo ugotovili, da je primerna redčitev konjugata 1:2000, smo membrane s kazeini, kot tudi membrane z serumi otrok inkubirali v suspenziji sekundarno označenih protiteles v razredčini 1:2000.
6. Po inkubaciji smo membrano spirali 2x po 10 min v 0,05 % TPBS in 1x 10 min v 1xPBS
7. Na osušene membrane PVDF smo nanesli substrat (True Blue stabilized substrate for Horseradish Peroxidase, TMB), ki se ob prisotnosti encima razgradi. Razgradnjo substrata prepoznamo (pozitivno reakcijo) po modrem barvanju na mestu, kjer se je substrat razgradil. Na mestih, kjer reakcija ni potekla, barvanja ni. Po pojavu modre barve na pričakovanih mestih smo trak takoj prenesli v destilirano vodo in tako zaustavili reakcijo.

Po optimizaciji testov smo izvedli detekcijo proteinov z Western analizo.

Kazeine smo najprej ločili po velikosti z elektroforezo na poliakrilamidnem gelu v navzočnosti natrijevega dodecilsulfata, kot je opisano v poglavjih 3.12.1 in 3.12.2. Po končani elektroforezi smo iz gela izrezali območje s kazeini (na ta način smo zmanjšali površino za detekcijo kazeinov na membrani) in jih prenesli s pomočjo električnega toka na PVDF membrano. Sestavili smo "sendvič" iz štirih filter papirjev, omočenih z EBP, gela, membrane PVDF in spet 4-ih filter papirjev, omočenih z EBP. Po vsakem nalaganju plasti na anodno ploščo smo previdno, s stekleno palčko, iztisnili vse zračne mehurčke. Na tako pripravljen "sendvič" smo nato namestili še drugo katodno ploščo. S pomočjo električnega toka med anodno in katodno ploščo so se proteini prenesli iz gela na membrano.

Uporabili smo:

- pufer EBP za prenos z električnim tokom, ki smo ga pripravili iz 10 mM CAPS v 10 % MeOH
- 100 % MeOH

Postopek za prenos proteinov iz gela na PVDF membrano:

Gele smo najprej namočili v pufru EBP za 10 min. Hkrati smo namočili lističe filter papirja v EBP za 5 min (da se filter papir prepoji). Membrano smo najprej za nekaj sekund namočili v 100 % MeOH in nato prenesli v pufer EBP ter v njem membrano namakali še 5 min. Nato smo pripravili "sendvič", kot je opisano zgoraj, izmerili površino gela ter glede na površino izračunali potreben električni tok v mA ($0,8 \text{ mA} / \text{cm}^2$). Čas prenosa je bil 65 min. Po prenosu proteinov iz gela na membrano smo na membrani izvedli še blokado tako, da smo membrano inkubirali 60 min v 0,5 % TweenPBS. Z blokado smo prekrili prosta vezna mesta in s tem preprečili njihovo morebitno vezavo s protitelesi.

V nadaljevanju smo izvedli reakcijo enako kot v testu za optimizacijo. Membrane z nanešenimi kazeini smo inkubirali v vzorcih serumov otrok alergičnih na kravje mleko, da bi ugotovili reakcijo specifičnih protiteles IgE s kazeini iz kravjega oz. kobiljega mleka. Membrane smo nato inkubirali še v sekundarno označenimi (s HRP) protitelesih v razredčitvi 1:2000. Po pripravi vzorcev smo:

1. Blokirane membrane s kazeini kravjega mleka in membrane s kazeini kobiljega mleka smo potopili za nekaj minut v destilirano vodo
2. Membrane smo inkubirali 90 min v vzorcih serumov otrok (4 serumi)
3. Membrane smo spirali 3x po 10 min v 0,05 % TPBS
4. Membrane smo inkubirali 45 min v sekundarno (s HRP) označenih protitelesih (1:2000)
5. Membrane smo spirali 2x po 10 min v 0,05 % TPBS in 1x 10 min v 1xPBS
6. Na vsako posamezno membrano smo naneseli TMB substrat (True Blue stabilized substrate for Horsereadish Peroxidase) in počakali 1-2 minuti do pojava modre barve
7. Po pojavi modre barve smo membrano prenesli v destilirano vodo in tako zaustavili reakcijo.
8. Pojav modre barve je predstavljal pozitivno reakcijo oz. vezavo protiteles IgE na epitope vzorčnih kazeinov

4 REZULTATI

4.1 POLIMORFIZMI V INTRONU 1 β -KAZEINSKEGA GENA

Ker so pri konju vzorci vključevanja eksonov 5 in 8 v zrelo mRNA β -kazeina odvisni od dveh nukleotidnih zamenjav v intronu 1 (Lenasi in sod., 2006), smo najprej želeli analizirati oba polimorfizma v intronu 1 v vzorcih DNA kobil pasme lipicanski konj. DNA smo izolirali iz krvi devetnajstih kobil, določili zaporedje nukleotidov omenjenega introna in analizirali prisotnost obuhvaljenega polimorfizma (Preglednica 14).

Preglednica 14: Polimorfna mesta v intronu 1 gena za β -kazein

Table 14: Polymorphic sites in intron 1 β -casein gene

Polimorfno mesto	Nukleotidno zaporedje		
Intron 1: 119	TGA A GAA	TGAT T GAA	TGA A/T GAA
Intron 1: 269	AAAT G TC	AAAC C GTC	AAAT T/C GTC

Na podlagi analiziranih polimorfizmov v intronu 1 β -kazeinskega gena smo predvideli obliko mRNA β -kazeina. Nukleotid A (T) na mestu 119 (269) (haplotip A-T) se pojavi v vzorcih, pri katerih prevladuje dolga oblika mRNA (eksona 5 in 8 sta vključena). Nukleotid T (C) na mestu 119 (269) (haplotip T-C) se pojavi v vzorcih, pri katerih prevladuje kratka oblika mRNA (eksona 5 in 8 nista vključena). Heterozigotna varianta (haplotip A/T-T/C) se pojavi pri vzorcih z alternativnim vključevanjem eksonov 5 oziroma 8.

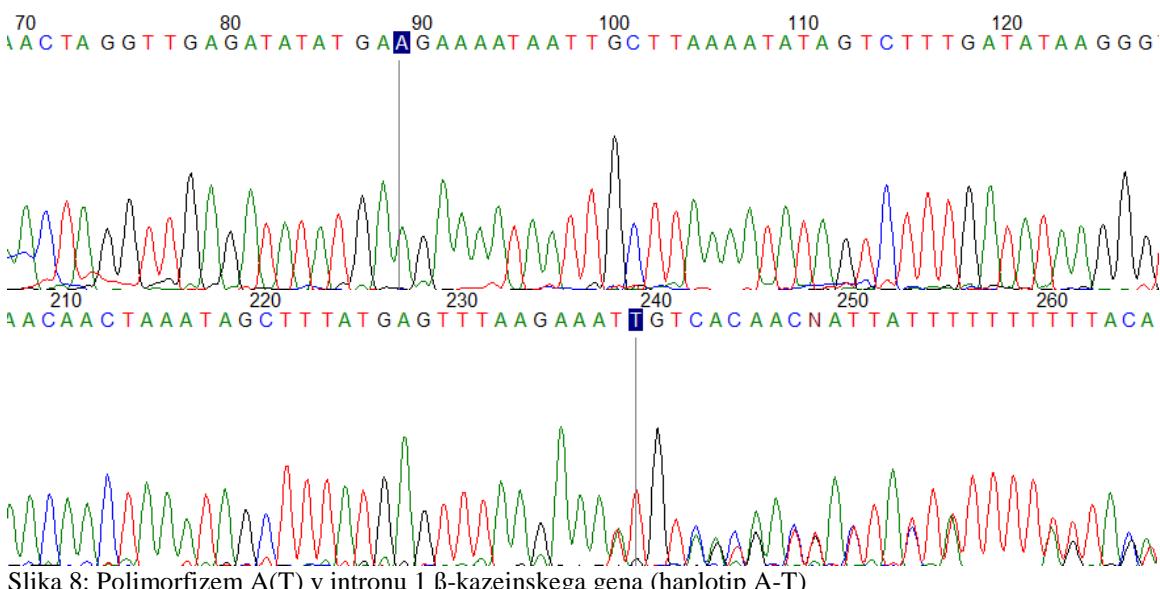


Figure 8: Polymorphism A(T) in β -casein gene intron 1 (haplotype A-T)

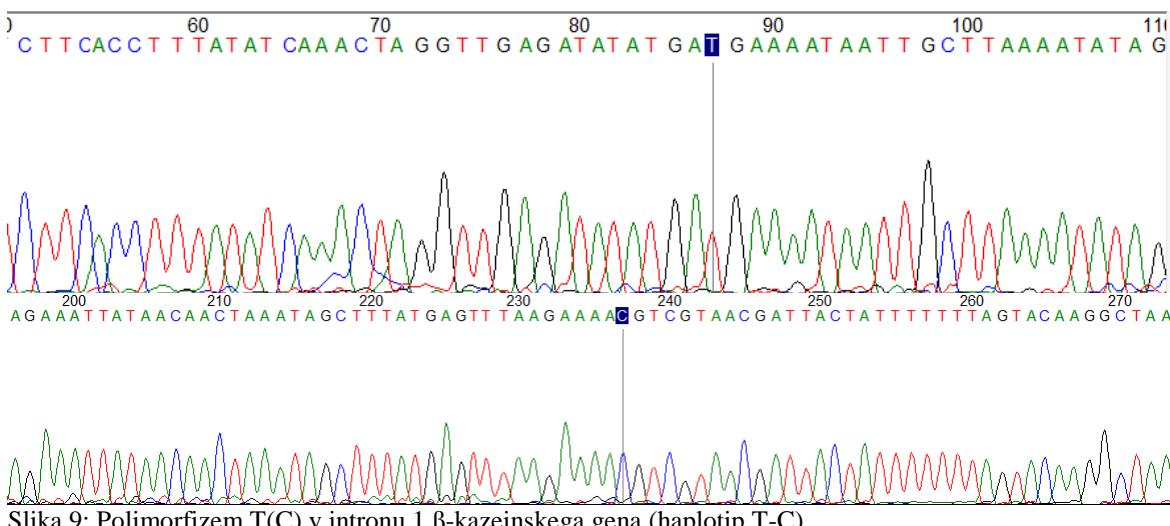


Figure 9: Polymorphism T(C) in β -casein gene intron 1 (haplotype T-C)

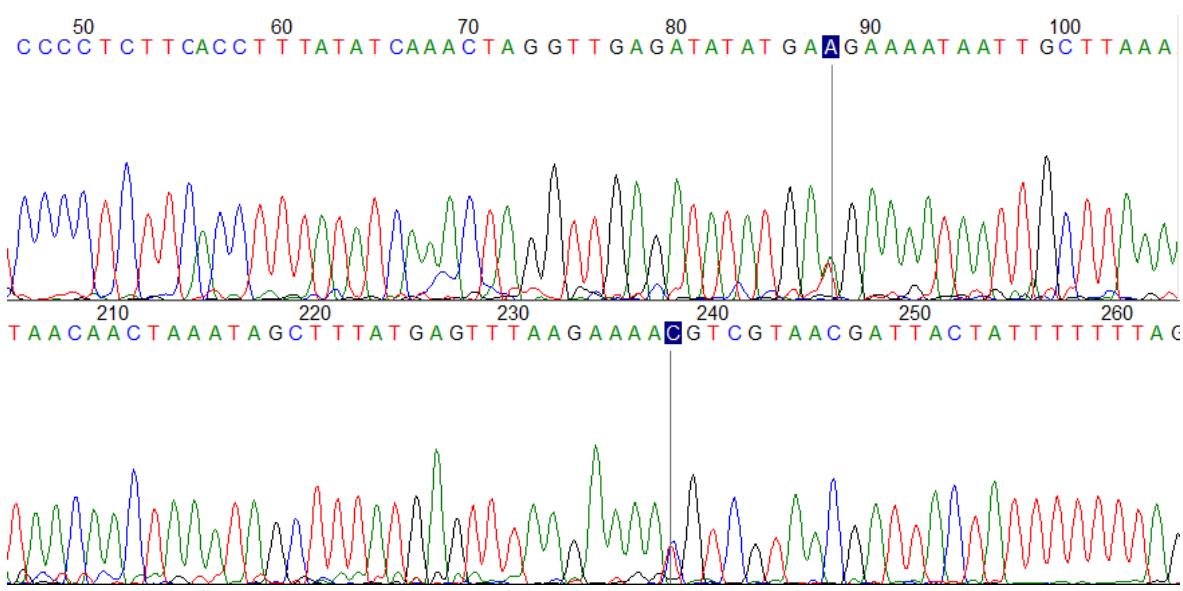


Figure 10: Polymorphism A/T(T/C) in β -casein gene intron 1 (haplotype A/T-T/C)

V intronu 1 gena za β -kazein je bila najpogosteje zastopana zamenjava nukleotida A (T) in sicer pri štirinajstih kobilah (Slika 8). Pri štirih kobilah (Slika 10) smo ugotovili zamenjavo nukleotidov A/T (T/C) in le pri eni kobili (Slika 9) zamenjavo nukleotidov T (C).

Da bi pridobili bolj realno sliko porazdelitve genotipov v populaciji lipicancev, smo dodatno določili sekvenco na delu gena, kjer se nahaja intron 1, še pri 24 vzorcih krvi lipicanskega konja iz arhiva vzorcev genetskega laboratorija na Biotehniški fakulteti, Oddelka za zootehniko. Rezultati sekvence so pokazali oba polimorfizma na delu introna 1 gena za β -kazein. Nukleotid A (T) se je pojavil pri polovici vzorcev (12), pri drugi polovici vzorcev pa se je pojavila heterozigotna varianta (haplotip A/T (T/C)). Našli nismo nobenega vzorca, ki bi imel haplotip T (C) oz. kratko varianto β -kazeina.

4.2 ALTERNATIVNO VKLJUČEVANJE EKSONOV V ZRELO mRNA β -KAZEINA
Z metodo RT-PCR smo ugotavljali prisotnost dveh šibkih eksonov, eksona 5 in eksona 8, v zreli mRNA β -kazeina. Po pomnoževanju s PCR smo na agaroznem gelu analizirali po dva fragmenta, krajšega in daljšega. Krajši fragment je predstavljal fragment brez eksona ($\Delta 5$ ali $\Delta 8$), daljni pa fragment z eksonom (ex5 ali ex8). Oba eksona sta bodisi prisotna v zreli mRNA (dolge oblike mRNA), bodisi alternativno vključena (po dve obliki mRNA, daljša in krajša) ali pa nista prisotna v zreli mRNA (kratke oblike mRNA).

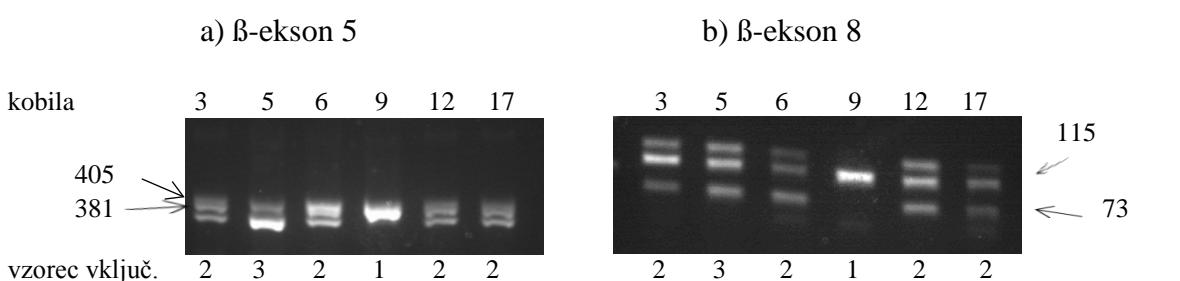
Ugotovili smo tri različne vzorce vključevanja obeh eksonov v zrelo mRNA:

Vzorec vključevanja eksonov (1): Dolge oblike mRNA (eksona 5 in 8 sta prisotna)

Vzorec vključevanja eksonov (2): Po dve obliki mRNA, od katerih je krajša brez eksona (5 oz. 8), daljša pa je ta ekson vsebovala

Vzorec vključevanja eksonov (3): Po dve obliki mRNA (krajša brez šibkega eksona), pri katerih je bilo količinsko razmerje med kratko in dolgo obliko večje kot pri vzorcu vključevanja 2.

Na sliki 11 je prikazana slika agaroznega gela po PCR, kjer so vidni krajši in daljni fragmenti in predstavljeni vzorci vključevanja eksonov 5 in 8 v zrelo mRNA β -kazeina.



Slika 11: Vzorec vključevanja eksonov v zrelo mRNA
a) vključevanje β -kazeinskega eksona 5, b) vključevanje β -kazeinskega eksona 8. Z 3, 5, 6, 9, 12, 17 so označeni vzorci iste kobile, pod njimi pa njihov pripadajoči vzorec vključevanja 1, 2 ali 3.

Figure 11: Splicing pattern of equine β -casein
a) alternative inclusion of the β -casein exon 5, b) alternative inclusion of the β -casein exon 8. With 3, 5, 6, 9, 12, 17 the samples of the same mare are marked with 1, 2 and 3 as representative

V Preglednici 15 prikazujemo število kobil po posameznih vzorcih vključevanja eksonov v zrelo mRNA in pripadajočo obliko mRNA β -kazeina.

Preglednica 15: Število kobil po posameznih vzorcih vključevanja eksonov v zrelo mRNA β -kazeina

Table 15: Number of mares for each β -casein splicing pattern

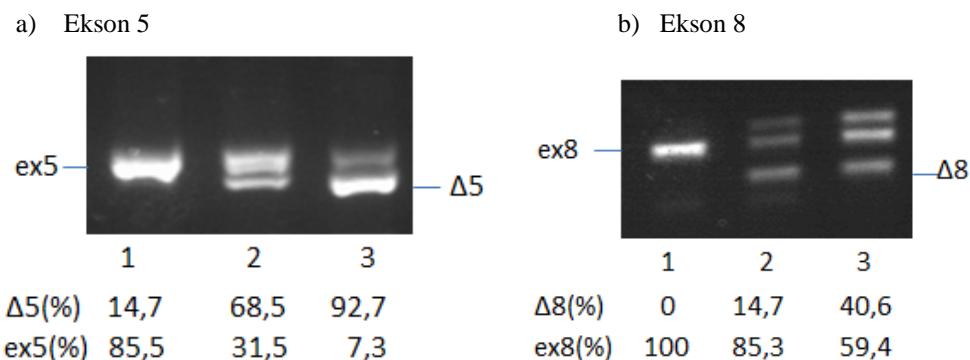
Število kobil	Nukleotidna zamenjava v intronu 1	Vzorec vključevanja	Oblika mRNA
14	A (T)	(1)	Z eksonoma 5 in 8
4	A/T (T/C)	(2)	Alternativno vključevanje eksonov 5 in 8
1	T (C)	(3)	Brez eksonov 5 in 8

Pri kobilah haplotipa A (T), kjer smo pričakovali dolgo obliko mRNA β -kazeina (z eksonoma 5 in 8), smo na agroznem gelu zaznali le po en fragment, daljni fragment, ki je vključeval ekson 5 oziroma ekson 8. Pri kobilah haplotipa A/T (T/C) smo pričakovali

alternativno vključevanje obeh eksonov. Na agaroznem gelu sta se pojavila po dva fragmenta, krajši (brez eksonov 5 ali 8) in daljši (z eksonoma 5 ali 8). Pri kobili haplotipa T (C), smo pričakovali kratko obliko mRNA β -kazeina (brez eksonov 5 in 8). V primeru eksona 5 (Slika 11a, kobila 5) je kratek fragment močneje zaznan, slabše viden pa je tudi daljši fragment. V primeru eksona 8 smo pri kobili haplotipa T (C) ravno tako pričakovali močnejši krajši fragment in slabše viden daljši fragment, vendar je slika podobna vzorcu vključevanja (2).

Pri vzorcih z alternativnim vključevanjem eksonov (2) se je pojavil še en fragment (najdaljši), ki je verjetno nastal pri PCR med dolgo in kratko obliko. Ta fragment je bil viden tudi pri vzorcu kobile 5, kjer smo pričakovali kratko obliko mRNA β -kazeina.

Količine posameznih fragmentov cDNA (z ali brez vključenega eksona) smo določili z analizo produktov v bioanalizatorju ter izračunali njihov delež. Za vsak vzorec vključevanja šibkih eksonov (1, 2 in 3) smo v bioanalizatorju analizirali tri biološke in tri tehnične ponovitve. Vzorci vključevanja eksonov so se med seboj razlikovali v prisotnosti in količni fragmentov (Slika 12). Pod sliko 12 so z 1, 2 in 3 označeni vzorci vključevanja eksonov 5 in 8 ter pripadajoči deleži fragmentov.



Slika 12: Alternativno vključevanje eksona 5 (a) in eksona 8 (b)
ex5: fragment z eksonom 5, Δ 5: fragment brez eksona 5, ex8: fragment z eksonom 8, Δ 8: fragment brez eksona 8.

Figure 12: Alternative inclusion of β -casein exon 5 (a) and exon 8 (b)
ex5: fragment with exon 5, Δ 5: deletion of exon 5, ex8: fragment with exon 8, Δ 8: deletion of exon 8.

V preglednici 16 so izračunani povprečni deleži posameznega fragmenta glede na vzorec vključevanja eksonov.

Preglednica 16: Povprečni deleži posameznih fragmentov cDNA glede na vzorec vključevanja eksonov 5 in 8 v zrelo mRNA β -kazeina

Table 16: Average values (%) of cDNA fragments for each splicing pattern of equine β -casein

Vzorec vključevanja eksonov	Število kobil	Število vzorcev*	Fragment cDNA (%)				Varianta na 119	Varianta na 269
			ex5	$\Delta 5$	ex8	$\Delta 8$		
1	14	9 (3x3)	85,5	14,5	100	0	A	T
2	4	9 (3x3)	31,5	68,5	85,3	14,7	A (T)	T (C)
3	1	3 (1x3)	7,3	92,7	59,4	40,6	T	C

ex5: fragment z eksonom 5, $\Delta 5$: fragment brez eksona 5, ex8: fragment z eksonom 8, $\Delta 8$: fragment brez eksona 8. * Število vzorcev: število kobil x število ponovitev na kobilo

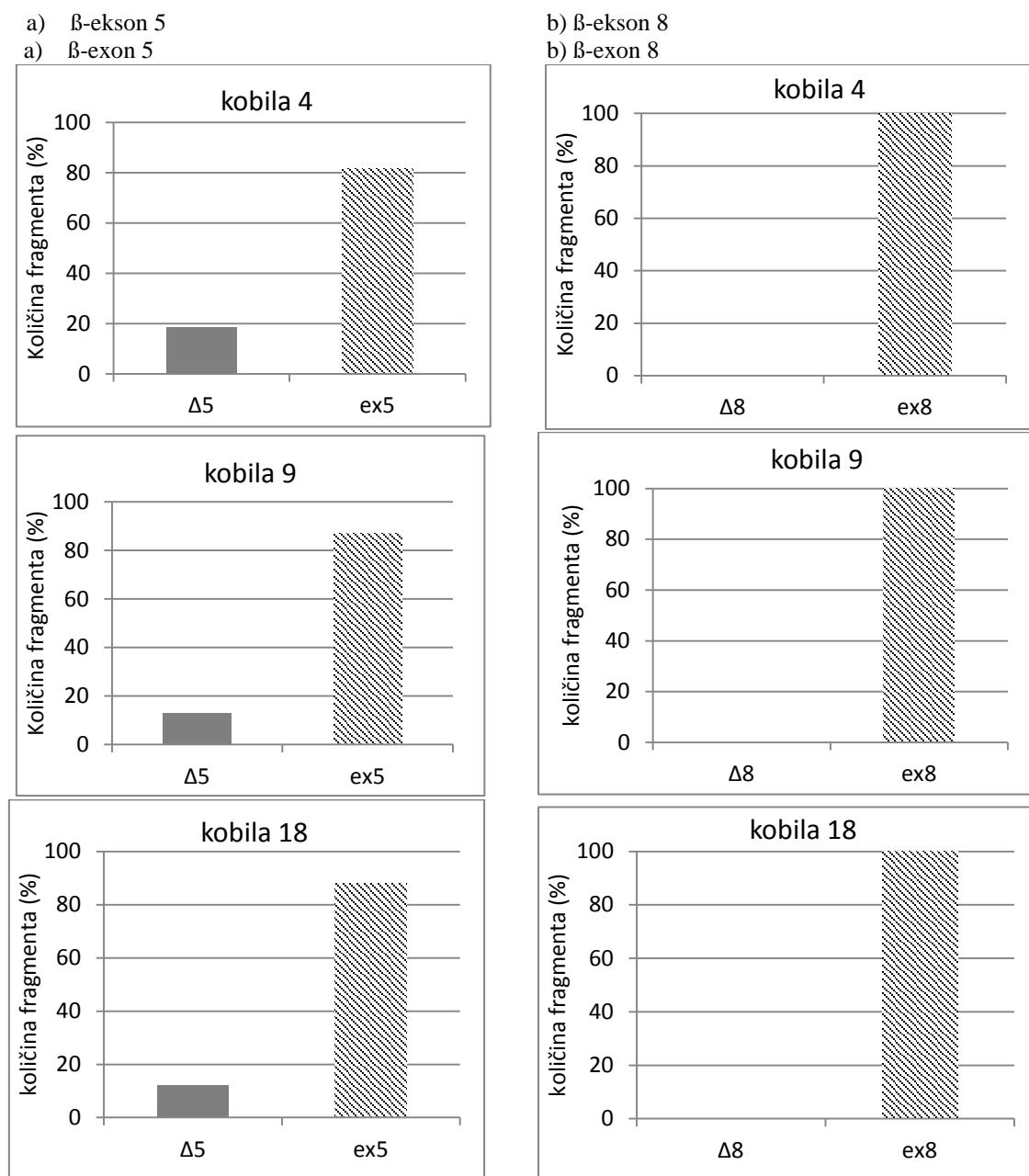
ex5: fragment with exon 5, $\Delta 5$: deletion of exon 5, ex8: fragment with exon 8, $\Delta 8$: deletion of exon 8. * Number of samples: number of mares x number of replication samples per mare

Pri vzorcu vključevanja eksonov (1) je bila količina daljših fragmentov večja kot količina krajših fragmentov v primeru obeh eksonov. Povprečni delež fragmenta z eksonom 5 (daljni fragment, ex5) je bil 85,5 %, povprečni delež fragmenta z eksonom 8 (daljni fragment, ex8) pa kar 100 %. Izmerjena količina krajšega fragmenta ($\Delta 8$) je bila v primeru eksona 8 enaka nič (Preglednica 16).

Pri vzorcu vključevanja eksonov (2) so bile izmerjene količine daljših in krajših fragmentov različne. Povprečni delež fragmenta brez eksona 5 ($\Delta 5$) je bil 68,5 %, v primeru eksona 8 pa je bil delež krajšega fragmenta ($\Delta 8$) le 14,7 % (Preglednica 16).

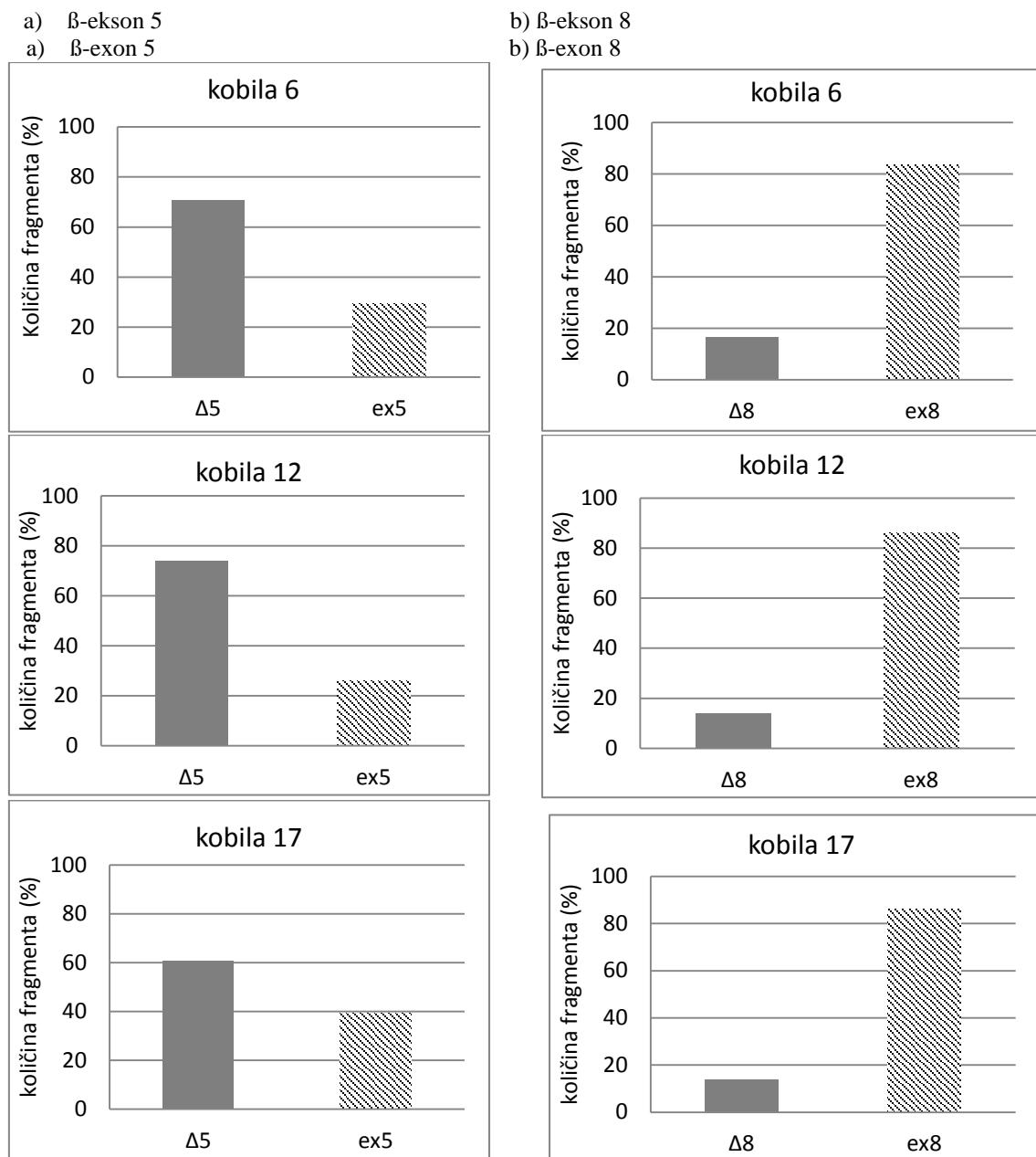
Pri vzorcu vključevanja eksonov (3) je bil povprečni delež krajših fragmentov ($\Delta 5$, $\Delta 8$) še večji, kot v primeru vzorca vključevanja (2). Povprečni delež krajših fragmentov $\Delta 5$ in $\Delta 8$ je bil 92,7 % in 40,6 % (Preglednica 16).

Posamezne vzorce vključevanja prikazujemo na slikah 13, 14 in 15, kjer so prikazani povprečni deleži posameznih fragmentov treh tehničnih ponovitev za vsak biološki vzorec (kobila).



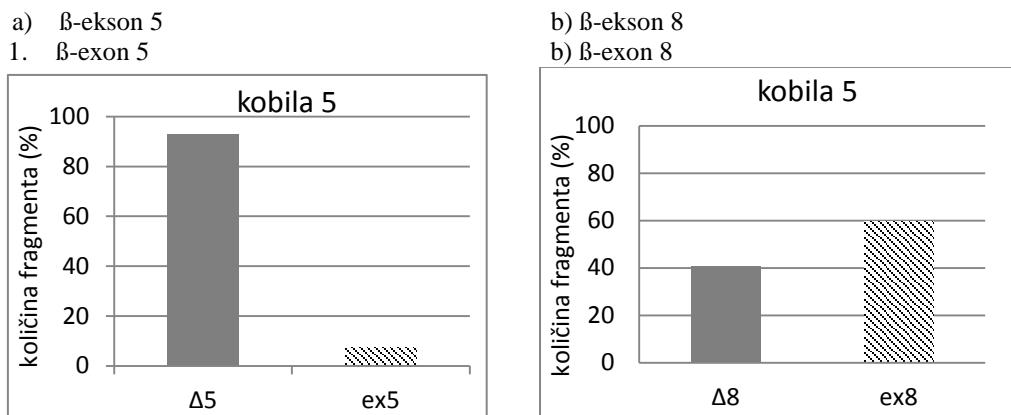
Slika 13: Vzorec vključevanja eksonov (1) pri treh kobilah (4, 9, 18) haplotipa A-T
a) vključevanje β -kazeinskega eksona 5, b) vključevanje β -kazeinskega eksona 8
 $\Delta 5$: brez eksona 5, ex5: z eksonom 5, $\Delta 8$: brez eksona 8, ex8: z eksonom 8

Figure 13: Exon splicing pattern (1) for three mares (4, 9 in 18) of haplotype A-T
a) β -casein exon 5, b) β -casein exon 8
 $\Delta 5$: deletion of exon 5, ex5: with exon 5, $\Delta 8$: deletion of exon 8, ex8: with exon 8



Slika 14: Vzorec vključevanja eksonov (2) pri treh kobilah (6, 12, 17) haplotipa A/T-T/C
 a) vključevanje β-kazeinskega eksona 5, b) vključevanje β-kazeinskega eksona 8
 Δ5: brez eksona 5, ex5: z eksonom 5, Δ8: brez eksona 8, ex8: z eksonom 8

Figure 14: Exon splicing pattern (2) for three mares (6, 12, 18) of haplotype A/T-T/C
 a) β-casein exon 5, b) β-casein exon 8
 Δ5: deletion of exon 5, ex5: with exon 5, Δ8: deletion of exon 8, ex8: with exon 8

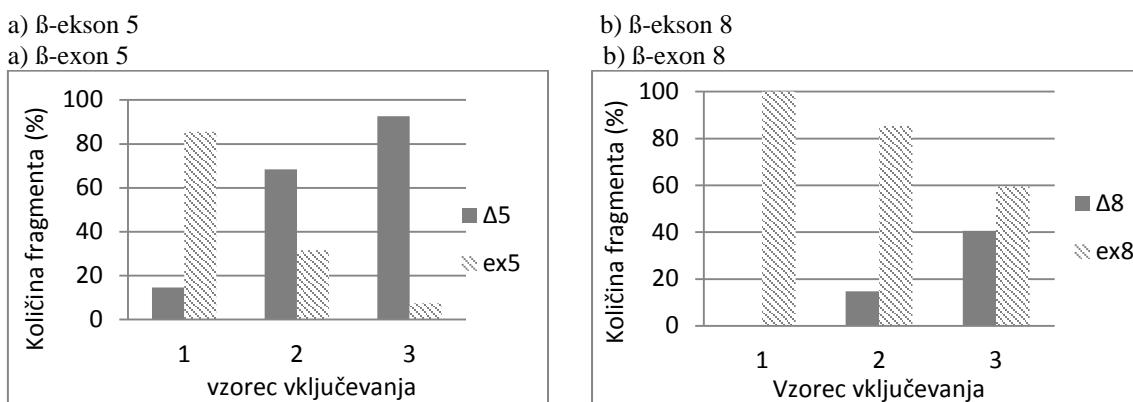


Slika 15: Vzorec vključevanja eksonov (3) pri kobili haplotipa T-C
 a) vključevanje β-kazeinskega eksona 5, b) vključevanje β-kazeinskega eksona 8
 Δ5: brez eksona 5, ex5: z eksonom 5, Δ8: brez eksona 8, ex8: z eksonom 8

Figure 15: Exon splicing pattern (3) for one mare of haplotype T-C
 a) β-casein exon 5, b) β-casein exon 8
 Δ5: deletion of exon 5, ex5: with exon 5, Δ8: deletion of exon 8, ex8: with exon 8

Pri vzorcu (3) vključevanja eksonov 5 in 8 je količinsko razmerje med krajšim in daljšim fragmentom večje, kot pri vzorcu (2), le da daljše oblike v primeru eksona 5 skoraj ni, v primeru eksona 8 pa je prisotna, vendar v manjšem deležu, kot pri vzorcu (2). Količinsko razmerje med krajšim in daljšim fragmentom v primeru eksona 5 je 12,6, kar je za 5,7 x večje, kot v primeru vzorca vključevanja (2).

Na sliki 16 so prikazani vsi trije vzorci vključevanja skupaj (1, 2 in 3), za vsak ekson posebej. Vzorec vključevanja eksonov (1) predstavlja dolgo obliko mRNA, pri katerem sta količini daljših fragmentov največji. Iz diagrama na sliki 16 je razvidno, da se količina daljših fragmentov zmanjšuje z vzorcem vključevanja. Najmanjša količina daljših fragmentov je pri vzorcu vključevanja eksonov (3). Obratno smo opazili za količine krajših fragmentov (brez eksona 5 ali 8), kjer se količina krajšega fragmenta povečuje z vzorcem vključevanja. Pri vzorcu vključevanja eksonov (3) je količina krajšega fragmenta največja.



Slika 16: Vzorci vključevanja β-kazeinskih eksonov 5 in 8 z deleži posameznih fragmentov
 a) vzorec vključevanja eksona 5, b) vzorec vključevanja eksona 8

Figure 16: Splicing patterns of β-casein exons 5 and 8 (%) in percentage of individual fragment
 a) β-casein exon 5, b) β-casein exon 8

4.3 OPTIMIZACIJA 2-D ELEKTROFOREZE LOČEVANJA KAZEINSKIH FRAKCIJ KOBILJEGA MLEKA

Da bi pridobili primerljive gele v fazi, ko je ločljivost kazeinov največja, smo predhodno empirično določili postopek priprave vzorca in pogoje elktroforeze. Določili smo najprimernejšo količino nanosa kazeinov in empirično izbrali primeren gradient pH ter dolžino IPG traku ter primerno velikost gela.

Pri izolaciji kazeinov iz mleka je pomembna odstranitev maščob, kar pri kobiljem mleku ni povzročalo težav, saj je vsebnost maščob v kobiljem mleku majhna. Pri kravjem mleku je plast maščobe veliko debelejša, zato je nujna natačna odstranitev vse maščobe. Ko smo med poskusom ugotovili, da je v vzorcih prisotna zadostna koncentracija kazeinov, smo plast maščobe iz kravjega mleka odtralili tako, da smo skupaj z maščobo odtralili še nekaj preostale usedline s kazeini. Z nakisanjem s HCl smo kazeine oborili in jih s centrifugiranjem v obliki usedline ločili od proteinov sirotke, ki so ostali v supernatantu. Za raztpljanje usedline smo uporabili 8M raztopino uree. Ugotovili smo, da raztpljanje poteka zelo počasi, zato smo si pomagali z nekaj minutno inkubacijo pri 37 °C. Tako pripravljene vzorce smo nato zamrznili pri -80 °C.

Za določitev optimalne količine nanosa kazeinov na gel smo v vsakem vzorcu najprej ocenili koncentracijo kazeinov. Koncentracije kazeinov v nerazredčenih raztopinah so bile visoke in so v nekaterih vzorcih presegale 2500 µg/ml. Vzorce kazeinov smo nato redčili in izmerili koncentracijo kazeinov v vzorcih razredčitve 1:5, 1:10 in 1:100. Ugotovili smo, da so za merjenje koncentracije po metodi, opisani v poglavju 3.11.1, najprimernejše razredčitve v razmerju 1:5 (Preglednica 17). Izmerjene koncentracije izoliranih kazeinov (razredčitev 1:5) so se gibale od 600 do 1000 µg/ml.

Preglednica 17: Izmerjene absorbance nekaterih vzorcev in ocnjene koncentracije kazeinov

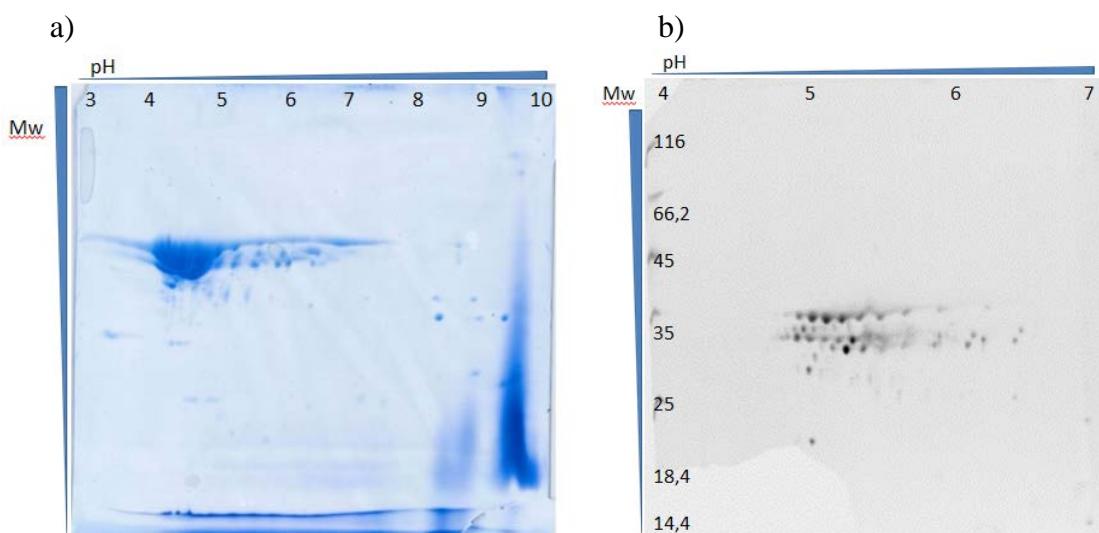
Table 17: The absorbance measured in some samples and their estimated casein concentration

Vzorec	Izmerjena absorbanca je absorbanca uree)	Ocenjena koncentracija (µg/µl)
L4	0,373	1,32
L5(1:5)	0,267	1,04
L6	0,770	2,97
L6(1:5)	0,291	0,97
L7	0,784	3,03
L7(1:5)	0,221	0,68
L9(1:5)	0,193	0,67
L12(1:5)	0,276	1,08
L14	0,338	1,39
L17(1:5)	0,228	0,84
L18	0,665	2,53

Z nanosom različnih količin kazeinov na gel (20 µg, 50 µg in 100 µg) smo empirično ugotavljali optimalno količino nanosa kazeinov na gel. Rezultat empiričnega določanja najprimernejše količine nanosa kazeinov iz kobiljega in kravjega mleka je bil 50 µg.

Vzorec proteinov lahko nanesemo na gel IPG na različne načine. Glede na priporočila iz literature in zaradi enostavnosti metode, smo se odločili za nanos vzorca z rehidracijo. Ta način omogoča tudi nanos večjih količin proteinov že v samo rehidracijsko raztopino. S pomočjo znanih koncentracij kazeinov v vzorcih in potrebne količine rehidracijske raztopine za 18 cm dolg trak IPG (340 µl) smo izračunali potrebno količno vzorca (µl) za nanos 50 µg kazeinov. Rehidracija je potekala pasivno (brez elektične napetosti) pri konstantni temperaturi 10 °C čez noč.

Za določanje optimalnega gradiента pH in dolžine trakov IPG, ki smo jih uporabljali v 1. dimenziji 2-D elektroforeze, smo empirično preizkusili dve različni območji gradiента pH in dve različni dolžini trakov. Najprej smo IEF izvajali na trakovih IPG z gradienptom pH v območju med 3 in 10, dolžine 13 in 18 cm. Zaradi preširokega območja pH ločljivost kazeinov kobiljega mleka ni bila dovolj dobra, kar se je pokazalo kasneje na 2-D gelih. Nadaljevali smo z uporabo trakov IPG z ožjim območjem pH, in sicer s pH med 4 in 7 ter dolžino trakov IPG 18 cm. Z uporabo trakov IPG z gradienptom pH med 4 in 7, so se kazeini kobiljega mleka lepo ločili glede na svojo pI, kar smo kasneje potrdili z dobro ločljivostjo lis (kazeinov) na 2-D gelu (slika 17b). Pri uporabi trakov IPG z gradienptom pH od 3-10 NL (angl. *non linear*) smo pridobili slike 2-D gelov, kot jih prikazuje slika 17a. Kazeini se na 12 % poliakrilamidnem gelu z uporabo trakov IPG z intervalom pH od 3-10 NL ne ločijo med sabo in tvorijo liso, ki ustreza molekulskim masam med 25 in 31 kDa.



Slika 17: 2-D profil kazeinskih frakcij kobiljega mleka po uporabi trakov IPG z različnim intervalom pH a) pH 3-10 NL, gelobarvan z barvilom CBB; b) pH 4-7, gelobarvan z barvilom Sypro Ruby

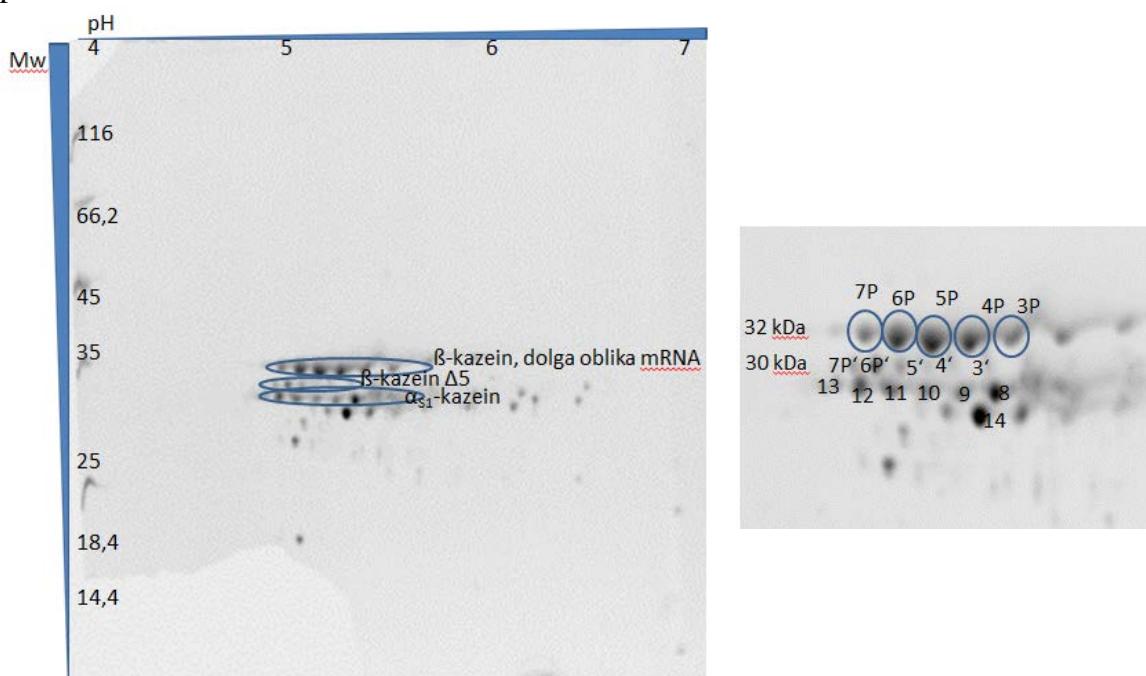
Figure 17: 2-D casein profile of mare milk after IPG Dry Strip pH interval from 3 to 10 NL (a) and 4 to 7 (b) a) pH 3-10 NL, CBB gel staining; b) pH 4-7, Sypro Ruby gel staining

Pogoje fokusiranja smo določili empirično, tako, da smo preizkušali časovno trajanje in električno napetost posameznih stopenj. Postopek poteka pri visoki električni napetosti (do 3500 V) in nizkem toku (pod 1 mA). Med potekom IEF električni tok pada, napetost pa moramo povečevati, saj proteini migrirajo proti svoji izoelektrični točki. Izbrali smo priporočen konstantni tok 0,5 mA na gel (GE Healthcare, 2004), ki pa se je v zadnji fazici fokusiranja močno zmanjšal (tudi na 0,1 mA/gel). Ugotovili smo, da je najprimernejše tri

oz. štiri stopenjsko fokusiranje, ki traja 10,5 ur. Prvi stopnji, ki traja 1 min pri električni napetosti 500 V, smo dodali 2 h druge stopnje pod enako napetostjo z namenom, da smo podaljšali čas fokusiranja v prvi stopnji. V naših vzorcih smo namreč pričakovali sledi soli in manjšo koncentracijo ionov, kar pa zahteva daljši čas fokusiranja pod nizko napetostjo. V tretji stopnji, ki je trajala 1,5 h, smo postopoma povečevali napetost od 500 V do 3500 V in končno v četrti stopnji fokusirali pri najvišji napetosti (3500 V) 7 h. Čas zadnje faze smo določili empirično in ga zreducirali na minimalno potreben čas. Pri podaljševanju zadnje faze smo ugotovili pojav horizontalnih prog na 2-D gelu, kot rezultat prefokusiranja (angl. *over-focusing*). Pri krajanju zadnje faze pod 7 h pa kazeini še niso dosegli svojega neto naboja oz. svoje izoelektrične točke.

4.4 2-D PROFIL KAZEINSKE FRAKCIJE KOBILJEGA MLEKA

Z optimizirano metodo 2-D elektroforeze smo pridobili večje število gelov z 2-D profilom kazeinske frakcije kobiljega mleka. Med seboj smo skušali ločiti 2-D profile kazeinske frakcije glede na vzorec vključevanja eksonov 5 in 8 β -kazeina. Obarvane gele smo fotografirali. Slike 2-D profilov kazeinske frakcije kobiljega mleka smo primerjali s slikami 2-D kazeinskih profilov iz literature (Matéos in sod., 2009a; 2009b; 2010). Ugotovili smo dovolj veliko primerljivost slik s slikami iz literature in na podlagi rezultatov iz literature ocenili, kateri kazein predstavlja posamezna lisa na našem kazeinskem profilu. Za potrditev naše domneve smo za nekatere posamezne lise določili sekvenco kazeina po Edmanu in identificirali nekatere posamezne kazeine iz 2-D profila kazeinske frakcije. Na sliki 18 so prikazane frakcije posameznih kazeinov (levo), desno pa je prikazana povečava odseka kazeinske frakcije iz slike na levi, s podrobnejšo razlagom posameznih lis.



Slika 18: 2-D profil kazeinskih frakcij kobiljega mleka. Oznake od 3P do 7P predstavljajo oblike fosforilacije dolge variante β -kazeina; oznake z strešico ' predstavljajo oblike fosforilacije β -kazeina, skrajšanega za ekson 5 (β -CN^{Δ5}).

Figure 18: 2-D casein fraction profile of equine milk. Signs from 3P to 7P represents phosphorylation variants of full lenght of β -casein; signs with ' represents phosphorylation variants of β -CN^{Δ5}.

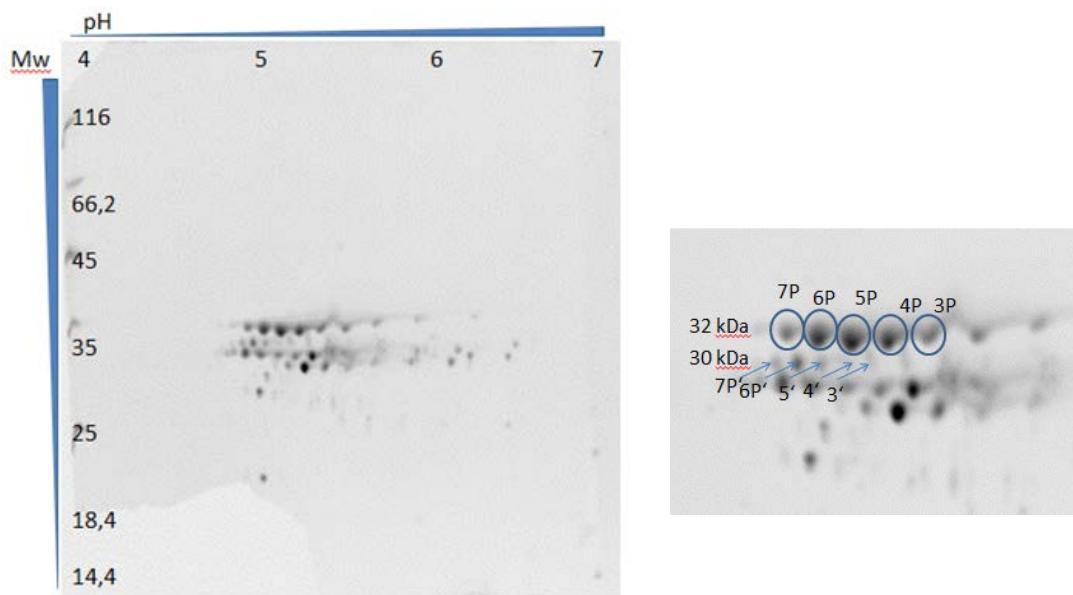
Zgornja veriga lis na območju 32 kDa predstavlja dolgo obliko β -kazeina (β -CN), veriga lis na območju 30 kDa pa krajšo obliko β -kazeina, skrajšanega za ekson 5 (β -CN $^{\Delta 5}$). Spodnja veriga lis predstavlja α_{S1} -kazein na območju 25 kDa. Vsaka veriga lis v horizontalni liniji predstavlja isti kazein v več oblikah fosforilacije. Značilnost za kazeine kobiljega mleka je namreč njihova različna stopnja fosforiliranosti (različno število fosfatnih skupin).

Pri β -kazeinu je lahko število fosfatnih (P) skupin od 3 do 7 (3P do 7P). Lise 3P, 4P, 5P, 6P in 7P predstavljajo fosforilacijske oblike β -kazeina pri dolgi varianti (β -CN). Lise z enakimi številkami in strešico (1', 2', 3', 4', in 5') predstavljajo fosforilacijske oblike β -kazeina pri kratki varianti (β -CN $^{\Delta 5}$) v enakem vrstnem redu, kot si sledijo fosforilacijske oblike pri dolgi varianti β -kazeina, le da so pri kratki varianti fosforilacijske oblike precej manj zastopane in imajo izoelektrično točko pri nižji vrednosti pH. Če je oblike β -CN 3P malo, potem je oblika β -CN 3P' komaj vidna. Lise od 8 do 13 predstavljajo α_{S1} -kazein, za katerega je znano, da se pojavlja v vsaj šestih oblikah fosforilacije in različnih alelnih variantah (alternativno vključevanje eksona 7 in 14). Oblike fosforilacije β - in α_{S1} -kazeina se nahajajo v območju pH od 4,7 do 6,1 (Matéos in sod., 2009a; Matéos in sod., 2009b), na tem območju so ločene tudi lise na naših gelih, s čimer lahko dodatno potrdimo identifikacijo proteinov na gelih.

κ -kazein je na 2-D gelu kazeinov kobiljega mleka težko ločiti, ker se njegova molekulska masa in izoelektrična točka, zaradi posttranslacijskih modifikacij, zelo spremenita in postaneta podobni α_{S1} - in β -kazeinu. Zato κ -kazein na 2-D gelu potuje v območje α_{S1} - in β -kazeina, kar otežuje njegovo prepoznavnost in identifikacijo.

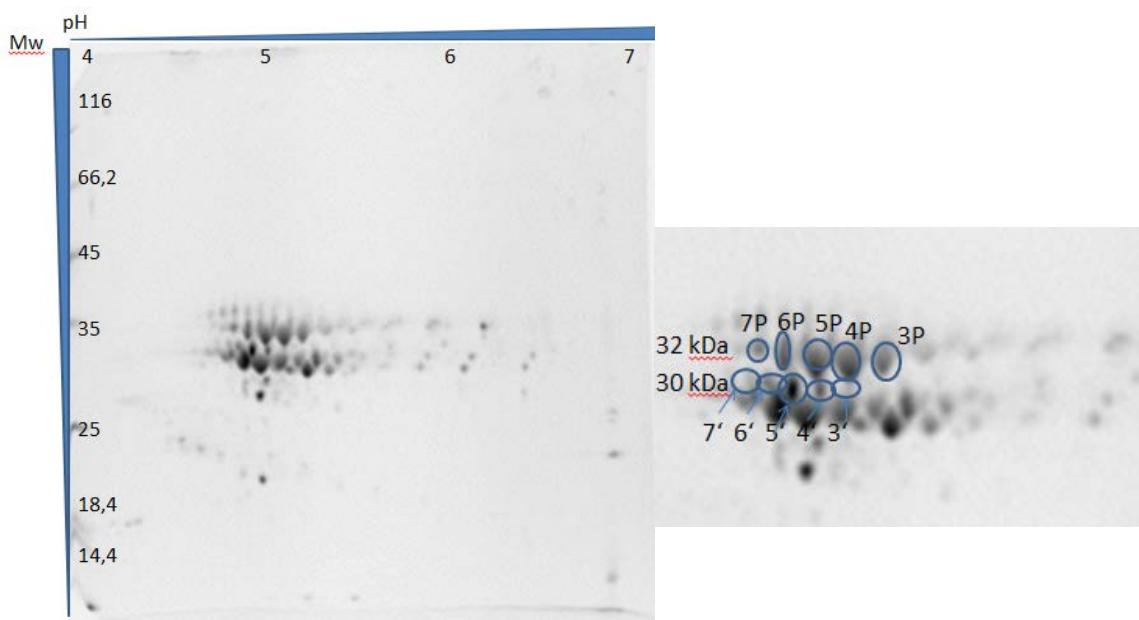
Identificirali (določanje sekvence po Edmanu) smo lise 4P, 8 in 14. Lisa 4P je bila določena kot β -kazein, lisa 8 je bila mešanica α_{S1} - in β -kazeina v ekvimolarnem razmerju, lisa 14 pa je bila identificirana kot α_{S1} -kazein. Na podlagi rezultatov aminokislinske sekvence lis 4P, 8 in 14 na naših gelih smo potrdili naša predvidevanja. Potrdili smo, da veriga lis na območju 32 kDa in 30 kDa pripada β -kazeinu. Prav tako smo za verigo lis pod β -kazeinom na podlagi rezultata sekvence potrdili, da gre za verigo fosforilacijskih oblik α_{S1} -kazeina.

Na slikah od 19 do 21 so prikazane slike 2-D profilov kazeinskih frakcij kobiljega mleka glede na vzorec vključevanja eksonov 5 in 8 gena za β -kazein. Na podlagi 2-D profilov kazeinskih frakcij smo skušali razlikovati vzorce (1, 2 in 3) vključevanja eksonov 5 in 8 gena za β -kazein.



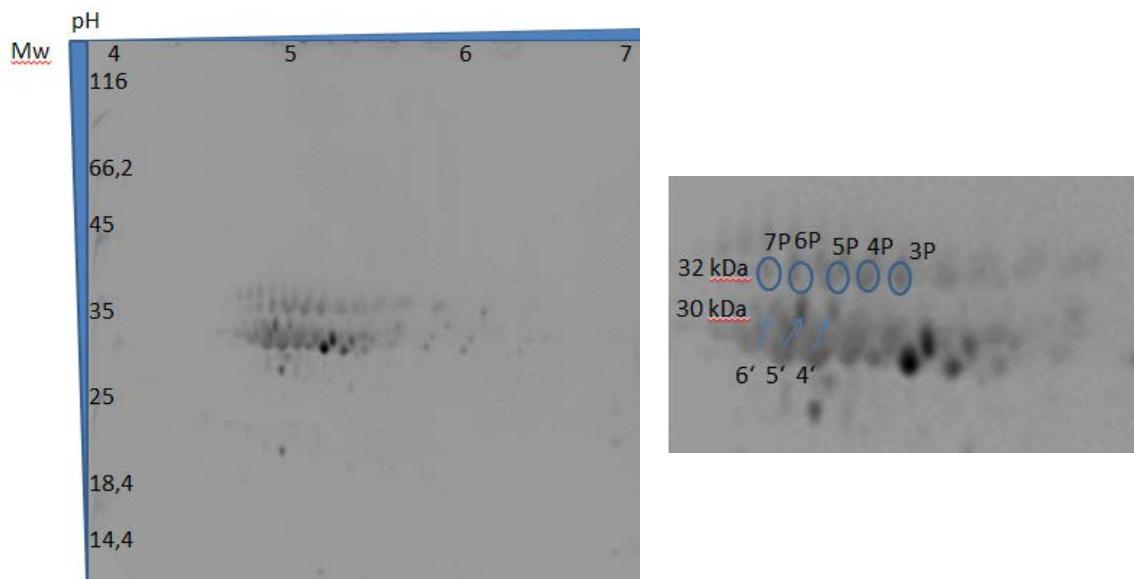
Slika 19: 2-D profil kazeinskih frakcij kobiljega mleka (nanos:50 µg kazeinov), vzorec vključevanja eksonov 1. Oznake od 3P do 7P predstavljajo oblike fosforilacije dolge variante β -kazeina; oznake z strešico ' predstavljajo oblike fosforilacije β -kazeina, skrajšanega za ekson 5 (β -CN $^{\Delta 5}$).

Figure 19: 2-D casein fraction profile of mare milk (50 µg load) where exon skipping pattern 1 was determined. Signs from 3P to 7P represents phosphorilation variants of full lenght of β -casein; signs with ' represents phosphorilation variants of β -CN $^{\Delta 5}$.



Slika 20: 2-D profil kazeinskih frakcij kobiljega mleka (nanos: 50 µg kazeinov), vzorec vključevanja eksonov 2. Oznake od 3P do 7P predstavljajo oblike fosforilacije dolge variante β -kazeina; oznake z strešico ' predstavljajo oblike fosforilacije β -kazeina, skrajšanega za ekson 5 (β -CN^{Δ5}).

Figure 20: 2-D casein fraction of mare milk (50 µg protein load) where exon skipping pattern 2 was determined. Signs from 3P to 7P represents phosphorylation variants of full lenght of β -casein; signs with ' represents phosphorylation variants of β -CN^{Δ5}.



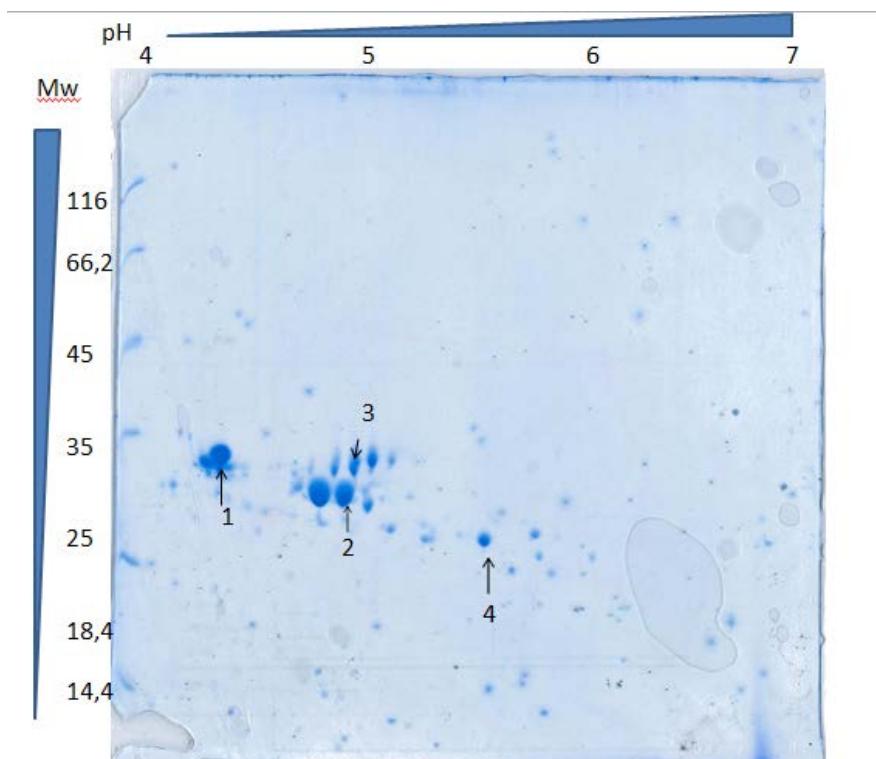
Slika 21: 2-D profil kazeinskih frakcij kobiljega mleka (nanos: 50 µg kazeinov), vzorec vključevanja eksonov 3. Oznake od 3P do 7P predstavljajo oblike fosforilacije dolge variante β -kazeina; oznake z strešico ' predstavljajo oblike fosforilacije β -kazeina, skrajšanega za ekson 5 (β -CN^{Δ5}).

Figure 21: 2-D casein fraction profile of mare milk (50 µg protein load) where exon skipping pattern 3 was determined. Signs from 3P to 7P represents phosphorylation variants of full lenght of β -casein; signs with ' represents phosphorylation variants of β -CN^{Δ5}.

Z uporabo optimizirane metode 2-D elektroforeze smo dosegli primerljivost slik kazeinskih frakcij med posameznimi geli. Med 2-D kazeinskimi frakcijami nismo mogli zanesljivo ločiti vzorcev vključevanja eksonov 5 in 8 pri genu za β -kazein.

4.5 2-D PROFIL KAZEINSKE FRAKCIJE KRAVJEGA MLEKA

Z 2-D elektroforezo smo pridobili tudi slike frakcij kazeinov kravjega mleka. Frakciji kazeinov kravjega in kobiljega mleka sta se razlikovali že na prvi pogled in sta imeli vsaka svoj značilen elektroforetski vzorec. α_{S1} -kazein kravjega mleka je na gelu predstavljal eno veliko liso iz česar sklepamo, da je povsem fosforiliran. α_{S1} -kazein kobiljega mleka pa je na 2-D profilu predstavljal verigo lis (različne oblike fosforilacije).



Slika 22: 2-D profil kazeinskih frakcij kravjega mleka. 1= α_{S1} -kazein; 2= β -kazein; 3 in 4=mešanica več proteinov

Figure 22: 2-D profile of casein fraction from cow milk. 1= α_{S1} -casein; 2= β -casein; 3 in 4=mixture of proteins

Na sliki 22 lisa 1 predstavlja α_{S1} -kazein, lisa 2 predstavlja β -kazein, lisa 3 in lisa 4 sta mešanica več proteinov. Identifikacijo lis 1, 2, 3 in 4 smo potrdili z določanjem aminokislinskega zaporedja po Edmanu.

4.6 DELEŽ POSAMEZNE OBLIKE mRNA β -KAZEINA V KAZEINSKI FRAKCIJI KOBILJEGA MLEKA

Slike 2-D profilov kazeinskih frakcij smo analizirali z računalniškim programom 2-D Dymension, kot je opisano v poglavju 3.12.3. Izračunali smo normalizirane volumne ene in druge oblike β -kazeina za vsak vzorec vključevanja obeh šibkih eksonov β -kazeina. Normalizirane volumne dolge oblike (β -CN) in oblike, skrajšane za eksone 5 (β -CN $^{\Delta 5}$), smo primerjali z izmerjenimi količinami pripadajočih fragmentov cDNA. Kot normaliziran volumen posamezne oblike (β -CN, β -CN $^{\Delta 5}$) smo vzeli vsoto normaliziranih volumnov petih lis, za katere smo predpostavili, da so fosforilacijske oblike β -CN oz. β -CN $^{\Delta 5}$. Normalizirane volumne smo nato izrazili v deležih (Preglednica 18).

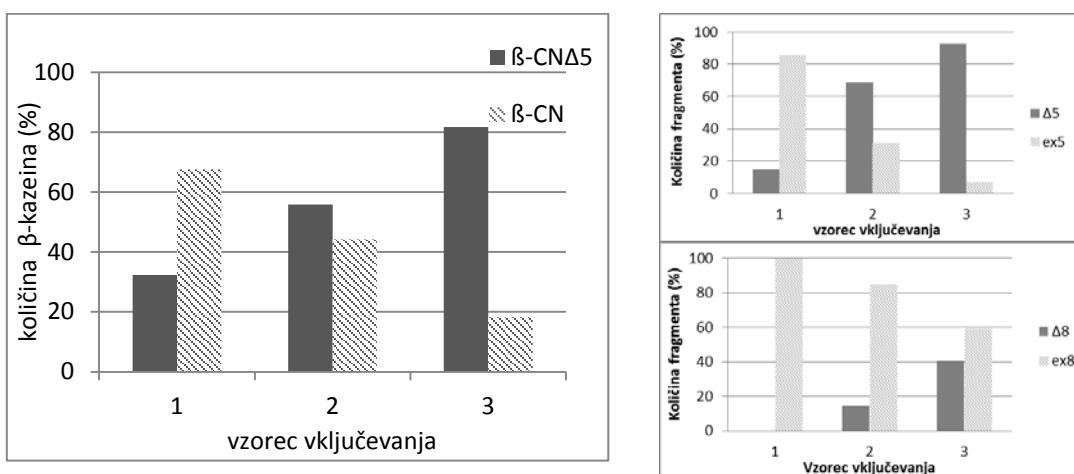
Preglednica 18: Delež posameznih oblik β -kazeina (β -CN, β -CN $^{\Delta 5}$) po posameznem vzorcu vključevanja eksonov

Table 18: The percentage of β -casein variants (β -CN, β -CN $^{\Delta 5}$) for each exon skipping pattern

Vzorec vključevanja eksonov v zrelo mRNA β -kazeina	Delež oblike β -kazeina (%)	
	β -CN	β -CN $^{\Delta 5}$
(1)	62,82	37,17
	72,8	27,19
	62,21	37,78
Povprečje za vzorec vključevanja (1)	67,61	32,38
(2)	43,16	56,83
	45,57	54,41
	43,79	56,2
Povprečje za vzorec vključevanja (2)	44,18	55,81
(3)	18,27	81,72

V preglednici 18 prikazujemo deleže oblik β -kazeina, ki smo jih identificirali na 2-D profilu kazeinske frakcije po posameznem vzorcu vključevanja eksonov. Na ravni proteinov smo našli dolgo obliko β -kazeina in kratko obliko β -kazeina, skrajšano za eksone 5. Med posameznimi vzorci vključevanja eksonov (1, 2 in 3) sta se deleža dolge in kratke oblike β -kazeina razlikovala. Povprečen delež dolge oblike β -kazeina v 2-D profilih kazeinske frakcije pri vzorcu vključevanja eksonov (1) je bil 67,61 %, povprečen delež kratke oblike pa 32,38 %. Povprečen delež dolge oblike β -kazeina v 2-D profilih kazeinske frakcije pri alternativnem vzorcu vključevanja eksonov (2) je bil nekoliko manjši (44,18 %) v primerjavi z deležem kratke oblike β -kazeina, skrajšanega za eksone 5 (55,18 %). Pri vzorcu vključevanja eksonov (3), pa je bil delež kratke oblike β -kazeina večji (81,72 %) od deleža dolge oblike β -kazeina (18,27 %).

Na sliki 23 shematsko prikazujemo primerjavo med deleži daljše in krajše oblike β -kazeina in deleži med krajšim (brez eksona 5 oz. 8) in daljšim fragmentom cDNA (z eksonom 5 oz. 8).



Slika 23: Delež oblik β -kazeína v kazeínskej frakcií (levý) in delež fragmentov cDNA, izmerjen v bioanalizatoru, po posameznem vzorcu vključevania (pravý)

Figure 23: The percentage of β -casein variants in casein fraction by each exon skipping pattern (left) and the percentage of cDNA fragments measured with bioanalizer by each exon skipping pattern (right)

Razmerja med oblikami β -kazeína na ravní proteinov in cDNA (komplementarna mRNA) kažejo enak trend.

Pri vzorcu vključevanja eksonov (1) je bil delež dolge oblike $\beta\text{-CN}$ večji od deleža kratke oblike $\beta\text{-CN}^{\Delta 5}$. Na ravní cDNA sta prav tako deleža dalších fragmentov (z vključením eksonoma) večja od deležev krajších fragmentov (bez vključených eksonov). V primeru alternativného vzorca vključevania eksonov (2) je bola kratka oblika $\beta\text{-CN}^{\Delta 5}$ količinsko bolj zastopaná (55,81 %) od dolge oblike $\beta\text{-CN}$ (44,18 %). V primeru vzorca vključevanja (2) je bil vprimeru eksona 5, kratek fragment v primerjavi z daljším prav tako zastopan v večjem deležu. Pri vzorcu vključevanja (3) se je na proteínskej ravní delež kratke oblike $\beta\text{-CN}^{\Delta 5}$ še povečala, v primerjavi z vzorcem vključevanja (2). Povečanje deleža kratkých fragmentov (bez eksonov) v primeru vzorca izrezovania (3) smo zaznali tudi na ravní cDNA.

4.7 REAKCIJE SPECIFIČNIH PROTITELES IgE S KAZEINI KRAVJEGA IN KOBILJEGA MLEKA

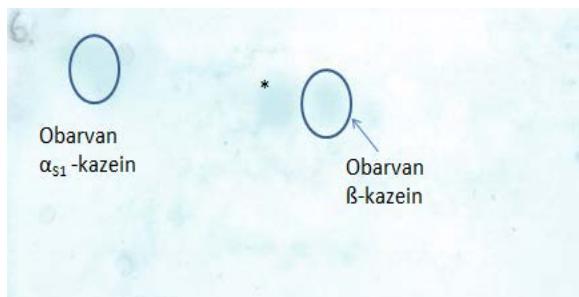
Kazeínske frakcie kobiljega in kravjega mleka smo iz 2-D gelov prenesli na membrane PVDF (Slika 24). Tako pripravljene membrane PVDF s fiksiranimi frakciami kazeínov (antigeni, Ag) smo uporabili za ugotavljanje reakcij antigenov v membrani s specifičnimi IgE (Ab) v serumih alergičnih otrok. Najprej smo na fiksiranih kazeínih v membrani izvedli reakcijo s testnimi vzorci serumov in nato reakcijo detekcije specifičnih protiteles s sekundarnimi protitelesi označenimi z encimom. Potek reakcije Ag-Ab je odvisen od razmerja med antigenom in protitelesi. Zato smo za vsako od komponent imunoencimskega tetsa (kazeíni, serumi in konjugat) določili optimalno koncentracijo (redčitev) s tetsom DIBA. Ugotovili smo, da je primerna količina kazeínov za nanos na membrano, pri kateri lahko reakcijo detektiramo, 5 μg . Pri ugotavljanju primerne redčitve serumov smo ugotovili, da le eden izmed njih vsebuje dovolj veliko koncentracijo protiteles, da smo s tem testom zasledili reakcijo pri redčini serumu 1:2, ostalih serumov pa

nismo redčili. V nadaljevanju smo membrane, na katere smo prenesli kazeine kobiljega in kravjega mleka iz 2-D gelov, inkubirali v serumih otrok in nato še v ustreznih sekundarnih protitelesih (Goat Anti-Human IgE Antybody, Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate, Life Technologies). Po dodatku substrata je s kazeini kravjega mleka reakcija potekla po nekaj minutah, kar nam je pokazala sprememba barve na mestih nekaterih fiksiranih kazeinov (Slika 25 in 26) medtem ko s kazeini kobiljega mleka reakcije nismo opazili (Slika 28).



Slika 24: Kazeinska frakcija kravjega mleka na PVDF membrani po barvanju s CBB

Figure 24: Casein fraction of cow milk on PVDF membrane after CBB staining

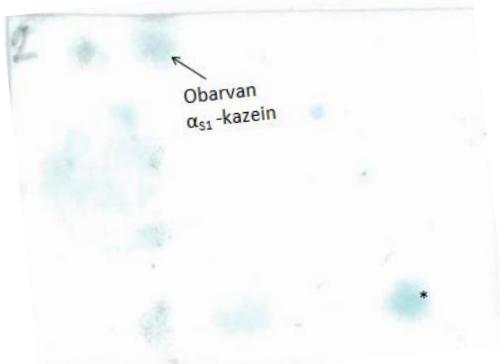


Slika 25: Reakcija kazeinov kravjega mleka s protitelesi IgE iz seruma (1) otroka z alergijo

Figure 25: Ag-Ab reaction when serum (1) of CMA (cow milk allergic) patient was tested

Na sliki 24 prikazujemo 2-D profil fiksiranih kazeinov kravjega mleka v membrani PVDF po prenosu iz 2-D gelov. Membrano smo obarvali s Comassie modrim barvilom (Comassie Brilliant Blue, CBB) za namen analize identifikacije posameznih lis (1, 2, 3 in 4) po Edmanovi degradaciji. Lisa 1 predstavlja α_{s1} -kazein, lisa 2 pa β -kazein kravjega mleka. Lisi 4 in 5 sta mešanici več kazeinov.

Na sliki 25 prikazujemo reakcijo Ag-Ab v primeru kazeinov kravjega mleka. Obarvale so se 3 lise kazeinov. Zaznali smo reakcijo α_{s1} -kazeina in β -kazeina s protitelesi IgE iz vzorca serum (vzorec številka 1) otroka z alergijo. Obarvala se je tudi lisa levo od β -kazeina (*), ki pa je nismo identificirali s sekveniranjem po Edmanu.



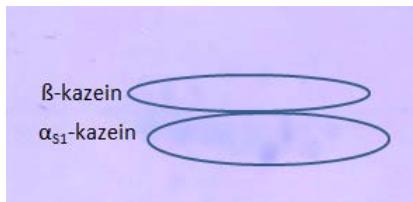
Slika 26: Reakcija kazeinov kravjega mleka s protitelesi IgE iz seruma (2) otroka z alergijo

Figure 26: Ag-Ab reaction when serum (2) of CMA (cow milk allergic) patient was tested

Na sliki 26 prikazujemo reakcijo Ag-Ab v primeru kazeinov kravjega mleka za vzorec serum (vzorec številka 2) drugega otroka z alergijo. V tem primeru smo opazili več

obarvanih lis. Ponovno smo ugotovili reakcijo vezave specifičnih protiteles IgE z α_{s1} -kazeinom.

Ko smo preizkušali reakcijo kazeinov kobiljega mleka s protitelesi IgE iz serumov obenh otrok, le ta s kazeini kobiljega mleka niso reagirala. Obarvanja lis na membrani PVDF s kazeini kobiljega mleka nismo zaznali (Slika 28).



Slika 27: Kazeinska frakcija kobiljega mleka na PVDF membrani po barvanju s CBB

Figure 27: Casein fraction of mare milk on PVDF membrane after CBB staining



Slika 28: Reakcija kazeinov kobiljega mleka s protitelesi IgE iz serumov otrok z alergijo

Figure 28: The reaction of caseins from mare milk with IgE antibody from serum of CMA (cow milk allergic) patient

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Vzorci vključevanja eksonov v zrelo mRNA β -kazeina kobiljega mleka

V procesu alternativnega izrezovanja intronov se iz primarnih transkriptov mRNA introni izrežejo na različnih mestih, eksoni pa se vključijo različno v zrelo mRNA. Rezultat izrezovanja intronov oz. vključevanja eksonov je več oblik zrele mRNA. Nastale oblike mRNA so zelo kompleksne, tako, kot je kompleksen tudi mehanizem alternativnega izrezovanja intronov, ki je le deloma pojasnjen. Pri evkarjontih alternativno izrezovanje poteka pri 40 % do 60 % vseh genov (Zavolan in sod., 2003). Na sam proces alternativnega izrezovanja intronov vplivajo različni dejavniki. Eden izmed glavnih dejavnikov, ki vpliva na uravnavanje alternativnega izrezovanja intronov, je eksonsko-intronska struktura posameznega gena (Fox-Walsh in sod., 2005). Pri evkarijontih je le ta zelo različna. Za vretenčarje so značilni kratki eksoni, ki so obdani z daljšimi introni, pri nižjih evkarjontih pa so značilni kratki introni in eksoni različnih dolžin (Talerico in Berget, 1994). Pri sesalcih so ugotovili, da se v primeru zelo dolgega eksona, ki je obdan z dvema kratkima intronom, le ta vključi v zrelo mRNA (Sterner in sod., 1996). V samem procesu alternativnega izrezovanja intronov sodelujejo številni *cis* in *trans* elementi ter proteinski faktorji, ki večinoma delujejo kot aktivatorji vključevanja eksonov v zrelo mRNA (Fox-Walsh in sod., 2005). Vsi omenjeni dejavniki, ki uravnavajo alternativno izrezovanje intronov, so prisotni v večini celic. V celicah živčnega sistema je alternativno izrezovanje intronov pogost pojav (Stamm in sod., 1992), zelo pogost način uravnavanja izražanja genov pa je tudi za proteine mleka. Največ različnih oblik mRNA so našli pri genih za α_{S1} - in α_{S2} -kazein pri različnih vrstah (Bouniol in sod., 1993; Passey in sod., 1996; Ferranti in sod., 1997; Milenovic in sod., 2002; Lenasi in sod., 2003). Z določanjem zaporedja šibkih eksonov in intronov, udeleženih v procesu alternativnega izrezovanja, so ugotovili razlog za alternativno izrezovanje. Eden od razlogov za alternativno procesiranje mRNA kazeinov so mutacije v bližini mest izrezovanja (Passey in sod., 1996).

Na uravnavanje izražanja prepisovanja gena za β -kazein poleg promotorja za β -kazein vpliva tudi intron 1, saj vsebuje *cis* elemente, na katere se vežejo pomembni transkripcijski faktorji. V zrelo mRNA se pri genu za β -kazein alternativno vključuje ekson 5 (24 bp) in ekson 8 (42 bp), pri čemer je vzorec vključevanja eksonov 5 in 8 odvisen od zamenjav dveh nukleotidov v intronu 1 gena za β -kazein (Lenasi in sod., 2006). Ker so zamenjave nukleotidov (polimorfizmi) genov za kazeine značilne, so jih iskali tudi na drugih mestih (med eksonoma 4 in 6, ter med eksonoma 7 in 9) in ne samo v intronu 1. Našli so štiri polimorfizme v primeru gena za β -kazein, tri v kodirajoči regiji in enega v nekodirajoči regiji. Ugotovili so, da le polimorfizma v intronu 1 vplivata na alternativo vključevanje eksonov. Vpliv obeh polimorfnih mest na vključevanje eksonov so preverili v poskusu izrezovanja intronov rekombinantnih konstruktov v celični kulturi. Ugotovili so, da sta obe polimorfnii mestii v intronu 1 gena za β -kazein del zaporedja ESE, ki je sicer značilno za šibke eksone. V primeru β -kazeina obe mesti v intronu 1 predstavljata ESE le, če sta na polimorfnih mestih nukleotida A (119) in T (269). Domnevali so, da se v procesu izrezovanja na element ESE veže proteinski faktor, ki prepreči kotranskripcijsko prepisovanje intona 1, ta se izreže po transkripciji. Ta proteinski faktor pospeševalno

vpliva na kotranskripcijsko vključevanje šibkih eksonov v zrelo mRNA (Lenasi in sod., 2006). Element ESE vpliva pospeševalno na vključevanje več šibkih eksonov v pre-mRNA (vključevanje eksona 5 in 8 v primeru β -kazeina je povezano). Ugotovili so, da deluje neodvisno od zaporedja nukleotidov okolice, zato je njegov vpliv na izrezovanje možen vzdolž celotnega gena (Lenasi in sod., 2006).

Oba polimorfizma v intronu 1 gena za β -kazein smo našli tudi v naših vzorcih. Polimorfna mesta A (119) in T (269) (haplotip A-T) smo našli pri 15 kobilah, polimorfna mesta T (119) in C (269) (haplotip T-C) le pri eni kobili in haplotip T/A-C/T pri štirih kobilah. Variante na obeh polimorfnih mestih se najverjetneje dedujejo vezano, saj je od vseh 19-ih pregledanih vzorcev kar v 15-ih primerih prevladoval haplotip A-T. Haplotip A-T je prevladoval tudi v dodatno pregledanih vzorcih (24 kobil) znotraj naše raziskave in tudi v 30-ih vzorcih DNA konj v raziskavi Lenasi in sod. (2003). Haplotip A-T torej prevladuje v populaciji lipicanskega konja, kar je verjetno posledica naključnega toka v tako majhni populaciji kot je populacija lipicanskega konja.

Lenasi in sod. (2006) so ugotovili, da so vzorci vključevanja eksonov 5 in 8 v zrelo mRNA β -kazeina povezani z variantami na polimorfnih mestih v intronu 1. Do enake ugotovitve smo prišli tudi v naši raziskavi. Nukleotid A(T) se je pojavil v vzorcih, pri katerih je prevladovala dolga oblika mRNA (z eksonoma 5 in 8). Nukleotid T(C) se je pojavil v vzorcih, pri katerih je prevladovala kratka oblika mRNA (z eksonoma 5 in 8). Heterozigotna varianta (haplotip T/A-C/T) se je pojavila pri vzrocih z alternativnim vključevanjem eksonov 5 in 8. Zasledili smo tri različna razmerja količin/koncentracij daljših in krajiših fragmentov za oba šibka eksona (5 in 8).

V primeru vzorca (1) vključevanja eksonov 5 in 8 v zrelo mRNA je bila v obeh primerih večja količina daljšega fragmenta, torej mRNA z vključenima eksonoma. V primeru eksona 5 je bilo količinsko razmerje med daljšim in krajišim fragmentom 6:1. V primeru eksona 8 pa je bil delež daljšega fragmenta kar 100 %, fragmenta brez eksona 8 sploh nismo zasledili. Do enakih rezultatov so prišli tudi Lenasi in sod. (2006), ki so določili 100 % delež daljšega fragmenta z eksonom 8, fragmenta brez eksona 8 pa niso zaznali. V naši raziskavi sta bila v primeru eksona 5 deleža daljšega in krajišega fragmenta 85,5 % in 14,5 % v raziskavi Lenasi in sod. (2006) pa 93 % in 7 %. Kljub razlikam lahko potrdimo, da gre v obeh raziskavah za prevladovanje daljšega fragmenta, z eksonom 5 v primeru vzorca izrezovanja (1) –dolga oblika zrele mRNA.

Pri alternativnem vzorcu vključevanja obeh eksonov (2) sta izračunana deleža fragmentov z in brez eksona 8 primerljiva rezultatom razsikave Lenasi in sod. (2006). Ravno obrnjeno sliko pa smo dobili pri izračunanih deležih fragmentov z in brez eksona 5. Predvidevamo, da so razlike v deležih fragmentov z in brez eksona 5 možne zaradi zaporedja nukleotidov eksona 5, v katerem ni ojačevalnih zaporedij ESE, kar bi lahko vplivalo na različen pojav ene ali druge mRNA v primeru alternativnega vzorca vključevanja eksonov. Do razlike v deležih daljšega in krajišega fragmenta bi lahko prišlo tudi zaradi različnega števila analiziranih vzorcev. V raziskavi Lenasi in sod. (2006) so analizirali le po en vzorec za vsakega od treh vzorcev vključevanja eksonov, v naši raziskavi pa smo analizirali po tri vzorce za vsakega od treh vzorcev vključevanja eksonov.

V primeru vzorca (3) vključevanja obeh eksonov, smo v primeru eksona 5 ugotovili večji delež krajšega fragmenta (92,7 %) in manjši delež daljšega fragmenta (7,3 %). Količinsko razmerje med krajšim in daljšim fragmentom je bilo večje, kot pri vzorcu vključevanja eksonov (2), le da daljše oblike v primeru eksona 5 skoraj nismo zaznali, v primeru eksona 8 pa je bila prisotna. Količinsko razmerje med krajšim in daljšim fragmentom v primeru eksona 5 je 12,6, kar je za skoraj 6 krat večje, kot v primeru vzorca vključevanja (2).

Razlike v prisotnosti enega in drugega šibkega eksona v vseh treh vzorcih izrezovanja intronov si razlagamo s prisotnostjo močnega elementa ESE v zaporedju nukleotidov eksona 8, ki je lahko vzrok za večji delež fragmenta z eksonom 8 v vsakem vzorcu izrezovanja, v primerjavi z deležem fragmenta z eksonom 5. V zaporedju nukleotidov eksona 5 namreč ni nobenega od znanih elementov ESE (Lenasi in sod., 2006).

Pred kratkim je bila objavljena prva raziskava kobiljega mleka v kateri so ugotovili povezavo med α_{S2} -kazeinom in vsebnostjo beljakovin v mleku (Cieslak in sod., 2016). Brinkmann in sod. (2015) so identificirali poleg variante A še varianto B α_{S2} -kazeina, skrajšano za 17 aminokisl. V nadaljevanju pa so Cieslak in sod. (2016) ugotovili, da imajo kobile poljske hladnokrvne pasme genotipa BB v mleku večjo vsebnost beljakovin v primerjavi s kobilami genotipa AA in genotipa AB. Ugotovili so, da obstajajo pasemske razlike, saj pri drugih pasmah tega vpliva niso zasledili (Cieslak in sod., 2016). V nadaljevanju bi bilo smiselno raziskati ali različne variante β -kazeina kobiljega mleka lipicanskega konja vplivajo na proizvodne lastnosti kobiljega mleka. Če bi bila proizvodnja kobiljega mleka gospodarsko donosna dejavnost, so smiselne tudi tovrstne razsikave. Nedvomno se bo v prihodnje proizvodnja kobiljega mleka povečevala tudi v državah po Evropi, saj ima kobilje mleko ugoden učinek na zdravje ljudi ter je odlična alternativa v prehrani otrok, ki so alergični na proteine kravjega mleka.

5.1.2 Standardizacija 2-D metode za ločevanje kazeinov kobiljega mleka

Dvo-dimenzionalna elektroforeza je metoda ločevanja proteinov z visoko resolucijsko močjo in se kot klasično orodje uporablja v proteomiki. Z 2-D metodo lahko ločujemo kompleksne mešanice proteinov zato je primerna tudi za ločevanje laktoproteinov. Najprej proteine ločimo glede na njihov električni naboj z izoelektričnim fokusiranjem, v drugem koraku pa jih ločujemo glede na njihovo molekulsko maso. Na ta način se vzorec porazdeli na veliki površini in pripomore k boljši ločljivosti. Kompleksnost raziskovanih vzorcev je zelo raznolika, zaradi česar vsak vzorec zahteva svojo optimizacijo metode ločevanja. Na rezultate (vizualizacija proteinov na gelu) lahko vpliva prisotnost soli in drugih primesi v vzorcu. Poleg tega do napak prihaja zaradi slabe ponovljivosti izvedbe ločevanja. Število napak se je zmanjšalo ob zamenjavi tekočih amfolitov za pripravo gradiента pH v fazi fokusiranja, z imobilizacijo gradienta pH (IPG) v gelu samem (Görg in sod., 1988). Če želimo producirati več med seboj primerljivih gelov, z dobro ločljivostjo proteinov, moramo predhodno empirično določiti postopek priprave vzorca, količino nanosa vzorca ter metodo nanosa vzorca in pogoje fokusiranja ter elktroforeze (Ong in Pandey, 2001).

V postopku izolacije kazeinov je potrebno natančno upoštevati mehanske postopke izolacije. Nujna je uporaba visoke hitrosti pri centrifugiraju za popolno ločevanje maščobe iz mleka. Visoka hitrost centrifugiranja je nujna tudi za ločevanje albuminske frakcije od kazeinske. Zicker in Lonnerdal (1994) sta namreč ugotovila, da je pri izolaciji

kazeinov iz kobiljega mleka pomembno, da v postopku upoštevamo visoko hitrost pri centrifugiranju (veliko število vrtljajev na minuto) z ali brez prilagoditve pH na 4,6. Mehanski postopki pri sami metodi izolacije in priprave vzorca, kot so homogeniziranje in centrifugiranje so skupaj z uporabo reagentov, zelo pomembni, saj izboljšajo topnost proteinov. Največkrat uporabljamo reagente (neionske detergente, reducirajoče agense), ki inhibirajo delovanje endogene proteaze in tako preprečijo razgradnjo proteinov (Jungblut in Thiede, 1997). Reducirajoči agensi preprečijo pojav različnega naboja enega proteina, kar bi lahko povzročalo napačno identifikacijo nekega proteina. Prilagoditev pH kobiljega mleka na 4,0, 4,3 ali 4,6 je imela le majhen vpliv na ločevanje kazeinov od sirotkinih proteinov. V našem postopku smo upoštevali pogoje centrifugiranja ob nakisanju z 32 % HCl in prilagoditev pH na 4,6, ki jih priporoča Šmerc (2007) v svoji raziskavi. Ugotavljajo, da pH mleka pri drugih vrstah vpliva na ločevanje kazeinov od sirotkinih proteinov. Pri izolaciji kazeinov iz človeškega mleka priporočajo prilagoditev pH na 4,3, saj imajo nekateri sirotkini proteini izoelektrično točko okoli 4,6 in lahko migrirajo v frakcijo kazeinov. Ko so dodali kalcij v kobilje mleko, je bila kazeinska frakcija (usedlina) enako čista (ni bilo primesi drugih proteinov), v frakciji sirotkinih proteinov (supernatant) pa so se pokazale primesi kazeinov (Zicker in Lonnerdal, 1994). Ločene kazeine v usedlini smo raztopili v urei, s čimer smo razbili sekundarno strukturo kazeinov (denaturacija). Raztopljene v urei smo nato globoko zamrznili (-80 °C). Lahko bi zamrznili usedlino in proteine denaturirali po odtajanju. Ker vpliva postopka metode na samo ločevanje proteinov Jungblut in Thiede (1997) nista ugotovila smo se odločili za raztapljanje v urei pred zamrzovanjem. Tik pred uporabo vzorca smo dodali DTT.

Optimalno ločljivosti kazeinov smo dosegli, ko smo nanesli na gel 50 µg proteinov. Pri nanosu manjših količin kazeinov na gel, nekatere lise niso bile vidne, pri nanosu 100 µg pa so se nekatere lise prekrivale in se niso ločile. Da je ločljivost kazeinov optimalna pri nanosu 50 µg kazeinov navajajo tudi nekateri drugi avtorji (Matéos in sod., 2009a), spet v drugi raziskavi pa navajajo nekoliko večje količine nanosa od 80 µg do 100 µg (Matéos in sod., 2009a, 2009b), verjetno zaradi lažjega ločevanja fosforilacijskih oblik na 2-D profilu.

Za doseganje optimalne ločljivosti proteinov na gelu je pomembna tudi izbira velikosti površine gela. Večji gel namreč omogoča boljšo ločljivost in obratno. Pri izbiri manjših gelov in trakov (13 cm) je delo s trakovi in z gelom sicer lažje, ločljivost proteinov na gelih pa je slabša. Izbira večjih trakov in gelov (24 cm) pa bi oteževala delo že pri samem vstavljanju traku na površino gela in kasneje pri samem prenosu gela, shranjevanju gela, barvanju in fotografiraju gela.

Vsek trak IPG mora biti pred IEF rehidriran. Prednost metode nanosa z rehidracijo je v količini nanosa, ki navzgor praktično ni omejena. Urea iz rehidracijske raztopine denaturira proteine, detergent pripomore k raztapljanju in preprečuje agregacijo, ki bi lahko nastala zaradi hidrofobnih interakcij, reducent razbije disulfidne vezi proteinskih struktur, pufer IPG pa še dodatno poveča topnost proteinov. Rehidracija lahko poteka pasivno, brez napetosti ali aktivno, pod določeno napetostjo. Izbrali smo pasivno rehidracijo, z vzorcem v posodi za fokusiranje, pod konstantno temperaturo 10 °C. Za večino proteinov postopek rehidracije in fokusiranja poteka pri sobni temperaturi. Za proteine kobiljega mleka, predvsem kazeine, pa je značilna neencimatska deamidacija, ki povzroči odprtost strukture proteina, ter posledično večjo občutljivost za proteolitične

encime (Robinson, 2002). Znano je namreč, da deamidacija amidnih skupin proteina poteka pod določenimi pogoji, kot so pH, temperatura, pufer, ionski naboј (Robinson, 2002). Uporaba 150 mM PBS pufra poveča stopnjo deamidacije 2-3x v primerjavi s 150 mM TBS pri pH 7,4 in 37 °C (Robinson in Robinson, 2001; Matéos in sod., 2009a). Če zvišamo vrednost pH, se možnost poteka deamidacije še poveča (Matéos in sod., 2009a). Pri preizkusu SDS-PAGE frakcij β -kazeina 5P in 6P v pogojih, kot so 150 mM PBS, pH 7,4 in 8,4 ter temperaturi 37 °C so Matéos in sod. (2009a) ugotovili, da se v času 24 ur deamidira več kot polovica obeh fosforilacijskih oblik β -kazeina, poteče pa tudi proteoliza. Na gelu so potrdili nove deamidirane oblike β -kazeina, ki so jih označili s 5P/d in 6P/d. Te oblike so tudi hitreje potovale v gelu, verjetno zaradi skupnega večjega negativnega naboja v molekuli. Nove deamidirane oblike so se pojavile med neamidiranimi, npr. β -kazein 5P/d je migriral med β -kazein 5P in β -kazein 6P. Na ta način so ugotovili, da se lahko izognemo procesu deamidacije, če zagotovimo določene pogoje že v času rehidracije, fokusiranja in 2-D-elektroforeze. Zaključili so, da se procesu deamidacije lahko izognemo že z zmanjšanjem temperature v času rehidracije in elektroforeze na 10 °C (Matéos in sod., 2009a). Vse omenjene rezultate in ugotovitve že opravljenih raziskav smo upoštevali pri standardizaciji 2-D elektroforeze za ločevanje kazeinov kobiljega mleka.

V času rehidracije se gel najprej rehidrira, v procesu fokusiranja pa se proteini v gelu premikajo v električnem polju glede na svoj naboј, dokler vsak ne doseže svoje točke, ko je njegov neto naboј enak nič (izoelektrična točka) in zato se v tem delu traku ustali (fokusiranje). V naši raziskavi je fokusiranje potekalo 10,5 h v štirih stopnjah, pri temperaturi 10 °C. Pogoje fokusiranja smo določili empirično, tako, da smo preizkušali čas in električno napetost posameznih stopenj. Na osnovi literturnih podatkov (GE Healthcare, 2004; Görg in sod., 2007) smo izbrali konstantni tok 0,5 mA na gel. Prekoračitev priporočene zgornje meje toka (0,5 mA na gel) namreč lahko povzroči pregrevanje in posledično poškodbe na gelu (GE Healthcare, 2004). Priporočilo za fokusiranje je fokusiranje v več stopnjah z začetno stopnjo pri najmanjši napetosti (GE Healthcare, 2004). V naši raziskavi smo upoštevali vsa priporočila in uporabili štiri stopenjsko fokusiranje. Začeli smo z manjšo napetostjo (500 V) in v zadnji fazi zaključili z največjo napetostjo (3500 V). Čas zadnje faze smo določili empirično in ga zreducirali na minimalni potreben čas (7 ur), ter tako preprečili pojav prefokusiranja. Če smo zadnjo fazo podaljšali iz 7 na 9 ur, so se kasneje na 2-D gelu pojavile horizontalne lise. Podobne ugotovitve predolgega fokusiranja navajajo tudi nekateri protokoli (GE Healthcare, 2004; Görg in sod., 2007). V kolikor proteni niso popolnoma denaturirani je rezultat slaba ločljivost lis na 2-D gelu.

V drugi dimenziji smo uporabili 12 % poliakrilamidni gel, na katerega smo vstavili trak IPG z ločenimi kazeini glede na njihovo izoelektrično točko. Metodo druge dimenzije smo izvedli po priporočilih iz literature (Görg in sod., 2007; GE Healthcare, 2004). 2-D profili kazeinskih frakcij iz kobiljega in kravjega mleka so se že na prvi pogled ločili med sabo in tvorili značilne kazeinske profile. Ko smo 2-D profile kazeinskih frakcij kobiljega mleka primerjali z 2-D profili iz literature smo dobili primerljive rezultate (Matéos in sod., 2009a; Matéos in sod., 2009b; Egito in sod., 2002). Za kazeine kobiljega mleka je značilen popolnoma drugačen kazeinski profil, kot za kazeine kravjega mleka, kar potrjuje medvrstno variabilnost v sestavi in strukturi kazeinov. Za β -kazein so značilne različne oblike. Dolgo obliko β -kazeina (angl. *full lenght* β -CN) so identificirali v mleku kobil-

pasme haflinger (Girardet in sod., 2006). Skrajšano obliko β -kazeina za ekson 5 ($\beta\text{-CN}^{\Delta 5}$) so identificirali v mleku ponijeve pasme welsh (Miranda in sod., 2004). Našli pa so tudi tretjo varianto β -kazeina, ki je skrajšana za pretežni del (75 %) eksona 7 (Miclo in sod., 2007; Lenasi in sod., 2006) v mleku kobil pasme haflinger. Na kazeinskem profilu so Matéos in sod. (2009a) ločili in kasneje identificirali dve obliki β -kazeina, $\beta\text{-CN}$ in $\beta\text{-CN}^{\Delta 5}$. Na 2-D profilu se je dolga oblika β -kazeina pokazala v obliku verige lis na območju 32 kDa, krajša oblika pa na območju 30 kDa. Enak kazeinski profil smo ugotovili tudi na 2-D profilih kazeinskih frakcij v našem poskusu. Glede na pozicijo lis smo ločili verigo lis na območju 32 kDa in na območju 30 kDa ter predpostavili, da smo ločili $\beta\text{-CN}$ in $\beta\text{-CN}^{\Delta 5}$. Na območju 25 kDa smo ločili še eno verigo lis, za katero smo predvidevali, da gre za α_{S1} -kazein (Egito in sod., 2002).

Poleg različnih oblik kazeinov kobiljega mleka so na 2-D profilu ločili tudi različne fosforilacijske oblike (Matéos in sod., 2009a). Fosforilacijske oblike so značilne predvsem za α_{S1} - in β -kazein, ki se na 2-D profilu kažejo v oblikah verige lis na območju pH od 4,4 do 5,9 (Matéos in sod., 2009a; Matéos in sod., 2009b). Na tem območju smo značilne verige lis za omenjena kazeina ločili tudi na naših 2-D gelih. Za β -kazein smo ločili 5 do 7 lis, za katere smo predvidevali, da predstavljajo različne fosforilacijske oblike, ki vsebujejo različno število fosfatnih skupin (P) od 3 do 7 in predstavljajo β -kazein od 3P do 7P. β -kazein 3P ima izoelektrično točko pri najvišji vrednosti pH, zato je lociran desno v verigi lis. β -kazein 7P ima izoelektrično točko pri najnižji vrednosti pH, zato je lociran levo v verigi lis (Matéos in sod., 2009a). Na vsakem 2-D profilu smo zasledili podobnost v zastopanosti posameznih fosforilacijskih oblik. Najbolj sta bili zastopani obliki β -kazein 4P in 5P, kar se je kazalo z močnejšo liso. Lise, ki predstavljajo β -kazein 3P ali 7P so bile večkrat slabo vidne, kar pomeni, da so te oblike prisotne v manjših koncentracijah. Do enakih rezultatov so prišli tudi Matéos in sod. (2009a), ki navajajo manjšo zastopanost β -kazeina 3P in 7P. Na 2-D profilu smo zaznali manjšo zastopanost verige lis na območju 30 kDa, verjetno zaradi manjše vsebnosti krajše variante β -kazeina. Poleg tega smo opazili povezavo v zastopanosti lis $\beta\text{-CN}$ 3P in $\beta\text{-CN}^{\Delta 5}$ 3P. Če je bila lisa $\beta\text{-CN}$ 3P v verigi na območju 32 kDa komaj vidna, lise $\beta\text{-CN}^{\Delta 5}$ 3P na območju 30 kDa nismo zaznali. Vse lise v verigi na območju 30 kDa so se nahajale na bolj kislem območju pH. Enake rezultate navajajo tudi Matéos in sod. (2009a), ki so posamezne lise identificirali in izračunali njihove pripadajoče molekulske mase. Ugotovili so tudi, da pri ločevanju posameznih fosforilacijskih oblik β -kazeina motijo tudi deamidacijske oblike β -kazeina (Matéos in sod., 2009a). Matéos in sod. (2009a) so v raziskavi ugotovili, da se deamidacijskim oblikam β -kazeina lahko izognejo tako, da fokusiranje poteka pri nižji temperaturi in sicer pri 10 °C, kar smo upoštevali v naši raziskavi in se tako izognili nastanku in migraciji deamidacijskih oblik v območje fosforilacijskih oblik.

Z obdelavo slik smo preučevali ali lahko na osnovi 2-D profila kazeinske frakcije prepoznamo vzorec vključevanja eksonov 5 in 8 v zrelo mRNA β -kazeina. Za vsak vzorec vključevanja eksonov v zrelo mRNA smo na ravni RNA in proteinov ugotovili enak trend. Na kazeinskih profilih s prevladajočo dolgo obliko β -kazeina (vzorec vključevanja eksonov (1)) smo že na prvi pogled opazili večjo intenzivnost lis v verigi na območju 32 kDa (dolga varianta β -kazeina). Po obdelavi slik s programom 2-D Dymension (Syngene) smo za verigo lis, ki predstavlja dolgo varianto β -kazeina izračunali večje normalizirane volumne, za verigo lis, ki predstavlja kratko varianto, pa manjše. Razmerja med $\beta\text{-CN}/\beta$ -

$\text{CN}^{\Delta 5}$ (2,08) in $\text{Ex5}/\Delta 5$ (6,1) nista popolnoma primerljiva, kjub vsemu pa oba kažeta na večji delež dolge oblike β -kazeina. Neenaka razmerja so lahko vsaj delno tudi posledica napačne analize slik, v kateri smo lahko vključili napačne lise ali pa so v posamezne lise migrirali tudi drugi kazeini.

V primeru alternativnega vzorca vključevanja eksonov (2) smo na kazeinskem profilu ugotovili, da obe verigi lis, tako na območju 32 kDa, kot na območju 30 kDa nakazujeta skoraj enako intenziteto lis. Po obdelavi slik s programom 2-D Dymension (Syngene) smo za verigo lis, ki predstavlja dolgo varianto β -kazeina, izračunali večje normalizirane volumne, za verigo lis, ki predstavlja kratko varianto pa nekoliko manjše. Za razliko od vzorca vključevanja eksonov (1) je bil delež dolge oblike manjši, delež kratke oblike pa večji. Razmerja med $\beta\text{-CN}/\beta\text{-CN}^{\Delta 5}$ in $\text{Ex5}/\Delta 5$ sta 0,79 in 0,46 in kažeta na enak trend tako na ravni RNA kot tudi na ravni proteinov. Tudi tukaj je lahko vzrok neenakih razmerij nenatančna analiza slik, saj lis nismo identificirali, ampak jih karakterizirali le na podlagi pozicije lis.

Kazeinski profil s prevladajočo kratko obliko β -kazeina (vzorec vključevanja eksonov (3)) smo pridobili le iz vzorca mleka ene živali. Na samem kazeinskem profilu smo opazili večjo intenziteto lis v verigi na območju 30 kDa (kratka varianta β -kazeina) v primerjavi z verigo lis na območju 32 kDa. Po obdelavi slik s programom smo za verigo lis, ki predstavlja kratko varianto β -kazeina izračunali večje normalizirane volumne, za verigo lis, ki predstavlja dolgo varianto pa manjše. Razmerja med $\beta\text{-CN}/\beta\text{-CN}^{\Delta 5}$ (0,22) in $\text{Ex5}/\Delta 5$ (0,08) sta primerljiva, oba kažeta na večji delež kratke oblike β -kazeina.

Na podlagi kazeinskih 2-D profilov, pridobljenih po uporabljenem postopku, lahko predpostavimo identiteto posamezne kazeinske lise, ne moremo pa je z zagotovostjo identificirati. Za natančnejšo identifikacijo kazeinske lise iz tako pridobljenih 2-D profilov je potrebno določiti še aminokislinsko zaporedje, ter na ta način potrditi predpostavljeno identiteto kazeina. Za ločevanje različnih variant posameznega kazeina, v našem primeru $\beta\text{-CN}$ in $\beta\text{-CN}^{\Delta 5}$ pa predlagamo postopek in metode, ki jih opisujejo Matéos in sod. (2009a; 2010) in Egito in sod. (2002). V prvi vrsti predlagamo spremembo postopka izolacije tako, da se izolira le β -kazein, saj je ločevanje posameznih kazeinov oteženo zaradi posttranslacijskih sprememb. Za pripravo kazeinske frakcije predlagamo izoelektrično precipitacijo pri pH 4,2, kot jo opisujejo Egito in sod. (2002). Kot priporočata Egito in sod. (2002) in Matéos in sod. (2009a) nato kazeinsko frakcijo ločimo z uporabo ionsko izmenjevalne kromatografije (angl. *ion-exchange chromatography-IEC*) in tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z reverzno fazo (angl. reversed-phase HPLC) ali z uporabo dvodimenzionalne elektroforeze. Za karakterizacijo α_{S1-} , β - in κ -kazeina iz kobiljega mleka bolj priporočajo kombinacijo IEF in SDS-PAGE kot kombinacijo urea-PAGE in SDS-PAGE. Pri kombinaciji IEF in SDS-PAGE dosežemo boljšo ločljivost glede na izoelektrično točko (Egito in sod., 2002; Matéos in sod., 2009a).

Zaradi post-translacijskih modifikacij, kot je fosforilacija pri β -kazeinu, nastane več fosforilacijskih oblik tega kazeina, ki se med seboj razlikujejo v stopnjah fosforilacije, ki otežejo njihovo identifikacijo na 2-D profilu. Za izboljšanje ločljivosti takoj variant, ki nastanejo zaradi alternativnega izrezovanja intronov, kot tudi variant, ki nastanejo zaradi fosforilacije, je predhodno priporočena uporaba IEC. Posamezne fosforilacijske variante pa

lahko identificiramo z uporabo masne spektrometrije. Najpogosteje se uporablja elektrosperj ionizacija (ESI) in ionizacija s pomočjo laserske svetlobe (MALDI). Metodi z izbiro ustreznega reagenta (reagenti različne izotopske sestave) omogočata usmerjeno in selektivno označevanje funkcionalnih skupin v polipeptidih. Masna spektrometrija se na področju proteomike v zadnjih letih hitro razvija in postaja močno orodje za analizo proteinske sestave bioloških sistemov. Zelo uporabna je tudi za analizo posttranslacijskih modifikacij proteinov, njen razvoj pa se usmerja v analizo izražanja proteinov v celičnih sistemih (Cox in Mann, 2007; Križaj, 2008).

5.1.3 Reakcija protiteles IgE s kazeini kravjega in kobiljega mleka

Prebavljeni frakciji nekaterih proteinov mleka lahko sprožijo nastanek protiteles IgE, IgA, IgM in IgG, ki povzročijo kompleksne, spremenljive imunske reakcije. Med važnejše alergene spadajo kazeini in β -laktoglobulin, omenjene pa so bile tudi alergije na manj pomembne proteine, kot so goveji imunoglobulini in albumin (Restani in sod., 2009). V naši raziskavi smo za namen preverjanja imunogenosti kazeinov pripravili gele s profilom kazeinske frakcije kobiljega in kravjega mleka. Pripravljene membrane s prenesenimi kazeini smo uporabili za preverjanje reakcije s protitelesi IgE v serumih ljudi, alergičnih na kravje mleko. Potrdili smo reakcijo protiteles IgE s kazeini iz kravjega mleka, kjer so se protitelesi IgE vezala na α_{S1} - in β -kazein. V primeru kazeinov iz kobiljega mleka reakcije nismo potrdili, kar pomeni, da specifična protitelesa IgE niso prepoznala kazeinskih IgE epitopov.

Podobne rezultate so ugotovili tudi Businco in sod. (2000), ki so v svoji raziskavi ugotavljali alergenost kobiljega mleka pri otrocih, občutljivih za proteine kravjega mleka. Zbrali so serume 25-ih otrok, občutljivih za proteine kravjega mleka. Rezultati immunskih reakcij v imunoencimskih testih so pokazali, da nekateri proteini kravjega mleka močno reagirajo s človeškimi IgE. To so bili predvsem α -laktalbumin, β -laktoglobulin in kazeini. Pri 72 % otrok so ugotovili reakcijo vezave specifičnih protiteles IgE z α -laktalbuminom in kazeini kravjega mleka. Ko so testirali kobilje mleko so dobili pozitivne reakcije z veliko manjšim odstotkom serumov. Šest od 25 serumov je reagiralo s α -laktalbuminom in β -laktoglobulinom kobiljega mleka, s kazeini kobiljega mleka je reagiralo le 5 serumov. Vzrok za različno reakcijo serumov s proteini kravjega ali kobiljega mleka so pripisali različni aminokislinski sestavi nekaterih proteinov kobiljega mleka. Epitopi, relevantni za vezavo IgE, so lahko v kobiljem mleku popolnoma drugačni ali pa sploh niso prisotni (Businco in sod., 2000).

Eden izmed glavnih alergenov med proteini mleka je β -kazein kravjega mleka. Pri kar 92 % serumov bolnikov, ki so alergični na kazeine kravjega mleka, so dokazali vezavo IgE na epitope β -kazeina (Bernard in sod., 2000). Tudi v naši raziskavi smo potrdili vezavo IgE na β -kazein kravjega mleka. Cantisani in sod. (1997) so poročali o prisotnosti specifičnih IgE proti proteinom človeškega mleka pri atopičnih otrocih. V nadaljevanju so ugotovili, da protitelesa teh otrok reagirajo tudi z β -kazeinom kravjega mleka (angl. *cross-reactivity*). Tudi pri otrocih, ki so bili izključno samo dojeni in nikoli prej niso prišli v stik s kravjim mlekom, se je pokazala alergija na β -kazein kravjega mleka. Ti otroci so imeli tudi povišano raven protiteles IgE v serumu. Te ugotovitve so nadalje preiskovali Bernard in sod. (2000) in ugotovili, da imata človeški in kravji β -kazein določena homologna zaporedja na epitopih za vezavo IgE.

Zanimiva je ugotovitev, da tudi stopnja fosforilacije določenega kazeina v kravjem mleku vpliva na vezavo specifičnih IgE protiteles na epitope kazeina (Cases in sod., 2011). Da so ugotovili vpliv stopnje fosforilacije kazeina so kazein razgradili s Tyr/Ser/Thr fosfatazo in na ta način iz polipeptidne molekule odcepljali fosfatne skupine, vezane na kazein. Po cepitvi fosfatnih skupin je kazein na svoje epitope lahko vezal specifična protitelesa IgE. Domnevali so, da te spremembe vplivajo na aminokislinsko zaporedje IgE epitopa (zaporedje na delu kazeina, ki prepozna protitelesa IgE), posledično pa IgE teh epitopov ne prepozna več (Cases in sod., 2011). V zvezi s temi ugotovitvami lahko sklepamo, da je kobilje mleko manj alergeno tudi zaradi visoke stopnje fosforilacije α_{S1} - in β -kazeina (vsebujeta od 5 do 7 fosfatnih skupin), zaradi česar je lahko zaporedje aminokislin epitopa različno od tistega na α_{S1} - ali β -kazeinu kravjega mleka. Poleg tega lahko del razlike v epitopu pripisemo tudi razlikam v strukturi proteina (Sharma in sod., 2001). Za terciarno strukturo vsakega proteina so namreč značilne zanke. Zanke so si lahko med posameznimi proteini zelo podobne ali pa različne. Tako so za α -laktalbumin in β -laktoglobulin ugotovili zelo veliko podobnost v strukturi alergenih mest oz. zank (Sharma in sod., 2001). Oba proteina sta alergena. Če primerjamo med seboj strukturo posameznega kazeina kobiljega in kravjega mleka ugotovimo le delno identičnost. Delež aminokislinske identičnosti α_{S1} -kazeina kravjega in kobiljega mleka je 42 %, β -kazeina 55 % in κ -kazeina 57 % (Lenasi in sod., 2006). Zaradi velikih razlik v strukturi posameznega kazeina kravjega in kobiljega mleka lahko sklepamo, da je tudi zaporedje aminokislin epitopov različno, kar lahko pri eni vrsti privede do alergenosti pri drugi vrsti pa alergenosti ni. Del razlike v epitopu lahko verjetno pripisemo tudi razlike v strukturi kazeina kravjega in kobiljega mleka.

Glede na naše ugotovitve in rezultate nekaterih raziskovalcev (Businco in sod., 2000; Bernard in sod., 2000; Restanti in sod., 2009) lahko zaključimo, da bi lahko kobilje mleko nadomestilo kravje mleko v prehrani otrok, ki so občutljivi za proteine kravjega mleka. Kljub temu je potrebna previdnost pri uporabi kobiljega mleka v prehrani alergičnih otrok, saj alergenost kobiljega mleka ni popolnoma izključena. V našem primeru smo primerjali le alergenost kazeinov, izključili pa smo sirotkine proteine, ki pa so mnogokrat najbolj alergeni (Niemi in sod., 2007). Zato ne moremo izključiti reakcij vezave IgE v primeru preučevanja vseh proteinov kobiljega mleka. Poleg tega so protitelesa IgE v serumih alergičnih otrok namreč nastala proti epitopom kazeinov kravjega mleka. Ni pa znano ali bi isti posamezniki tvorili IgE protitelesa tudi proti kazeinom kobiljega mleka, če bi kobilje mleko konzumirali že od rojstva. Aminokislinsko zaporedje nekega kazeina se med vrstama razlikuje, razlikujejo se tudi njuni epitopi, ki inducirajo nastanek IgE protiteles. Na podlagi rezultatov naše raziskave lahko rečemo, da kazeini kobiljega mleka nimajo enakih epitopov, kot jih imajo kazeini kravjega mleka. IgE protitelesa proti kazeinom kravjega mleka namreč niso reagirala z epitopi kazeinov kobiljega mleka, ker jih niso prepozna.

Če povzamemo, so vzroki za razlike v alergenosti kazeinov kravjega in kobiljega mleka različni. Identičnost zaporedja aminokislin je med kazeini kobiljega in kravjega mleka od 42 % do 57 %, kar pomeni, da se med seboj precej razlikujejo že v primarni strukturi. Zaradi razlik v zaporedju aminokislin so razlike tudi v epitopih. Relevantni epitopi za vezavo IgE, so lahko v kobiljem mleku popolnoma drugačni ali pa sploh niso prisotni (Businco in sod., 2000). Odkrili so, da sta dva najbolj močna epitopa locirana v pentljji β -laktoglobulina (Niemi in sod., 2007). Pri antigenih proteinov lahko epitopi vključujejo

elemente primarne, sekundarne, terciarne in celo kvartarne zgradbe proteina. Tako lahko pri proteinih, kjer je epitop lociran v pentlji, protitelesa prepozna tudi sterično konformacijo in ne samo zaporedje aminokislin epitopa. Med take vrste proteinov spadajo tudi kazeini. V naši raziskavi smo z imunoencimskim testom potrdili verjetnost, da se epitopi β -kazeina kravjega mleka in epitopi β -kazeina kobiljega mleka razlikujejo. Protitelesa IgE iz seruma otrok, alergičnih na proteine kravjega mleka, niso prepoznala morebitnih potencialnih alergenih mest na β -kazeinu kobiljega mleka.

Verjetnost pojava alergijskih simptomov ob konzumaciji kobiljega mleka je pri otrocih, alergičnih na proteine kravjega mleka, veliko manjša. Vendar pa raziskovalci opozarjajo, da se lahko zaradi povečane rabe kobiljega mleka v prihodnosti pojavijo navzrižne reakcije med proteini iz kravjega mleka in proteini kobiljega mleka (Gall in sod., 1995).

5.2 SKLEPI

1. V vzorcih DNA kobil lipicanske pasme prevladuje haplotip A(T), ki določa značilno dolgo varianto β -kazeina.
2. Različni vzorci alternativnega izrezovanja intronov (1, 2 in 3) so posledica polimorfizmov v intronu 1 gena za β -kazein. Alternativno izrezovanje intronov oz. vključevanje eksonov 5 in 8 v zrelo mRNA β -kazeina povečuje kazeinsko pestrost v kobiljem mleku. Poleg različnih variant β -kazeina njegovo pestrost povečujejo še različne stopnje fosforilacije β -kazeina kobiljega mleka.
3. Z 2-D elektroforezo lahko na podlagi količinskega razmerja $\beta\text{-CN}:\beta\text{-CN}^{\Delta 5}$ povežemo genotip z vzorcem alternativnega izrezovanja intronov.
4. Na 2-D kazeinski sliki lahko na podlagi pozicije lise glede na molekulsko maso in izoelektrično točko identificiramo variante β -kazeina. Za natančnejšo identifikacijo variant β -kazeina na podlagi kazeinskega profila moramo uporabiti še metode za identifikacijo proteinov, kot je sekveniranje ali masna spektrometrija.
5. Z imuno-encimskim testom smo v primeru kazeinov kravjega mleka zaznali reakcijo vezave IgE na epitope α_{S1-} in β -kazeina. Protitelesa so prepoznala tudi nekatere druge neidentificirane kazeine kravjega mleka. V primeru imuno-encimskega testa na kazeinih kobiljega mleka te reakcije nismo zaznali. Sklepamo, da se epitopi kazeinov kobiljega mleka značilno razlikujejo od epitopov kazeinov kravjega mleka, kar potencialno lahko vpliva na manjšo imunogenost kobiljega mleka.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Kazeini predstavljajo najpomembnejšo proteinsko frakcijo v mleku sesalcev. Njihova glavna biološka funkcija je prenos kalcijevega fosfata, ki je v zgodnji fazi rasti in razvoja kosti nujno potreben. Na splošno so kazeini mleka, kot tudi ostali proteini mleka najbolj raziskani pri vrsti govedo, saj ima kravje mleko največji ekonomski pomen. V zadnjem času pa je vedno več raziskav namenjenih tudi preučevanju kobiljega mleka pri katerem ugotavljajo pozitivne učinke na zdravje ljudi. Kobilje mleko in tudi osličeje ter kamelje mleko predstavljajo dobro alternativo kravjemu mleku v mlečnih formulah za otroke, ki so alergični na proteine kravjega mleka.

Kazeinska frakcija kobiljega mleka sestoji v glavnem iz α_S -kazeina (α_{S1} - in α_{S2} -kazein) in β -kazeina. V manjšem deležu je v kobiljem mleku prisoten tudi κ -kazein.

Alternativno izrezovanje intronov je pogost pojav pri genih na kalcij občutljivih kazeinov vseh sesalcev. Pri β -kazeinu se alternativno vključujeta v zrelo mRNA dva eksona; ekson 5 (24 bp) in 8 (42 bp) (Lenasi in sod., 2003; Lenasi in sod., 2006). Pri kombinaciji vključevanj dveh eksonov gre pričakovati možne štiri izoformne oblike, pri β -kazeinskem genu pa so ugotovili osem možnih oblik mRNA. Dodatna alternativna oblika β -kazeina je nastala kot posledica uporabe alternativnega akceptorskega mesta znotraj eksona 7, tako, da se le ta skrajša za 396 bp (Lenasi in sod., 2003; Lenasi in sod., 2006). Različne oblike mRNA pa so nastale po različnih vzorcih vključevanja eksonov, kjer se lahko vključita oba eksona, se oba izključita ali pa se vključujeta alternativno. Vzrok za nastanek različnih vzorcev vključevanja eksonov so iskali v polimorfizmih na mestih, ki so vključena v proces izrezovanja intronov (donorsko mesto, akceptorsko mesto) ter v promotorju in intronih ob šibkih eksonih ter v eksonih ob šibkih eksonih (Lenasi in sod., 2003). V primeru β -kazeina so ugotovili, da na vzorec vključevanja eksonov 5 in 8 vplivata polimorfizma v intronu 1 (Lenasi in sod., 2006).

V prvem delu naloge smo poiskali polimorfna mesta v intronu 1 β -kazeinskega gena. Na podlagi znanih polimorfnih mest v intronu 1 smo določili vzorec vključevanja eksonov in pričakovano obliko mRNA β -kazeina. Z metodo RT-PCR smo ugotavljali prisotnost obeh šibkih eksonov v zreli mRNA β -kazeinskega gena. Potrdili smo tri različne vzorce vključevanja obeh eksonov v zrelo mRNA. Oba eksona sta bodisi prisotna v zreli mRNA (dolge oblike mRNA), bodisi alternativno vključena (po dve oblike mRNA, daljša in krajša) ali pa nista prisotna v zreli mRNA (kratke oblike mRNA). Količine posameznih fragmentov DNA (z ali brez vključenega eksona) smo določili z analizo produktov v bioanalizatorju. Glede na dobljene količine smo izračunali še delež posameznih cDNA fragmentov. Za vsak vzorec vključevanja šibkih eksonov smo izračunali povprečni delež posameznega fragmenta.

V nadaljevanju naloge smo kazeine izolirali iz kobiljega mleka ter jih ločili z dvo-dimenzionalno elektroforezo. Želeli smo ugotoviti morebitno prepoznavnost različnih variant β -kazeina na proteinskem profilu. Za namen pridobitve ponovljivih slik proteinskih profilov smo metodo najprej optimizirali. Da bi pridobili primerljive gele v fazi, ko je ločljivost proteinov največja, smo predhodno določili postopek priprave vzorca in pogoje

pod katerimi teče elktroforeza. Določili smo najprimernejšo količino nanosa proteinov, metodo nanosa in empirično izbrali primeren pH gradient ter dolžino IPG traku. Pogoje fokusiranja (IEF) ter pogoje druge dimenzije smo določali empirično ter ju končno optimizirali. Ugotovili smo, da so geli najbolj primerljivi in je ločljivost kazeinov največja če je: količina nanosa proteinov 50 µg; dolžina IPG traku 18 cm; pH gradient 4-7; nanos vzorca z rehidracijo; IEF in SDS-PAGE potekata pri T=10 °C.

Na proteinskih profilih z prevladujočo dolgo obliko β -kazeina (vzorec vključevanja eksonov (1) smo že na prvi pogled opazili večjo intenzivnost lis v verigi na območju 32 kDa (dolga varianta β -kazeina) in manjšo intenziteto lis v verigi na območju 30 kDa (kratka varianta). Po obdelavi slik s programom Dymension (Syngene) smo za verigo lis, ki predstavlja dolgo varianto β -kazeina izračunali večje normalizirane volumne, za verigo lis, ki predstavlja kratko varianto pa manjše. V primeru alternativnega vzorca vključevanja eksonov (2) smo na proteinskih slikih ugotovili, da obe verigi lis, tako na območju 32 kDa, kot na območju 30 kDa nakazujeta skoraj enako intenziteto lis. Po obdelavi slik s programom smo za verigo lis, ki predstavlja dolgo varianto β -kazeina izračunali večje normalizirane volumne, za verigo lis, ki predstavlja kratko varianto pa manjše. Za razliko od vzorca vključevanja eksonov (1) je bil delež dolge oblike manjši, delež kratke oblike pa večji. Proteinski profil s prevladujočo kratko obliko β -kazeina (vzorec vključevanja eksonov (3)) smo pridobili le iz enega vzorca. Na samem proteinskem profilu smo opazili večjo intenziteto lis v verigi na območju 30 kDa (kratka varianta β -kazeina) v primerjavi z verigo lis na območju 32 kDa (dolga varianta β -kazeina).

V drugem delu raziskave smo za namen preverjanja potencialne alergenosti kazeinov na membrani PVDF fiksirali kazeinske frakcije kobiljega in kravjega mleka. Pripravljene membrane s fiksiranimi kazeini smo uporabili za preverjanje reakcije antigen-protitelo (Ag-Ab) z imunoencimskim testom (Western blot). Med važnejše alergene spadajo kazeini in β -laktoglobulin, omenjene pa so bile tudi alergije na manj pomembne proteine, kot so imunoglobulini in albumin (Restani in sod., 2009). V naši raziskavi smo potrdili reakcijo Ag-Ab v primeru kravjih kazeinov, kjer so se protitelesa iz serumov otrok, ki so alergični na proteine kravjega mleka, vezala na α_{S1} - in β -kazein kravjega mleka. V primeru kobiljega mleka protitelesa IgE niso prepoznala veznih mest (epitopov).

6.2 SUMMARY

Caseins represent the most important protein fraction in milk of mammals. Their major biological function is the transfer of calcium phosphate, which in an early stage of growth and development of bone is necessary. In general, milk casein, as well as the rest of the milk proteins are well characterised in cow's milk, which has the greatest economic value. Lately, more and more research aimed at the study of mare's milk in which recognize the positive effects on human health. Mare's milk and donkey and camel milk represent a good alternative to cow's milk in the milk formulas for children allergic to cow's milk proteins.

Alternative splicing of exons is common in the calcium-sensitive casein genes of β all mammals. In the case of β -casein two exons; 5 exon (24 bp) and 8 (42 bp) are alternative include in the mature mRNA (Lenasi et al., 2003; Lenasi et al., 2006). The combination of the two exons could form four possible isoforms of β -casein, but eight possible forms of

mRNA were found. Additional, new alternative isoform of β -casein was created as a result of the use of alternative acceptor sites within exon 7, which was reduced for 396 bp (Lenasi et al., 2003; Lenasi et al., 2006). Various isoforms of mRNA were caused by different patterns of inclusion of weak exons, which may include both exons, they both exclude or include alternative or they can be both excluded. The two polymorphisms in the β -casein intron 1 were associated with different splicing patterns (Lenasi et al., 2003).

In the first part of this study we confirmed two polymorphisms in β -casein intron 1. On the basis of the known polymorphic sites in intron 1 we determined the splicing pattern of two weak exons and expected isoforms of β -casein mRNA. To determine the inclusion of each of the two weak exons from the β -casein gene, RT-PCR method was performed with two pairs of primers. We confirmed three different splicing patterns for the population of 19 mares. The three splicing patterns differed in the presence and relative quantities of the four transcripts. The samples from 19 mares representing the following β -casein splicing patterns; (1) exons 5 and 8 were included in the processed mRNA (full length isoform); (2) exons 5 and 8 were alternatively included in the processed mRNA and the alternative donor splice site in exon 7 was used alternatively; and (3) exons 5 and 8 were alternatively included in the processed mRNA with higher ratio of skipped/included exons 5 and 8 than in the splicing pattern (2) (short isoform). Quantification of individual PCR fragments (with or without included exon) was performed by capillary electrophoresis in the Agilent Bioanalyzer. The average proportion of each fragment was calculated.

In addition, we isolated casein fractions from mare milk and are separated them by two-dimensional electrophoresis. We also try to separate different isoforms of β -casein in the protein profile. For this purpose we optimized the method for protein separation. In order to obtain comparable gels at a stage of the maximum resolution of proteins we empirically determined the sample preparation procedure and the electrophoretic running conditions. We determined the most appropriate amount of protein to load, we select the sample application method, we selected a suitable pH gradient and the length of the IPG strip. The isoelectric focusing (IEF) conditions and the SDS-PAGE conditions were determined empirically and were finally optimized. We have found that gels were the most comparable and the maximum resolution of caseins was performed if: the sample load of caseins was 50 μ g; IPG strip length was 18 cm; the pH gradient was 4-7; the sample application method was rehydration loading; and if IEF and SDS-PAGE passing at $T = 10^\circ C$.

On the protein profiles of the prevailing long isoform of β -casein (splicing pattern (1)) there was visually noticed a greater intensity of the spots in the spot chain in the area of 32 kDa (long variant of β -casein) and less intensity of the spots in the chain in the range of 30 kDa (short variant). After the image processing program, the calculated normalized volumes for the chain of the spots, which represents a long variant of β -casein were higher than that for a chain of the spots, which represents a short variant. In the case of the splicing pattern (2) there was almost the same intensity of the spots in both chains (in the area of 30 and 32 kDa). The calculated normalized volumes for the chain of the spots, which represents a long variant of β -casein was higher than that, calculated for a chain of the spots, which represents a short variant. Protein profile with prevailing short form of β -casein (splicing pattern (3)) was obtained from only one sample. In this case, we observed a greater intensity of the spots in the chain in the range of 30 kDa (short variant of β -

casein) in comparison with the chain of the spots in the area of 32 kDa (long variant of β -casein).

In the second part of the study we investigate the allergenicity of the equine caseins and compared to allergenicity of the cow caseins. To investigate whether IgE from allergic children recognized epitopes on mare milk proteins, we set up DIBA experiment, using cow or mare milk caseins as the antigenes. Cow milk proteins were able to cause a positive reaction with IgE oh human sera in all sera tested. In addition, equine milk proteins did not cause any positive reaction with human IgE.

7 VIRI

- Bajt N., Golc-Teger S. 2002. Izdelava jogurta, skute in sira. Dreu S. (ur.). Ljubljana, ČZD
Kmečki glas: 142 str.
- Bell K., Hopper K.E., McKenzie H.A. 1981. Bovine α -laktalbumine C and α S1- β -, and κ -caseins of Bali (Banteng) cattle, *Bos* (Bibos) *javanicus*. Australian Journal of Biological Science, 34: 149-159
- Bell L.R., Horabin J.I., Schedl P., Cline T.W. 1991. Positive autoregulation of sex-lethal by alternative splicing maintains the female determined state in *Drosophila*. Cell, 65, 2: 229-239
- Bell M.V., Cowper A.E., Lefranc M.P., Bell J.I., Screamton G.R. 1998. Influence of Intron Length on Alternative Splicing of CD44. Molecular and Cellular Biology, 18, 10: 5930-5941
- Bernard H., Negroni L., Chatel J.M., Clement G., Adel-Patient K., Peltre G., Creminon C., Wal J.M. 2000. Molecular basis of IgE cross-reactivity between human β -casein and bovine β -casein, a major allergen of milk. Molecular Immunology, 37: 161-167
- Bjellqvist B., Ek K., Righetti P.G., Gianazza E., Görg A., Westermeier R., Postel W. 1982. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications. Journal of Biochemical and Biophysical methods, 6, 4: 317-339
- Bevilacqua C., Martin P., Candah C., Fauquant J., Piot M., Roucayrol A.M., Pilla F., Heyman M. 2001. Goat's milk of defective alpha (s1)-casein genotype decreases intestinal and systemic sensitization to beta-lactoglobulin in guinea pigs. Journal of Dairy Research, 68, 2: 217-227
- BLAST. 2016. Standard Protein BLAST. NCBI, National Center for Biotechnology Information.
http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome (10. feb. 2016)
- Bouniol C., Printz C., Mercier J.C. 1993. Bovine α s₂-casein D is generated by exon VIII skipping. Gene, 128: 289-293
- Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.
- Brew K. 2003. α -Lactalbumin. V: Advanced Dairy Chemistry. Fox, P.F., Mc-Sweeney, P.L.H. (eds.). New York, USA, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1: 387-419
- Brezovečki A., Čagalj M., Antunac N., Mikulec N., Bendelja Ljoljić D. 2014. Proizvodnja, sastav i svojstva kobiljeg mlijeka. Mlječarstvo, 64, 4: 217-227

- Brignon G., Chtourou A., Ribadeau-Dumas B. 1985. Does β -lactoglobulin occur in human milk? *Journal of Dairy research*, 52: 249-254
- Brinkmann J., Koudelka T., Keppler J.K., Tholey A., Schwarz K., Thaller G., Tetens J. 2015. Characterization of an Equine α -S₂-Casein Variant Due to a 1.3 kb Deletion Spanning Two Coding Exons. *PLoS ONE*, 10, 10: e0139700, doi: 10.1371/journal.pone.0139700: 10 str.
- Brown R.L., Reinke L.M., Damerow M.S., Perez D., Chodosh L.A., Yang J., Cheng C. 2011. CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *The Journal of Clinical Investigation*, 121, 3: 1064-1074
- Businco L., Giampietro P.G., Lucenti P., Lucaroni F., Pini C., Di Felice G., Lacovacci P., Curadi C., Orlandi M. 2000. Allergenicity of mare's milk in children with cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105, 5: 1031-1034
- Cantisani A., Giuffrida M.G., Fabris C., Bertino E., Coscia A., Oggero R., Monti G., Stroppiana P., Conti A. 1997. Detection of specific IgE to human milk proteins in sera of atopic infants. *FEBS Letters*, 412, 3: 515-517
- Caroprese M., Albenzio M., Marino R., Muscio T., Zizza T., Sevi A. 2007. Behavior, milk yield, and milk composition of machine- and hand-milked Murgeze mares. *Journal of Dairy Science*, 90: 2773-2777
- Cases B., García-Ara C., Boyano M.T., Pérez-Gordo M., Pedrosa M., Vivanco F., Quirce S., Pastor-Vargas C. 2011. Phosphorylation Reduces the Allergenicity of Cow Casein in Children With Selective Allergy to Goat and Sheep Milk. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 21, 5: 398-400
- Cieslak J., Pawlak P., Wodas L., Borowska A., Stachowiak A., Puppel K., Kuczynska B., Luczak M., Marczak L., Mackowski M. 2016. Characterization of equine CSN1S2 variants considering genetics, transcriptomics, and proteomics. *Journal of Dairy Science*, 99: 1277-1285
- Cox J., Mann M. 2007. Is Proteomics the New Genomics? *Cell*, 130: 395-398
- Dawson S.P., Wilde C.J., Tighe P.J., Mayer R.J. 1993. Characterization of two novel casein transcripts in rabbit mammary gland. *Biochemistry Journal*, 296: 777-784
- Doreau M., Martin-Rosset W. 2002. Dairy-Animals/Horse. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Saint Genes Champanelle, France, Institut National de la Recherche Agronomique: 630-637
- Edman P., Högfeldt E., Sillén L.G., Kinell P.O. 1950. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chemica Scandinavica*, 4: 283-293

- Egito A.S., Girardet J.M., Miclo L., Mollé D., Humbert G., Gaillard J.L. 2001. Susceptibility of equine κ - and β -caseins to hydrolysis by chymosin. International Dairy Journal, 11: 885-893
- Egito A.S., Miclo L., López C., Adam A., Girardet J.M., Gaillard J.L. 2002. Separation and Characterization of Mares' Milk α S1-, β -, κ -Caseins, γ -Casein like, and Proteose Peptone Component 5-Like Peptides. Journal of Dairy Science, 85: 697-706
- Egito A.S., Girardet J.M., Poirson C., Mollé D., Humbert G., Miclo L., Gaillard J.L. 2003. Action of plasmin on equine β -casein. International Dairy Journal, 13: 813-820
- Eigel W.N., Butler J.E., Ernstrom C.A., Farrell H.M., Harwalkar V.R., Jenness R., Whitney R.M. 1984. Nomenclature of Proteins of Cow's Milk: Fifth Revision. Journal of Dairy Science, 67: 1599-1631
- El-Agamy E.I., Abou-Shloue Z.I., Abdel-Kader Y.I. 1997. A comparative study of milk proteins from different species. II. Electrophoretic patterns, molecular characterization, amino acid composition and immunological relationships. V: Third Alexandria Conference on Food Science and Technology, Alexandria, Egypt, 1. – 3. marec 1997. Alexandria, Alexandria University: 51-62
- El-Agamy E.I., Nawar M.A. 2000. Nutritive and immunological values of camel milk: a comparative study with milk of other species. V: Second International Camelid Conference: Agroeconomics of Camelid Farming, 8. – 12. september, 2000, Almaty, AgroMerkur Publ.: 33-45
- El-Agamy E.I. 2007. The challenge of cow milk protein allergy. Small Ruminant Research, 68: 64-72
- El-Agamy E.I., Nawar M., Shamsia S.M., Awad S., Haenlein F.W. 2009. Are camel milk proteins convenient to the nutrition of cow milk allergic children? Small Ruminant Research, 82: 1-6
- Farrell H.M., Jimenez-Flores R., Bleck G.T., Brown E.M., Butler J.E., Creamer L.K., Hicks C.L., Hollar C.M., Ng-Kwai-Hang K.F., Swaisgood H.E. 2004. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk-Sixth Revision. Journal of Dairy Science, 87: 1641-1674
- Ferranti P., Addeo F., Malorni A., Chianese L., Leroux C., Martin P. 1997. Differential splicing of pre-messenger RNA produces multiple forms of mature caprine α S1-casein. European Journal of Biochemistry, 249: 1-7
- Fiocchi A., Schünemann H.J., Brozek J., Restanti P., Beyer K., Troncone R., Martelli A., Rerraccioano L., Bahna S., Rancé F., Ebisawa M., Heine R.G., Assa'ad A., Sampson H., Verduci E., Bouygue G.R., Baena-Cagnani C., Canonica W., Lockey R.F. 2010. Diagnosis and Rationale for Action against Cow's milk Allergy (DRACMA): A summary report. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 126, 6: 1119-1128

- Fox P.F.2003. Milk proteins: general and historical aspects. V: Advanced dairy chemistry-1 Proteins. Fox P.F., McSweeney P.L.H. (eds.). New York, Springer Science+Business Media: 1-41
- Fox-Walsh K., Dou Y., Lam B.J., Hung S., Baldi P.F., Hertel K. 2005. The architecture of pre-mRNA affects mechanism of splice-site pairing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102: 16176-16181
- Fox P.F., Uniacke-Lowe T., McSweeney P.L.H., O'Mahony. 2015. Dairy Chemistry and Biochemistry. Milk Proteins. Second Edition. Cham, Springer: 584 str.
- Gall H., Kalveram C.M., Sick H., Sterry W. 1995. Allergy to the heat-labile proteins α -lactalbumin and β -lactoglobulin in mare's milk. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 97, 6: 1304-1307
- GE Healthcare. 2004. 2-D Electrophoresis, Principles and Methods. Uppsala, Sweden, GE Healthcare Bio-Sciences AB: 159 str.
- Gibbs P.G., Potter G.D., Blake R.W., McMullan W.C. 2010. Milk production of Quarter Mares during 150 Days of Lactation. Journal of Animal Science, 54, 3: 496-499
- Girardet J.M., Miclo L., florent S., Mollé D., Gaillard J.L. 2006. Determination of the phosphorylation level and deamidation susceptibility of equine β -casein. Proteomics, 6: 3707-3717
- Ginger M.R., Grigor M.R. 1999. Comparative aspects of milk caseins. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 124: 133-145
- Görg A., Postel W., Günther S. 1988. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Electrophoresis, 9: 531-546
- Görg A., Obermaier C., Boguth G., Harder A., Scheibe B., Wildgruber R., Weiss W. 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Electrophoresis, 21: 1037-1053
- Görg A., Klaus A., Lück C., Weiland F., Weiss W. 2007. Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients for Proteome Analysis. Freising-Weihenstephan, Germany Technical University of Munich: 149 str.
- Gorodetskii S.I., Zakhar'ev V.M., Kyarshulite D.R., Kapelinskaya T.V., Skryabin K.G. 1987. Cloning and nucleotide sequence of cDNA for bovine alphaS1-casein. Biochemistry of USSR, 51, 10-1: 1402-1409
- Groenen M.A., Dijkhof R.J., Verstege A.J., van der Poel J.J. 1993. The complete sequence of the gene encoding bovine α s2-casein. Gene, 123: 187-193

- Heppell L.M.J., Cant A.J., Kilshaw P.J. 1984. Reduction in the antigenicity of whey proteins by heat treatment: a possible strategy for producing a hypoallergenic infant milk formula. *The British Journal of Nutrition*, 51: 29-36
- Hobor S., Kunej T., Dovč P. 2008. Polymorphisms in the kappa casein (CSN3) gene in horse and comparative analysis of its promoter and coding region. *Animal Genetics*, 39: 520-530
- Hochwallner H., Schulmeister U., Swoboda I., Spitzauer S., Valenta R. 2014. Cow's milk allergy: from allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention. *Methods*, 66: 22-33
- Holt C. 1992. Structure and stability of bovine casein micelles. *Advances in Protein Chemistry*, 43: 63-151
- Holt C., Carver J.A., Ecroyd H., Thorn D.C. 2013. Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods. *Journal of Dairy Science*, 96: 6127-6146
- Høst A., Halken S. 2014. Cow's Milk Allergy: Where have we Come from and where are we Going? *Endocrine, Metabolic & Immune Disorder – Drug Targets*, 14: 2-8
- Huhtala M.L., Seppälä M., Närvenen A., Palotmäki P., Julkunen M., Bohn H. 1987. Amino acid sequence homology between human placental protein 14 and β -lactoglobulins from various species. *Endocrinology*, 120: 2620-2622
- Iametti S., Tedeschi G., Oungre E., Bonomi F. 2001. Primary structure of κ -casein isolated from mares' milk. *Journal of Dairy Research*, 68: 53-61
- Jarvinen K.M., Beyer K., Vila L., Chatchatee P., Busse P.J., Sampson H.A. 2002. B-cell epitopes as a screening instrument for persistent cow's milk allergy. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 110, 2: 293-297
- Jasińska B., Jaworska G. 1991. Comparison of structures of micellar caseins of milk of cows, goats and mares with human milk casein. *Animal Science Papers and Reports*, 7, 45-55
- Jenness R. 1979. Comparative aspects of milk proteins. *Journal od Dairy Research*, 46: 197-210
- Johnsen L.B., Rasmussen L.K., Petersen T.E., Berglund L. 1995. Characterization of three types of human α_{S1} -casein mRNA transcripts. *Biochemical Journal*, 309: 237-242
- Jungblut P., Thiede B. 1997. Protein Identification from 2-DE gels by Maldi Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 16: 145-162
- KC Junior. User's Guide. 2002. Vermont, Bio-Tek Instruments, Inc.

- Kociņa I., Antāne V., Lūsis I. 2012. The Concentrations of Immunoglobulins A, G, and M in Cow Milk and Blood in Relation with Cow Seasonal Keeping and Pathogens Presence in the Udder. Proceedings of the Latvia University of Agriculture, 27, 322: 44-53
- Kočevar N., Komel R. 2008. Preiskava bolezenskih proteomov z dvodimenzionalno gelsko elektroforezo in masno spektrometrijo. Medicinski razgledi, 47: 193-203
- Koistinen H., Koistinen R., Seppälä M., Burova T.V., Choiset Y., Haertlé T. 1999. Glycodelin and β -lactoglobulin, lipocalins with a high structural similarity, differ in ligand binding properties. FEBS Letters, 450: 158-162
- Križaj I. 2008. Metode za analizo proteoma. V: Proteomika, Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, Ljubljana, 31. januar - 1. februar 2008. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 19-33
- Kummeling I., Mills E.N.C., Clausen M., Dubakiene R., Farnández Pérez C., Fernández-Rivas M., Knulst A.C., Kowalski M.L., Lidholm J., Le T.M., Metzler C., Mustakov T., Popov T., Potts J., Van Ree R., Sakellariou A., Töndury B., Tzannis K., Burney P. 2009. The EuroPrevall surveys on the prevalence of food allergies in children and adults: background and study methodology. European Journal of Allergy and Clinical Immunology, 64, 10: 1493-1497
- Lara-Villoslada F., Olivares M., Xaus J. 2005. The Balance Between Caseins and Whey Proteins in Cow's Milk Determines its Allergenicity. Journal of Dairy Science, 88: 1654-1660
- Lenasi T., Rogelj I., Dovč P. 2003. Characterization of equine cDNA sequences for alphaS1-, beta- and kappa-casein. Journal of Dairy Research, 70, 1: 29-36
- Lenasi T., Peterlin M., Dovč P. 2006. Distal regulation of alternative splicing by splicing enhancer in equine β -casein intron 1. RNA, 12, 3: 498-507
- Lewin B. 2004. Genes VIII. Charlson G., Challice J. (eds.). USA, New Jersey, Pearson Prentice Hall: 1002 str.
- López J.L. 2007. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. Journal of Chromatography B, 849: 190-202
- Malacarne M., Martuzzi F., Summer A., Mariani P. 2002. Protein and fat composition of mare's milk: some nutritional remarks with reference to human and cow's milk. International Dairy Journal, 12, 11: 86-87
- Månnsson H.L., Timgren A., Aldén G., Paulsson M. 2005. Two-dimensional gel electrophoresis of proteins and peptides in bovine milk. International Dairy Journal, 15: 111-121

- Martin P., Ferranti P., Leroux C., Addeo F. 2003. Non-Bovine caseins: Quantitative variability and molecular diversity. V: Advanced dairy chemistry-1 Proteins. Fox P.F., McSweeney P.L.H. (eds.). New York, Springer Science+Business Media: 277-317
- Matéos A., Girardet J.M., Mollé D., Dary A., Miclo L., Gaillard J.L. 2009a. Two-dimensional cartography of equine β -casein variants achieved by isolation of phosphorylation isoforms and control of the deamidation phenomenon. *Journal of Dairy Science*, 92: 2389-2399
- Matéos A., Miclo L., Mollé D., Dary A., Girardet J.M., Gaillard J.L. 2009b. Equine α S1-casein: Characterization of alternative splicing isoforms and determination of phosphorylation levels. *Journal of Dairy Science*, 92: 3604-3615
- Matéos A., Girardet J.M., Mollé D., Corbier C., Gaillard J.L., Miclo L. 2010. Identification of phosphorylation sites of equine β -casein isoforms. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24: 1533-1542
- Mazhitova A.T., Kulmyrzaev A.A., Ozbekova Z.E., Bodoshev A. 2015. Amino Acid and Fatty Acid Profile of the Mare's Milk Produced on Suusamyr Pastures of the Kyrgyz Republic During Lactation Period. *Procedia – Social and Behavioral Sciences*, 195: 2683-2688
- Mercier J.C., Vilotte J.L. 1993. Structure and function of milk protein genes. *Journal of Dairy Science*, 76: 3079-3098
- Miranda G., Mahé M.F., Leroux C., Martin P. 2004. Proteomic tools to characterize the protein fraction of Equidae milk. *Proteomics*, 4: 2496-2509
- Miriam E., Margalit H., Sperling R. 2003. Conserved sequence elements associated with exon skipping. *Nucleic Acids Research*, 31, 7: 1974-1983
- Miclo L., Girardet J.M., Egito A.S., Mollé D., Martin P., Gaillard J.L. 2007. The primary structure of a low-Mr multiphosphorylated variant of β -casein in equine milk. *Proteomics*, 7: 1327-1335
- Milenkovic D., Martin P., Guerin G., Leroux C. 2002. A specific pattern of splicing for the horse alphaS1-Casein mRNA and partial genomic characterization of the relevant locus. *Genetics Selection Evolution*, 34, 4: 509-519
- Morisawa Y., Kitamura A., Ujihara T., Zushi N., Kuzume K., Shimanouchi Y., Tamura S., Wakiguchi H., Saito H., Matsumoto K. 2009. Effect of heat treatment and enzymatic digestion on the B cell epitopes of cow's milk proteins. *Clinical & Experimental Allergy*, 39: 918-925
- Niemi M., Jylhä S., Laukkonen M.L., Söderlund H., Mäkinen-Kiljunen S., Kallio J.M., Hakulinen N., Haahtela T., Takkinen K., Rouvinen J. 2007. Molecular Interactions

- between a Recombinant IgE Antibody and the β -lactoglobulin Allergen. *Structure*, 15: 1413-1421
- O'Farrell P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250: 4007-4021
- O'Mahony J.A., Fox P.F. 2014. Milk: An Overview. V: Milk proteins, From Expression to Food. Second Edition. Singh H., Boland M., Thompson A. (eds.), Amsterdam, Akademic Press Elsevier: 20-61
- Ong S.E., Pandey A. 2001. An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. *Biomolecular Engineering*, 18: 195-205
- Ochirkhuyag B., Chobert J.M., Dalgalarondo M., Haertlé T. 2000. Characterization of mare caseins. Identification of α S1- and α S1-caseins. *Le Lait*, 80: 223-235
- Park Y.W., Zhang H., Zhang B., Zhang L. 2006. Mare Milk. V: Handbook of milk of non-bovine mammals. First Edition. Park Y.W., Haenlein G.F.W. (eds.). Ames, Iowa, USA, Blackwell Publishing: 275-296
- Passey R., Glenn W., Mackinlay A. 1996. Exon skipping in the ovine α S1-casein gene. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 114B, 4: 389-394
- Pearse M.J., Linklater P.M., Hall R.J., Mackinlay A.G. 1986. Extensive degradation of casein by plasmin does not impede subsequent curd formation and syneresis. *Journal of Dairy Research*, 53: 381-390
- Potočnik K., Gantner V., Kuterovac K., Cividini A. 2011. Mare's milk: composition and protein fraction in comparison with different milk species. *Mljeistarstvo*, 61, 2: 107-113
- Restani P., Gaiaschi A., Plebani A., Beretta B., Cavagni G., Fiocchi A., Poiesi C., Velona T., Ugazio A.G., Galli C.L. 1999. Cross-reactivity between milk proteins from different animal species. *Clinical and Experimental Allergy*, 29: 997-1004
- Restani P., Ballabio C., Di Lorenzo C., Tripodi S., Fiocchi A. 2009. Molecular aspects of milk allergens and their role in clinical events. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395: 47-56
- Rijkenkels M. 2002. Multispecies Comparison of the Casein Gene Loci and Evolution of Casein Gene Family. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7, 3: 327-345
- Robinson N.E., Robinson A.B. 2001. Deamidation of human proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 12409-12413
- Robinson N.E. 2002. Protein deamidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 5283-5288

Sabatini L.M., Ota T., Azen E.A. 1993. Nucleotide sequence analysis of the human salivary protein genes HIS1 and HIS2, and of the evolution of the STATH/HIS gene family. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 497-511

Schoemaker A.A., Sprikkelman A.B., Grimshaw K.E., Roberts G., Grabenhenrich L., Rosenfeld L., Siegert S., Dubakiene R., Rudzeviciene O., Reche M., Fiandor A., Papadopoulos N.G., Malamitsi-Puchner A., Fiocchi A., Dahdah L., Sigurdardottir S.T., Clausen M., Stańczyk-Przyluska A., Zeman K., Mills E.N.C., McBride D., Keil T. 2015. Incidence and natural history of challenge-proven cow's milk allergy in European children – EuroPrevall birth cohort. *European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 70: 963-972

Sharma S., Kumar P., Betzel C., Singh T.P. 2001. Structure and function of proteins involved in milk allergies. *Journal of Chromatography B*, 756: 183-187

Sletten G.B.G., Halvorsen R., Egaas E., Halstensen T.S. 2007. Casein-specific immunoglobulins in cow's milk allergic patient subgroups reveal a shift to IgA dominance in tolerant patients. *Pediatric Allergy Immunology*, 18: 71-80

Sood S.M., Herbert P.J., Slattery C.W. 1997. Structural studies on casein micelles of human milk: dissociation of β -casein of different phosphorylation levels induced by cooling and ethylenediaminetetraacetate. *Journal of Dairy Science*, 80: 628-633

Sood S.M., Erickson G., Slattery C.W. 2002. Formation of reconstituted casein micelles with human β -casein and bovine κ -casein. *Journal of Dairy Science*, 85: 472-477

Spuergin P., Walter M., Schiltz E., Deichmann K., Forster J., Mueller H. 1997. Allergenicity of alpha-casein from cow, sheep and goat. *Allergy*, 52, 3: 293-298

Sterner D.A., Carlo T., Berget S.M. 1996. Architectural limits on split genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93, 26: 15081-15085

Stamm S., Casper D., Dinsmore J., Kaufmann J., Brosius J., Helfman D.M. 1992. Clathrin light chain B: gene structure and neuron-specific splicing. *Nucleic Acids Research*, 22: 1515-1526

Swaisgood H.E. 1993. Review and update of casein chemistry. *Journal of Dairy Science*, 76: 3054-3061

Šmerc A. 2007. Izolacija kazeinov iz kobiljega mleka in optimizacija elektroforeznega sistema za njihovo ločitev. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 46 str.

Talerico M., Berget S.M. 1994. Intron Definition in Splicing of Small *Drosophila* Introns. *Molecular and Cellular Biology*, 14, 5: 3434-3445

Taheri-Kafrani A., Gaudin J.C., Rabesona H., Nioi C., Agarwal D., Drouet M., Chobert J.M., Bordbar A.K., Haertle T. 2009. Effects of Heating and Glycation of β -Lactoglobulin on Its Recognition by IgE of Sera from Cow Milk Allergy Patients. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 4974-4982

Thermo Scientific. Pierce 660nm Protein Assay, Instructions.

<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1602063-Protein-Assay-Handbook.pdf> (1. feb.2016)

Uniacke-Lowe T., Huppertz T., Fox P.F. 2010. Equine milk proteins: Chemistry, structure and nutritional significance. International Dairy Journal, 20: 609-629

Vincenzetti S., Polidori P., Mariani P., Cammertoni N., Fantuz F., Vita A. 2008. Donkey's milk protein fractions characterization. Food Chemistry, 106: 640-649

Visser S., Jenness R., Mullin R. 1982. Isolation and characterization of β - and γ -caseins from horse milk. Biochemical Journal, 203: 131-139

Vozelj M. 2000. Temelji imunologije. Železnik T. (ur.). Ljubljana, DZS: 551 str.

Zavolan M., Kondo S., Schonbach C., Adachi J., Hume D.A., Hayashizaki Y., Gaasterland T. 2003. Impact of alternative initiation, splicing, and termination on the diversity of the mRNA transcripts encoded by the mouse transcriptome. Genome Research, 13, 6B: 1290-1300

Zicker S.C., Lonnerdal B. 1994. Protein and nitrogen composition of equine (*Equus caballus*) milk during early lactation. Comparative Biochemistry and Physiology, 108A: 411-421

ZAHVALA

Mentorju prof. dr. Petru Dovču in somentorici prof. dr. Mojci Narat se zahvaljujem za potrpežljivost, strokovnost in spodbudo pri pisanku naloge.

Za komentarje in vso strokovno in praktično pomoč pri izvedbi 2-D elektroforeze in pri obdelavi slik se zahvaljujem prof. dr. Poloni Jamnik iz Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete.

Za strokovno pomoč in uporabo aparatur za izvedbo IEF in SDS-PAGE se zahvaljujem sodelavcem Katedre za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo.

Za strokovno pomoč in številne razprave se zahvaljujem Jani, Ivanki, Ani, Jeleni, Andreju, Idi in vsem mimoidočim v genetskem laboratoriju, ki ste vedno radi priskočili na pomoč.

Hvala dr. Adrijani Leonardi iz Inštituta Jožef Štefan za sekvenčno analizo proteinov.

Hvala dr. Petru Korošcu iz Klinike Golnik za serume otrok alergičnih na proteine kravjega mleka.

Hvala dr. Ireni Marc in vsem sodelavcem iz kobilarne Lipica, za prijaznost in dobro voljo pri molži kobil.

Sodelavcem Enote za drobnico hvala za vso podporo.

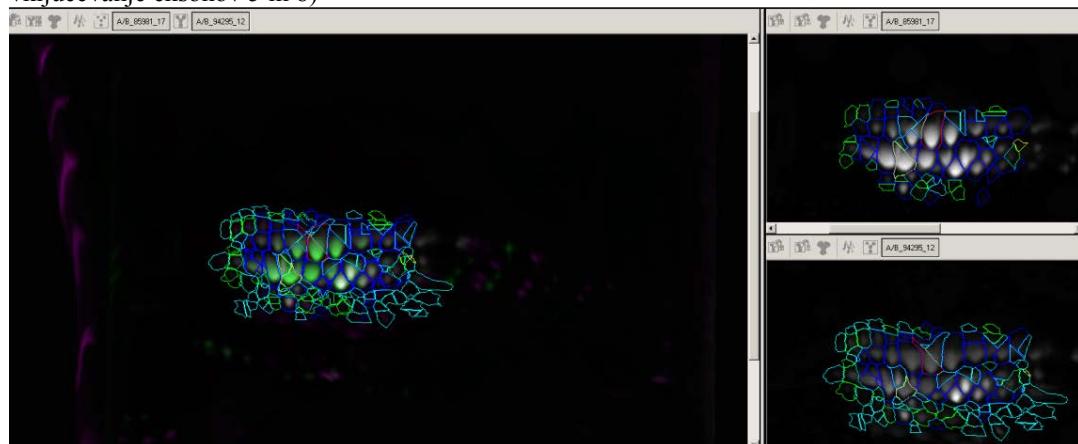
Družini in prijateljem najlepša hvala za spodbudo.

PRILOGE

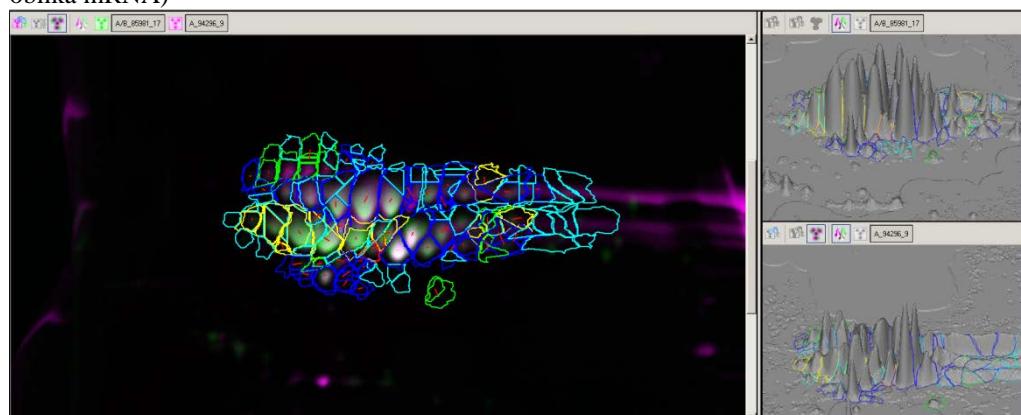
Priloga A:

Primerjave referenčnega gela z geli posameznih vzorcev vključevanja eksonov v zrelo mRNA β -kazeina

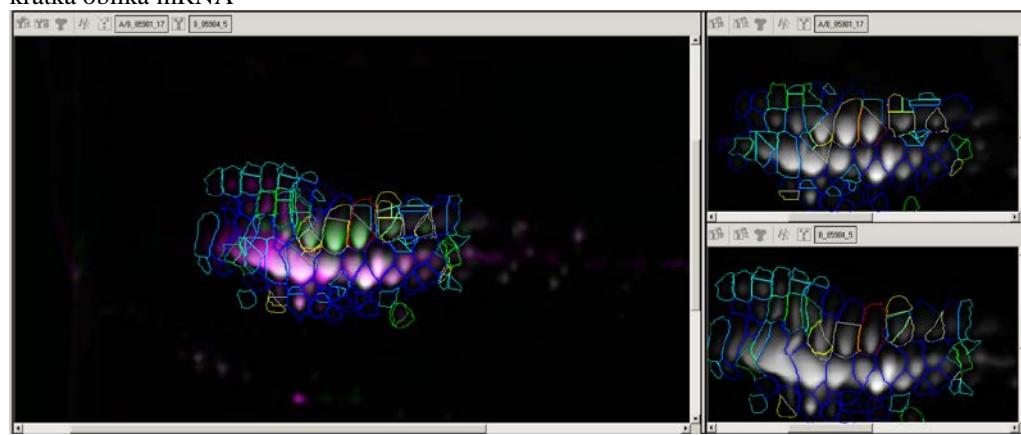
Priloga A1: Primerjava referenčnega gela (L17) z gelom z vzorcem vključevanja eksonov 2 (alternativno vključevanje eksonov 5 in 8)



Priloga A2: Primerjava referenčnega gela (L17) z gelom z vzorcem vključevanja eksonov 1 (prevladuje dolga oblika mRNA)



Priloga A3: Primerjava referenčnega gela (L17) z gelom z vzorcem vključevanja eksonov 3 (prevladuje kratka oblika mRNA)



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Angela CIVIDINI

**MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA
BELJAKOVIN V MLEKU KOBILE (*Equus caballus*)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2016