

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
HEMIJSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na redovnoj sednici Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, održanoj **09.10.2014.** godine, izabrani smo u Komisiju za ocenu i odbranu doktorske disertacije Danijele Apostolović, master biohemičara, pod naslovom:

**„Imunoproteomika alergena hrane, modifikovanih derivata alergena i
alergenih peptida rezistentnih na digestiju“.**

Na osnovu pregledane disertacije Nastavno-naučnom veću podnosimo sledeći

I Z V E Š T A J

A. Prikaz sadržaja disertacije

Doktorska disertacija Danijele Apostolović napisana je na 98 strana i sastoji se iz sledećih delova: **Uvod** (4 strane), **Opšti deo** (16 strana), **Imunoproteomika proteina crvenog mesa; identifikacija novih α -Gal alergena** (16 strana), **Karakterizacija intermedijarnih i krajnih produkata izoformi Ara h 2 i Ara h 6 alergena kikirikija dobijenih redukovanjem i alkilovanjem** (23 strana), **Karakterizacija alergernih peptida Ara h 2 i Ara h 6 alergena kikirikija dobijenih tripsinskom proteolizom** (20 strana), **Zaključci** (2 strane), **Literatura** (13 strana sa 160 literaturnih citata) i **Prilozi** (4 strana). Pored toga rad sadrži Izvod na srpskom i engleskom jeziku, zahvalnicu, spisak skraćenica, sadržaj, priloge i biografiju. U radu se nalaze 25 slike i 7 tabela.

U **Uvodu** je dat osvrt na temu i ciljeve ove doktorske disertacije, a navedena je i lista publikacija koje su proistekle iz teze. Ciljevi teze su grupisani u tri celine koje su kasnije opisane u daljem tekstu: Imunoproteomika proteina crvenog mesa; identifikacija novih α -Gal alergena; Karakterizacija intermedijarnih i krajnih produkata izoformi Ara h 2 i Ara h 6 alergena kikirikija dobijenih redukovanjem i alkilovanjem; Karakterizacija alergernih peptida Ara h 2 i Ara h 6 alergena kikirikija dobijenih tripsinskom proteolizom.

U **Opštem delu** su izneti osnovni podaci o alergijama i mehanizmima alergijskih reakcija, anatomiji i imunskom sistemu digestivnog trakta čoveka. Takođe, razmatrana je veza između digestibilnosti proteina i njihove alergnosti. Opisana su dosadašnja saznanja o alergiji na crveno meso, alergiji na kikiriki i dat je opis glavnih alergena kikirikija. Opisani su novi principi imunoterapije, kao i primena hemijske modifikacije alergena radi proizvodnje alergoida za imunoterapiju.

Poglavlje **Imunoproteomika proteina crvenog mesa; identifikacija novih α -Gal alergena** se sastoji iz četiri celine: uvodnog dela specifičnog za problematiku, materijala i metoda, rezultata i diskusije. U ovom poglavlju je ispitivano prisustvo α -Gal epitopa na proteinima iz goveđeg mesa, kao i da li oni bivaju prepoznati od strane IgE antitela pacijenta alergičnih na crveno meso. Tehnikama imunoproteomike identifikovani su proteini koje IgE antitela prepoznaju i ispitivano je prisustvo α -Gal epitopa na njima. Pomoću 2D elektroforetskih profila proteina iz različito termički obrađenog goveđeg mesa ispitivano je koji od određenih proteina ostaju očuvani nakon termalne obrade. Rezultati su obrazloženi u diskusiji i upoređeni sa podacima iz literature.

Poglavlje **Karakterizacija intermedijarnih i krajnjih produkata izoformi Ara h 2 i Ara h 6 alergena kikirikija dobijenih redukovanjem i alkilovanjem** se sastoji iz četiri celine: uvodnog dela specifičnog za dato poglavlje, materijala i metoda, rezultata i diskusije. U ovom poglavlju prečišćene su izoforme Ara h 2 i Ara h 6 alergena kikirikija, čija čistoća je određena SDS PAG elektroforezom i masenom spektrometrijom. Alergeni su podvrgnuti hemijskoj modifikaciji čija je metoda optimizovana. Optimizacija metode je praćena SDS PAG elektroforezom, dok su krajnji i intermedijarni produkti okarakterisani pomoću CD spektroskopije, spektrofluorimetrije i masene spektrometrije. Vezivanje humanih IgE antitela iz seruma pacijenata alergičnih na kikiriki je provereno uz pomoć kompetitivnog ELISA esej. Rezultati su obrazloženi u diskusiji i upoređeni sa podacima iz literature.

Poglavlje **Karakterizacija alergenijskih peptida Ara h 2 i Ara h 6 alergena kikirikija dobijenih tripsinskom proteolizom** se sastoji iz četiri celine: uvodnog dela specifičnog za dato poglavlje, materijala i metoda, rezultata i diskusije. U ovom poglavlju glavni alergeni kikirikija Ara h 2 i Ara h 6 su podvrgnuti tripsinskoj digestiji. Digestija je praćena pomoću SDS PAG elektroforeze. Proteazno-rezistentni peptidi su okarakterisani pomoću CD spektroskopije i identifikovani metodama proteomike (2D elektroforeza, masena spektrometrija i bioinformatika). Vezivanje humanih IgE antitela iz seruma pacijenata alergičnih na kikiriki provereno je u 2D imunoblotu i u kompetitivnom ELISA esej. Rezultati su obrazloženi u diskusiji i upoređeni sa podacima iz literature.

U okviru odeljka **Zaključci** ukratko su sumirani svi dobijeni rezultati i iznet je njihov značaj.

Literatura sadrži 160 literaturnih navoda prema abecednom redosledu prezimena autora.

B. Kratak opis postignutih rezultata

Pri ispitivanju sa serumima pacijenta alergičnih na crveno meso detektovane su višestruko-reaktivne proteinske trake kod proteinskih ekstrakata različito termalno obrađenog goveđeg mesa. Pokazana je sposobnost vezivanja IgE antitela samo šećerne α -Gal komponente proteina, koja se gubi nakon deglikozilacije. Identifikovano je 18 proteina koje IgE antitela prepoznaju, od kojih sedam sadrži α -Gal epitop. Ovi proteini su prvi put opisani do sada, od čega su četiri proteina stabilna pri termalnoj obradi.

U optimizovanoj metodi redukcije i alkilovanja prečišćene izoforme Ara h 2 i Ara h 6 alergena kikirikija bivaju kompletno modifikovane, što vodi kompletnom narušavanju njihove

sekundarne i tercijarne strukture, kao i gubitku sposobnosti da vežu IgE iz seruma pacijenata alergičnih na Ara h 2 i Ara h 6. Korišćenjem limitiranih uslova redukcije i alkilovanja dolazi do izmene disulfida, što rezultira stvaranjem heterogenih intermedijarnih produkata koji su neželjeni u razvoju farmaceutskog produkta.

Digestijom Ara h 2 alergena tripsinom dobijaju se proteolitički rezistentni peptidi molekulske mase od 16,2-17,6 kDa, kao i neki mali peptidi mase od 2-4 kDa. Proteolitički rezistentni peptidi iz Ara h 6 imaju molekulske mase od 13,5-14,1 kDa. Identifikovana je smeša heterogenih peptida kod kojih je hidrolizovan kratki segment (petlja) u unutrašnjem delu sekvence, dok je kompaktno jezgro koje se drži disulfidnim mostovima potpuno očuvano. Mesta koja su najviše sklona hidrolizi od strane tripsina su N- i C-terminalni peptidi, kao i eventualno limitirani delovi unutar proteina. Proteolitički rezistentni peptidi iz konglutin izoformi imaju strukturirano proteinsko jezgro koje je sposobno da veže IgE, i samim tim i da izazove IgE-posredovanu alergijsku reakciju. Deo proteina koji se ne nalazi u strukturnom jezgrou (petlja), koji je veći kod Ara h 2 proteina nego kod Ara h 6 je podložno hidrolizi i gubi se tokom digestije.

C. Usporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature

Alergija na crveno meso je bila manje relevantna alergija na hranu sve dok nedavno nije opisan novi sindrom sa odloženom reakcijom na meso sisara i sa IgE antitelima usmerenim na oligosaharidnu komponentu. S obzirom na porast alergijskih oboljenja u svetskoj populaciji, identifikacija alergena od velikog je značaja za utvrđivanje alergenosti i ispravnu dijagnostiku alergija. Identifikacija novih alergena nameće zaključak da je neophodno koristiti savremene i sofisticirane metode koje mogu da uoče suptilne promene na proteinskom nivou. Ovakav detaljan pristup izučavanju alergena, koji uključuje 2D elektroforezu, imunoblot tehnike, masenu spektrometriju i bioinformatiku, doprinosi novim saznanjima koji mogu da pomognu u razumevanju mehanizma razvoja ove odložene alergijske reakcije.

Veliki broj studija je do sada izučavao vezivanje IgE antitela za alergene modifikovane kako enzimski, tako i hemijski. Kako su rezultati ovih studija neretko bili i kontradiktorni, bilo je neophodno da se ispita uticaj hemijske modifikacije na glavne alergene kikirikija radi razvoja uspešne imunoterapije. Pokazano je da redukovanje disulfidnih veza nekih alergena hrane povećava digestibilnost, samim tim smanjuje alergenost. U proizvodnji alergoida pokazan je potencijalno koristan pristup za subkutanu imunoterapiju. U ovom slučaju, pokazano je da sam proces modifikacije mora biti kompletan, gde finalni produkti gube svoje proteinske strukture i sposobnost vezivanja IgE iz seruma pacijenata. Korišćenjem limitiranih uslova modifikacije dolazi do stvaranja heterogenih intermedijarnih produkata, koji su neželjeni u razvoju farmaceutskog produkta.

Iako se rezultati *in vitro* studija uzimaju sa rezervom kada je u pitanju alergenost proteina kikiriki, sve studije dolaze do zaključka o nastajanju proteazno-rezistentnih peptida koji još uvek nisu okarakterisani i identifikovani. U ovoj tezi su po prvi put detaljno identifikovani alergeni peptidi nastali tripsinskom digestijom glavnih alergena kikirikija, čija struktura ostaje očuvana kao kod nedigestovanih formi. Ovi rezultati mogu u mnogome da posluže u razvoju analitičkih

tehnika za ispitivanje prisustva alergena kikirikija u različitim *in vivo* stadijama, što pomaže boljem razumevanju mehanizma alergijske reakcije.

D. Objavljeni i saopšteni radovi koji čine deo teze

Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21):

1. **Apostolovic, D.**, D. Luykx, H. Warmenhoven, D. Verbart, D. Stanic-Vucinic, G. A. H. De Jong, T. C. Velickovic, and S. J. Koppelman. 2013. Reduction and Alkylation of Peanut Allergen Isoforms Ara h 2 and Ara h 6; Characterization of Intermediate- and End Products. *Biochimica Et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1834 (12): 2832-2842. (IF 2012: 3.73)
2. **Apostolovic, D.**, T. A. T. Tran, C. Hamsten, M. Starkhammar, T. Cirkovic Velickovic, and M. van Hage. 2014. Immunoproteomics of Processed Beef Proteins Reveal Novel Galactose- α -1,3-Galactose-Containing Allergens. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 69 (10): 1308-1315. (IF 2013 5.995)

Radovi u pripremi:

1. **Apostolovic, D.**, de Jongh, H.H.J., Stanic-Vucinic, D., de Jong G. A. H., Vesic, J., Radosavljevic, J., Nordlee, J. A., Baumert, J. L., Taylor, S. L., Clua, N. G., Cirkovic Velickovic, T., and Koppelman, S. J. Characterization of digestion-resistant peptides from peanut conglutins Ara h 2 and Ara h 6.

Saopštenja na skupovima međunarodnog značaja štampani u izvodu:

1. **Apostolovic D**, Stanic-Vucinic D, de Jong GA, Nordlee J, Baumert J, Taylor S, Garrido Clua N, de Jong HH, Cirkovic Velickovic T, Koppelman S. Molecular basis of the digestion-resistant peptides from the major peanut allergen Ara h 2. FEBS EMBO 2014 Conference, Paris, France, 30 August-4 September 2014. FEBS Journal 281(S1), p145.
2. Tran TAT, **Apostolovic, D**, Hamsten C, Starkhammar M, Smiljanic K, Bidgeli N, Cirkovic Velickovic T, van Hage M. Investigation of galactose-a-1,3-galactose epitope and immunoproteomic characterisation of thermally processed beef proteins. European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress, 7–11 June 2014, Copenhagen, Denmark. ALLERGY Journal 67(s96), p209.
3. **Apostolovic D**, Stanic-Vucinic D, de Jong GA, Nordlee J, Baumert J, Taylor S, Garrido Clua N, Cirkovic Velickovic T, de Jong HH, Koppelman S. Digestion-resistant peptides from conglutin isoforms Ara h 2 and Ara h 6; structure and IgE-binding. European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress, 7–11 June 2014, Copenhagen, Denmark. ALLERGY Journal 67(s96), p298.
4. Luykx D, **Apostolovic D**, Warmenhoven H, Verbart D, de Jong GAH, Koppelman SJ. Biochemical characterization of chemically modified Ara h 2 isoforms; structure-function relationships. XXXI Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology Abstract Book, Geneva, Switzerland, 16-20 June 2012, 67(s96), p542.

E. Zaključak komisije

Komisija je pregledala doktorsku disertaciju kandidata Danijele Apostolović, mastera biohemičara pod naslovom: „**Imunoproteomika alergena hrane, modifikovanih derivata alergena i alergeni peptida rezistentnih na digestiju**“ i zaključila da je disertacija proizvod samostalnog rada kandidata i da dobijeni rezultati predstavljaju kvalitetan doprinos u oblasti biohemije. Iz dobijenih rezultata su publikovana dva rada u vrhunskim međunarodnim časopisima, a još jedan rad je u pripremi. Takođe, iz dobijenih rezultata je proisteklo četiri saopštenja na skupovima međunarodnog značaja.

U ovoj disertaciji prvi put je ispitan proteinski profil alergena crvenog mesa. Identifikovano je sedam novih proteina koji sadrže IgE-reaktivnu oligosaharidnu komponentu, od kojih četiri ostaju stabilni i nakon termalne obrade. Modifikovani derivati izoformi Ara h 2 i Ara h 6 alergena, kao i njihovi intermedijerni produkti, su okarakterisani i ispitane su posledice modifikacije na njihovu strukturu i alergenost. Po prvi put su detaljno identifikovani i okarakterisani alergeni peptidi dobijeni *in vitro* tripsinskom digestijom izoformi Ara h 2 i Ara h 6 alergena.

Rezultati ove teze osim fundamentalnog značaja, imaju direktnu primenu u farmaceutskoj industriji, kao i u medicini za bolje razumevanje i dijagnostifikovanje uzročnika alergije na hranu.

Na osnovu svega navedenog Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Hemijskog fakulteta u Beogradu da prihvati podnetu doktorsku disertaciju master biohemičara Danijele Apostolović i odobri njenu javnu odbranu.

Beograd, 10.02.2015.

KOMISIJA

1. **dr Tanja Ćirković Veličković**, redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (mentor)

2. **dr Marija Gavrović-Jankulović**, redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

3. **dr Dragana Stanić-Vučinić**, viši naučni saradnik Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

4. **dr Ivanka Karadžić**, redovni profesor Institut za hemiju i medicinu, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
