

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета, Универзитета у Београду, одржаној 11.10.2018. године, одређени смо у Комисију за подношење извештаја о оцени научне заснованости и оправданости предложене теме за израду докторске дисертације Андријане Н. Нешић, мастер биохемичара, пријављене под називом:

„Ефекти протеазне активности актинидина на интегритет ћелија интестиналног епитела“

На основу проучене документације подносимо Наставно-научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Биографски подаци о кандидаткињи

Андријана Нешић рођена је 22.09.1988. године. у Нишу, Србија. Основну школу „Бата Булић“ завршила је у Петровцу на Млави 2002. године као носилац Вукове дипломе. Гимназију општег смера завршила је 2006. године, у Петровцу на Млави, као носилац Вукове дипломе. Хемијски факултет Универзитета у Београду, смер Биохемија, уписује исте године. Дипломирала је 11.07.2013. године са просечном оценом 8.45 и оценом 10 на завршном раду. Тема завршног рада била је „Производња Мус а 5, главног алергена банане, у *E. coli*“. Мастер академске студије на студијском програму Биохемија уписала је школске 2013/2014. године, а завршила 10.10.2014. године са просечном оценом 9,80 и оценом 10,00 на дипломском раду. Тема дипломског рада била је „Клонирање, експресија и пречишћавање рекомбинантног Мус а 5, алергена банане, у *E. coli*“. Докторске академске студије на студијском програму Биохемија уписала је школске 2014/2015. године при Катедри за биохемију, Хемијског факултета Универзитета у Београду. Кандидат је положио све планом и програмом предвиђене испите на докторским академским студијама са просечном оценом 10,00.

Од 2014. године, Андријана Нешић је на Хемијском факултету ангажована као сарадник у настави на курсевима: Молекуларна биотехнологија (452В1), Биоинформатика (451В1), Протеински терапеутици са основама Биоинформатике (433В1), Патобиохемија (422В1) и Имунохемија (421В1).

Током 2016. године, у оквиру *COST Action 1402*, Андријана је провела један месец усавршавајући се за примену техника у протеомици, на катедри за Биотехнологију Универзитета у Риједи. Кандидаткиња се током боравка бавила идентификацијом физиолошких супстрата актинидина, протеазе из кивија, коришћењем Сасо 2 ћелија као модел система.

Током 2018. године, у оквиру *COST Action 1402*, Андријана је провела три недеље у истраживачкој групи за Имунотоксикологију (*Institute for Risk Assessment Sciences (IRAS)*), Универзитета у Утрехту, Холандија. Током боравка у Холандији бавила се испитивањем протеолитичке активности актинидина из кивија на функцију епителних ћелија.

Б. Објављени научни радови и саопштења

Досадашње резултате истраживања кандидаткиња је публиковала у следећим научним радовима и саопштењима.

Радови објављени у врхунским међународним часописима са SCI листе (M21)

1. Nikolić J, Nešić A, Kull S, Schocker F, Jappe U, Gavrović-Jankulović M . Employment of proteomic and immunological based methods for the identification of catalase as novel allergen from banana. *J Proteomics*. 2018 Mar 20;175:87-94. doi: 10.1016/j.jprot.2018.01.007.
2. Nikolić J, Nešić A, Čavić M, Đorđević N, Anđelković U, Atanasković-Marković M, Drakulić B, Gavrović-Jankulović M . Effect of malondialdehyde on the ovalbumin structure and its interactions with T84 epithelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 2017 Feb;1861(2):126-134. doi:10.1016/j.bbagen.2016.11.02.
3. Milica M Grozdanovic, Milena Cavic, Andrijana Nešić, Uroš Andjelković, Peyman Akbari, Joost J Smit, Marija Gavrovic-Jankulovic. Kiwifruit cysteine protease

actinidin compromises the intestinal barrier by disrupting tight junctions. *Biochem Biophys. Acta* 2015.doi:10.1016/j.bbagen.2015.12.005

Саопштења са међународног скупа штампана у изводима (M34)

1. A. Nešić, J. Nikolić, U. Jappe, M. Gavrović-Jankulović. Catalase as a novel IgE reactive protein from banana should be involved in component resolved allergy diagnosis. 4th ImpARAS conference, Portici, Italy, June 19-21, 2018.
2. M. Gavrović-Jankulović, A. Nešić. Evaluation of structural features of recombinant Mus a 5 allergen from *Musa acuminata*, *The FEBS Journal*, Jerusalem, 10. - 14. Sep, 2017.
3. A. Nešić, U. Anđelković, M. Gavrović-Jankulović. Cloning, expression and purification of recombinant β -1,3-glucanase, allergen from banana, in the prokaryotic expression system. The Annual International Conference of the Romanian Society for Biochemistry & Molecular Biology, Timisoara, 8. - 9. Jun, 2017.
4. Marija Gavrović-Jankulović, Milica Grozdanović, Rajna Dimitrijević, Milica Popović, Ivan Mrkić, Andrijana Nešić. Recombinant allergens for diagnosis and treatment of allergies, FEBS3+ Meeting and 11th Meeting of the Slovenian Biochemical Society, Slovenian Biochemical Society, Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, Hungarian Biochemical Society and Serbian Biochemical Society, vol. , no. , pp. 52 - 52, issn: 987-961-93879-0-0 , Slovenija, 16. - 19. Sep, 2015.

Предавање по позиву са међународног скупа штампано у изводу (M32)

1. A. Nesic, U. Andjelkovic, Dj. Josic, M. Gavrović-Jankulović. Molecular characterization of recombinant Mus a 5 allergen from banana fruit. 2nd ImpARAS conference, Warsaw, Poland, September 20-22, 2016.

Одобрен патент на националном нивоу (M87 = 1)

1. Gavrović-Jankulović M, Nešić A. Немјски факултет, 2015. АЛЕРГЕН ЗА ДЕТЕКЦИЈУ СПЕЦИФИЧНИХ АНТИТЕЛА И ЊЕГОВА ПРИМЕНА. Србија. Исправа о патенту број 57352.

Ц. Образложење теме

1. Научна област Биохемија

Научна област је биохемија за коју је матичан Хемијски факултет Универзитета у Београду

2. Предмет рада

Предмет докторске дисертације је испитивање доприноса појединачног алергена на развој алергије на храну на моделу актинидина, цистеин протеазе из плода кивија, праћењем ефекта актинидина на интегритет интестиналних епителних ћелија и производњу сигналних молекула који покрећу урођени имунолошки одговор. Наиме, нарушавање епителне баријере представља молекулски механизам којим протеолитички ензими из одређеног алергеног извора могу да допринесу процесу сензитизације код првог типа имунолошке преосетљивости која се означава као алергија.

3. Научни циљ истраживања

У оквиру ове тезе формулисани су следећи циљеви:

1. Пречишћавање актинидина из плода кивија класичним биохемијским методама и одређивање протеолитичке активности
2. Испитивање ефекта актинидина на интегритет епитела гастроинтестиналног тракта миша (C57BL/6 сој) и експресију протеина чврстих веза (ZO-1, клаудин-3, E-кадхерин)
3. Испитивање ефекта актинидина на интегритет 2 Д органоида пореклом од мишјих интестиналних ћелија и производњу проинфламаторних цитокина (интерлеукин 33)
4. Испитивање ефекта актинидина на интегритет чврстих веза епителне ћелијске линије (Caco 2) *in vitro* и производњу проинфламаторних цитокина (ТНФ алфа, интерлеукин 1, интерлеукин 33 и тимусни стромални лимфопоетин)
5. Испитивање ефекта актинидина на чврсте везе (ZO-1, клаудин-3, E-кадхерин) у интестиналним епителним ћелијама.

4. Методе истраживања

У оквиру израде докторске тезе биће коришћене следеће експерименталне технике, с обзиром на захтеве исказане у циљевима:

- a) **Биохемијске методе:** Хроматографске методе (јоноизмењивачка хроматографија) у циљу изоловања и пречишћавања протеина; одређивање концентрације протеина бицинхонском методом, електрофоретске методе анализе протеина (енгл. SDS PAGE); спектрофотометријско одређивање протеолитичке активности ензима;
- b) **Методе молекуларне биологије:** гајење ћелија у култури, изоловање тоталне РНК, метода умножавања гена ланчаном реакцијом (енгл. PCR) за детекцију експресије проинфламаторних цитокина
- c) **Имунохемијске методе:** ЕЛИСА за квантификацију цитокина на протеинском нивоу, имуноблот за детекцију протеина специфичним антителима
- d) **Имунохистохемијске методе:** Бојење препарата ткива, ћелија и органоида специфичним антителима за протеине чврстих веза
- e) **Микроскопске методе:** Употреба флуоресцентног микроскопа за анализу профила протеина чврстих веза у епителним ћелијама

5. Актуелност проблематике у свету

Учесталост алергија на храну је у порасту последњих година а са њима се јавља потреба за развојем напреднијих дијагностичких метода. Такође, превенција и третман алергија на храну захтевају разумевање молекулских механизма који се налазе у основи сензитизације на одређени алергени извор¹. Киви (*Actinidia deliciosa*) је регистрован као извор алергена већ више од 30 година². До данас је идентификовано 13 алергена у кивију од којих је актинидин означен као маркер алерген за моносензитизацију на киви. Изостанак имунолошке реакције на антигене хране означена је као орална толеранција. Промена у толеранцији на протеине хране доводи до процеса сензитизације која је праћена производњом специфичног ИгЕ одговора на ове антигене који се означавају алергенима³. Актинидин - цистеин протеаза из кивија делимично је отпоран на дигестију у гастроинтестиналном тракту и при том задржава

протеолитичку активност, па се сматра да због тога може да изазове процес сензитизације имунолошког система^{4,5}.

Тренутно се као вид терапије алергије на киви саветује избегавање овог воћа као и одговарајућа анти-инфламаторна терапија која подразумева примену антихистаминика и кортикостероида. Постојећа фармакотерапија не пружа дугорочно ублажавање симптома алергије на храну. Разумевање молекулских основа процеса сензитизације у развоју алергије на храну могао би да унапреди терапијски третман. Наиме, новија истраживања указују да постоји директна комуникација између урођене и адаптивне имуности која је важна за започињање и развој алергије⁶. У развоју алергије на храну неопходно је детаљно разумевање молекулских догађаја који доводе до активације урођене имуности и процеса сензитизације. Због свега наведеног, у овој докторској тези ће се испитивати механизам активације урођене имуности при контакту алергена хране са епителним ћелијама интестиналног тракта на моделу актинидина - цистеин протеазе из кивија. За испитивање механизма сензитизације на алергене хране, као и испитивање ћелијских и молекулских догађаја, развијају се животињски модели⁷ а у новије време се гаје 2Д и 3Д органоиди – поједностављени органи произведени од плурипотентних матичних ћелија у *in vitro* условима како алтернатива употреби животиња у експерименталне сврхе⁸.

Литература:

1. Hugh A. Sampson, Liam O'Mahony, A. Wesley Burks, Marshall Plaut, Gideon Lack, FRCPCH, and Cezmi A. Akdis. Mechanisms of food allergy. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL*. 2018.
2. Fine AJ. Hypersensitivity reaction to kiwi fruit (Chinese gooseberry, *Actinidia chinensis*). *J Allergy Clin Immunol* 1981; 68:235–7.
3. Galand C, Leyva-Castillo JM, Yoon J, Han A, Lee MS, McKenzie AN, et al. IL33 promotes food anaphylaxis in epicutaneously sensitized mice by targeting mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 2016;138:1356-66.
4. Polovic N, Pjanovic R, Burazer L, Velickovic S, Jankov RM, Cirkovic Velickovic T. Acid-formed pectin gel delays major incomplete kiwi fruit allergen Act c 1 proteolysis in *in vitro* gastrointestinal digestion. *J Sci Food Agric*. 2009, 89(1): 8-14.
5. Grozdanovic MM, Ostojic S, Aleksic I, Andjelkovic U, Petersen A, Gavrovic-Jankulovic M. Active actinidin retains function upon gastro-intestinal digestion and is more thermostable than the E-64-inhibited counterpart. *J Sci Food Agric*. 2014 Nov;94(14):3046-52.

6. Simons E, Arduoso L, Bilo B, El-Gamal Y, Ledford D, Ring J, Sanchez-Borges M, Senna GE, Sheikh A, Thong B. World Allergy Organization Guidelines for the Assessment and Management of Anaphylaxis. *World Allergy Organiz J.* 2011, 4(2):13-37.
7. Joost Smit, Mary-lène de Zeeuw-Brouwer, Manon van Roest, Govardus de Jong, Jolanda van Bilsen. Evaluation of the sensitizing potential of food proteins using two mouse models. *Toxicology Letters* 262 (2016) 62–69.
8. Van der Wielen N, Ten Klooster JP, Muckenschnabl S, Pieters R, Hendriks HF, Witkamp RF, Meijerink J. The Noncaloric Sweetener Rebaudioside A Stimulates Glucagon-Like Peptide 1 Release and Increases Enteroendocrine Cell Numbers in 2-Dimensional Mouse Organoids Derived from Different Locations of the Intestine. *J Nutr.* (2016) 146:2429- 2435.

4. Очекивани резултати

У оквиру ове докторске дисертације, очекује се расветљавање молекулских основа којим актинидин утиче на интегритет монослоја епителних ћелија гастроинтестиналног тракта, као и у којој мери третман актинидином доводи до откључавања гена за проинфламаторне цитокине у епителним ћелијама а затим и до њихове синтезе и ослобађања. У *in vivo* студијама испитаће се у којој мери актинидин утиче на пропустљивост епителних ћелија интестиналног тракта, и да ли овакав третман утиче на експресију гена који кодирају протеине чврстих веза као и цитокине у различитим деловима интестиналног тракта. Узгајањем 2Д органоида пореклом од интестиналних ћелија миша, испитаће се ефекат актинидина на генску експресију и протеинску производњу цитокина. Такође, 2Д органоиди ће се користити за анализу ефекта актинидина на протеине чврстих веза ћелија. Упоредна анализа генске експресије цитокина у *in vivo* условима и 2Д органоидима треба да покаже да ли и у којој мери су органоиди погодна замена за извођење експеримената на животињама у моделу алергије на храну. Коришћењем хуманих ћелијских линија испитиваће се дејство актинидина на пропустљивост епителног монослоја, као и на продукцију проинфламаторних цитокина.

Као финални резултат ових експеримената се очекује детаљно разумевање дејства актинидина, алергена хране са протеазном активношћу, на активацију сигналних путева у епителним ћелија гастроинтестиналног тракта који доводе до ослобађања проинфламаторних цитокина, и на тај начин активирају остале компоненте урођене имуности. Поред разумевања молекулских основа активације урођене имуности на

моделу алергена хране са протеазном активношћу, ови резултати могу да допринесу развоју нових облика имунотерапије код алергије на храну.

Д. Закључак

На основу свега наведеног, Комисија предлаже назив докторске тезе под насловом:

„Ефекти протеазне активности актинидина на интегритет ћелија интестиналног епитела“

Комисија је мишљења да је предложена тема научно заснована, да се уклапа у савремене трендове истраживања у области молекулске алергологије и да кандидат Андријана (Небојша) Нешић, мастер биохемичар, испуњава све услове за почетак израде докторске тезе за стицање академског звања ДОКТОР БИОХЕМИЈСКИХ НАУКА. Зато препоручујемо Наставно–научном већу Хемијског факултета у Београду да одобри кандидату израду докторске дисертације под наведеним насловом. За ментора предлажемо проф. др Марију Гавровић-Јанкуловић, редовног професора Хемијског факултета.

Чланови Комисије:

1. др Марија Гавровић-Јанкуловић, редовни професор, Хемијски факултет, Универзитет у Београду (ментор)

2. др Милица Поповић, доцент, Хемијски факултет, Универзитет у Београду

3. др Милена Чавић, научни сарадник, Институт за онкологију и радиологију Србије, Београд,

У Београду,

28.12.2018.