

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА

Одлуком Наставно-научног већа Хемијског факултета од 08.11.2018 године одређени смо у комисију за оцену испуњености услова и научне заснованости предложене теме за израду докторске дисертације **Јелене Д. Михаиловић, мастер биохемичара**, под насловом:

„Протеомика и интерактомика антигена бактеријског, биљног и животињског порекла од интереса у алергијама на храну и окуларним инфекцијама”

На основу ове Одлуке Наставно-научном већу, подносимо следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Биографски подаци о кандидаткињи

Лични подаци

Јелена Михаиловић (рођена Весић) рођена је 16. 08. 1984. у Београду.

Образовање

Основну и средњу школу (XII београдска гимназија Димитрије Туцовић - општи смер) завршила је у Београду као носилац специјалне дипломе из енглеског језика.

Основне студије на Хемијском факултету Универзитета у Београду, смер Биохемија, уписала је 2004. године, а дипломирала 2010. године са просечном оценом 8,12 и оценом

10 на дипломском раду. Тема дипломског рада је била: “Испитивање антибактеријског дејства прополиса екстрахованог различитим растварачима на *Echerichia coli* гајену на различитим рН вредностима”.

Мастер студије у истој институцији је уписала 2011. године, а звање Дипломирани биохемичар – Мастер стекла је 2012. године са просечном оценом 9,60 и оценом 10 на дипломском раду, под насловом: "Интеракције глобуларних алергена хране са епигалокатехин-3-галатом”.

Школске 2012/13. године је уписала докторске студије на програму Доктор биохемијских наука при Катедри за биохемију Хемијског факултета Универзитета у Београду.

Радно искуство

Марта 2011. почиње са волонтерским радом у истраживачкој групи проф. др Тање Ћирковић Величковић на Хемијском факултету Универзитета у Београду.

У априлу 2012. године ангажована је као Стручни сарадник у лабораторији за масену и CD спектрометрију Хемијског факултета Универзитета у Београду. Наведено радно место у 2018. години добија назив Самостални стручно-технички сарадник за рад у лабораторијама или центрима.

Одлуком Наставно-научног већа Хемијског факултета 2018. године стиче звање истраживач сарадник.

Учествовала је у организацији више конференција, радионица и школа.

Стручна усавршавања

Током 2013. године провела је месец дана на Одељењу за проучавање биополимера и структурну биологију у институту INRA, Нант, Француска, где се, радећи на пројекту оптимизације квантификације протеина семена *Brachypodium distachyon*, обучавала за рад на LTQ Orbitrap Velos масеном спектрометру. У INRA је боравила као стипендиста у оквиру пројекта FP7 RegPot FCUB-ERA 256716.

Добитник је Basileus V стипендије у оквиру Erasmus mundus 2 програма. Захваљујући наведеној стипендији, 2014. године проводи месец дана у Центру за молекуларну биологију

и хемију (ZMBH), Хајделберг, Немачка, где је радила на детекцији фосфопептида на LTQ Orbitrap XL масеном спектрометру.

У оквиру билатералног пројекта “Нови механизам егзозомалног трансфера проинфламаторног сигнала из ћелија које носе мутацију L265P MyD88, повезану са лимфомом” чији су носиоци Хемијски факултет Универзитета у Београду и Хемијски институт, Љубљана, Словенија, 2016. године је провела 2 недеље у Хемијском институту радећи на пречишћавању екстрацелуларних везикула и обогаћивању екстракта молекулима од значаја за ћелијску сигнализацију и ширење лимфома – MyD88.

У оквиру мултилатералног пројекта под насловом „Геномика, транскриптомика, дигестомика и мишји модел сензитизације на липид-трансфер протеине“ између Србије, Словачке и Аустрије (Програма мултилатералне научне и технолошке сарадње у Дунавском региону, суфинансираног од стране МПНТР РС), током 2017. године борави 2 недеље на Medical university of Vienna, Беч, Аустрија, где се обучава за рад са мишевима, као и за дизајн *in vivo* студија алергијских и сличних поремећаја.

Б. Објављени научни радови и саопштења кандидаткиње

Кандидаткиња је до сада објавила 1 поглавље у истакнутој монографији међународног значаја (M13) и 11 научних радова у часописима међународног значаја (од којих 7 M21a, 3 M21 и један M24). На научним скуповима од националног и међународног значаја кандидаткиња је имала укупно 25 саопштења.

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

Монографије, монографске студије, тематски зборници, лексикографске и картографске публикације међународног значаја

M13 - Монографске студије/поглавља у књизи M11 или рад у тематском зборнику водећег међународног значаја

1. T. Cirkovic Velickovic, D. Stanic-Vucinic, A. Al-Hanish, **J. Mihailovic**, I. Prodic, S. Minic, M. Stojadinovic, M. Radibratovic, M. Milcic. Delivery of epigallocatechin-3-gallate by bovine alpha-lactalbumin based on their non-covalent interactions. *Encyclopedia of Food Chemistry, 1st Edition*. Ed. P. Varelis, L. Melton, F. Shahidi. Amsterdam: Elsevier; 2018. ISBN: 9780128140260

Научни радови објављени у часописима међународног значаја M20

M21a - Радови у међународном часопису изузетних вредности

1. Marija Stojadinovic, Jelena Radosavljevic, Jana Ognjenovic, **Jelena Vesić**, Ivana Prodic, Dragana Stanic-Vucinic, Tanja Cirkovic Velickovic, Binding affinity between dietary polyphenols and b-lactoglobulin negatively correlates with the protein susceptibility to digestion and total antioxidant activity of complexes formed, *Food Chemistry*, Elsevier, 136, 3-4, pp. 1263 - 1271, 0308-8146, 10,1016/j.foodchem.2012.09.040, 2013. (IF 3,655 од 2011)
2. Jana Ognjenovic, Marija Stojadinovic, Milos Milcic, Danijela Apostolovic, **Jelena Vesić**, Ivan Stambolic, Marina Atanaskovic-Markovic, Miljan Simonovic, Tanja Cirkovic Velickovic, Interactions of epigallo-catechin 3-gallate and ovalbumin, the major allergen of egg white, *Food Chemistry*, Elsevier, 164, pp. 36 - 43, 0308-8146, 10,1016/j.foodchem.2014.05.005, 2014. (IF 3,391 од 2014)
3. **Jelena Vesić**, Ivan Stambolic, Danijela Apostolovic, Milos Milcic, Dragana Stanic-Vucinic, Tanja Cirkovic Velickovic, Complexes of green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, and 2S albumins of peanut, *Food Chemistry*, Elsevier, 185, pp. 309 - 317, 0308-8146, 10,1016/j.foodchem.2015.04.001, 2015. (IF 4,052 од 2015)
4. Ayah Al-Hanish, Dragana Stanic-Vucinic, **Jelena Mihailović**, Ivana Prodic, Simeon Minic, Marija Stojadinovic, Milica Radibratovic, Milos Milcic, Tanja Cirkovic Velickovic, Noncovalent interactions of bovine a-lactalbumin with green tea polyphenol,

epigallocatechin-3-gallate, Food Hydrocolloids, Elsevier BV, 61, pp. 241 - 250, 0268-005X, 10,1016/j.foodhyd.2016.05.012, 2016. (IF 4,747 од 2016)

5. Danijela Apostolovic, Dragana Stanic-Vucinic, Harmen H. J. de Jongh, Govardus A. H. de Jong, **Jelena Mihailović**, Jelena Radosavljevic, Milica Radibratovic, Julie A. Nordlee, Joseph L. Baumert, Milos Milcic, Steve L. Taylor, Nuria Garrido Clua, Tanja Cirkovic Velickovic, Stef J. Koppelman, Conformational stability of digestion-resistant peptides of peanut conglutins reveals the molecular basis of their allergenicity, Scientific reports, NATURE PUBLISHING GROUP, 6, pp. 29249 - 29260, 2045-2322, 10,1038/srep29249, 2016. (IF 5.578 од 2014)
6. Marija Peruško, Ayah Al-Hanish, **Jelena Mihailović**, Simeon Minić, Sara Trifunović, Ivana Prodić, Tanja Ćirković Veličković, Antioxidative capacity and binding affinity of the complex of green tea catechin and beta-lactoglobulin glycated by the Maillard reaction, Food Chemistry, 232, pp. 744 - 752, 10,1016/j.foodchem.2017.04.074, 2017. (IF 4,529 од 2016)
7. Simeon Minic, Mirjana Radomirovic, Nina Savkovic, Milica Radibratovic, **Jelena Mihailovic**, Tamara Vasovic, Milan Nikolic, Milos Milcic, Dragana Stanic-Vucinic, Tanja Cirkovic Velickovic. Covalent binding of food-derived blue pigment phycocyanobilin to bovine β -lactoglobulin under physiological conditions, Food Chemistry, Elsevier, 269, pp 43 – 52, 10,1016/j.foodchem.2018.06.138, 2018 (IF 4.052 од 2015)

M21 - Радови у врхунским међународним часописима

1. Simeon Minic, Dragana Stanic-Vucinic, **Jelena Mihailović**, Maja Krstic, Milan Nikolic, Tanja Cirkovic Velickovic. Digestion by pepsin releases biologically active chromopeptides from C-phycocyanin, a blue-colored biliprotein of microalga Spirulina, Journal of Proteomics, Elsevier BV, 147, pp. 132 - 139, 1874-3919, 10,1016/j.jprot.2016.03.043, 2016. (IF 3,914 од 2016)
2. Danijela Apostolović, Maja Krstić, **Jelena Mihailović**, Maria Starkhammar, Tanje Ćirković Veličković, Carl Hamsten, Marianne van Hage. Peptidomics of an in vitro digested α -Gal

carrying protein revealed IgE-reactive peptides, Scientific Reports, Springer Nature, 7, 5201, pp. 1 - 10, 2045-2322, 10,1038/s41598-017-05355-4, 2017. (IF 5,228 од 2015)

3. Ivana Prodic, Dragana Stanic-Vucinic, Danijela Apostolovic, **Jelena Mihailovic**, Milica Radibratovic, Jelena Radosavljevic, Lidija Burazer, Milos Milcic, Katarina Smiljanic, Marianne van Hage, Tanja Cirkovic Velickovic. Influence of peanut matrix on stability of allergens in gastric-simulated digesta: 2S albumins are main contributors to the IgE-reactivity of short digestion resistant peptides, Clin Exp Allergy, John Wiley & Sons, 48, pp 731–740 10,1111/cea.13113, 2018. (IF 4,887 од 2017)

M24 - Радови у националним часописима међународног значаја

1. **Jelena Mihailović**, Aleksandra Inic-Kanada, Katarina Smiljanic, Elisabeth Stein, Talin Barisani-Asenbauer, Tanja Cirkovic Velickovic. Lysine acetylation of major Chlamydia trachomatis antigens, EuPA Open Proteomics, Elsevier, 10, pp. 63 - 69, 2212-9685, 10,1016/j.euprot.2016.01.007, 2016.

Радови саопштени на научним скуповима

M34 - Саопштења са међународних скупова штампана у изводу

1. **J. Mihailović**, L. Mihajlovic, D. Stanić-Vučinić, T. Ćirković-Veličković, Semi-preparative purification and quantification of epigallocatechin-3-gallate from teas, coffee and cocoa, 2nd FCUB ERA Workshop: Food Chemistry and Biotechnology, Beograd, Srbija, Oct. 2011, pp. 46 - 46
2. **J. Mihailović**, I. Stambolic, D. Apostolovic, M. Milčić, Tanja Ćirković-Veličković, Determination and modelling of interactions between EGCG and globular food allergens, First International Conference on Food Digestion, COST Action FA1005 INFOGEST, Cesena, Italija, Mar. 2012, pp. 116 - 116
3. M. Stojadinović, J. Ognjenovic, J. Radosavljević, **J. Vesić**, I. Prodić, D. Stanić-Vučinić, T. Ćirković-Veličković, Non-covalent interactions between dietary polyphenols and bovine

- beta-lactoglobulin: Effect on the protein structure, digestibility and total antioxidant capacity, 22nd IUBMB Congress/37th FEBS Congress, Sevilja, Španija, Sep. 2012, pp. 400 - 400
4. **J. Mihailović**, I. Stambolic, D. Apostolović, M. Milčić, T. Ćirković Veličković, Determination and modelling of interaction between EGCG and globular food allergens, 1st International Conference on Food Digestion, COST Action FA1005 Infogest, Cesena, Italy, Mar, 2012, pp. 116 - 116
 5. **J. Mihailović**, D. Apostolović, I. Prodić, T. Ćirković Veličković, Covalent interactions between epigallocatechin-3-gallate and major globular food allergens, Belgrade Food International Conference - Food, health and well being, Beograd, Srbija, Nov. 2012, pp. 94 - 94
 6. **J. Mihailović**, D. Apostolović, M. Milčić, T. Ćirković Veličković, The effect of epigallocatechin-3-gallate on major peanut allergens' structure, FEBS EMBO 2014 Conference, Paris, France, Sep. 2014, pp. 173 - 173
 7. D. Apostolovic, D. Stanic-Vucinic, H. H. J. de Jongh, G. A. H. de Jong, **J. Vesić**, J. Radosavljevic, M. Radibratovic, J. A. Nordlee, J. L. Baumert, M. Milcic, S. L. Taylor, N. Garrido Clua, S. J. Koppelman, T.a Cirkovic Velickovic, Conformational stability of digestion-resistant peptides of major peanut allergens, Ara h 2 and Ara h 6 reveals molecular basis of their allergenicity, 1st International ImpARAS Conference, Beograd, Srbija, Nov. 2015, pp. 25
 8. S. Minić, M. Krstić, D. Apostolović, **J. Mihailović**, D. Stanić-Vučinić, M. Nikolić, T. Ćirković Veličković, Digestion-released antioxidative chromopeptides of C-phycoyanin, a chromoprotein of blue-green alga Spirulina, exert cytotoxic effect in human cervical adenocarcinoma and colonic cancer cells, EuroFoodChem XVIII, Royal society of chemistry, Madrid, Spain, Oct. 2015, pp. P23 - P23
 9. I. Prodić, D. Apostolović, J. Radosavljević, **J. Mihailović**, D. Stanić-Vučinić, T. Ćirković Veličković, Characterization of gastric-phase products of raw peanut digested according to the harmonized static digestion method suitable for solid food., 1st International ImpARAS Conference, Belgrade, Serbia, Nov. 2015.
 10. S. Minić, M. Krstić, D. Apostolović, **J. Vesić**, D. Stanić-Vučinić, M. Nikolić, T. Ćirković Veličković, Pepsin digestion of C-phycoyanin releases chromopeptides with potent

anticancer and antioxidant activities, FEBS congress 2015, Berlin, Germany, July 2015, pp. 134 - 135

11. A. Inic-Kanada, K. Smiljanic, E. Stein, **J. Mihailović**, P. Ristivojevic, H. Chalabi, M. Krstic, N. Schuerer, M. Perusko, S. Trifunovic, D. Stanic-Vucinic, T. Cirkovic Velickovic, T. Barisani-Asenbauer, Identification and quantification of trachoma associated *Chlamydia trachomatis* antigens., 8th Meeting of The European Society for Chlamydia Research, European Society for Chlamydial Research, Oxford, United Kingdom, Sep. 2016, pp. A24 - A24
12. A. Inic-Kanada, K. Smiljanic, E. Stein, **J. Mihailović**, H. Chalabi, P. Ristivojevic, N. Schuerer, M. Krstic, T. Cirkovic Velickovic, T. Barisani-Asenbauer, Immunoproteomics of Relevant Chlamydial Antigens in Trachomatous Trichiasis Patients, Deutcher Chlamydien Workshop 2016, Freiburg, Germany, Mar. 2016
13. D. Apostolović, **J. Mihailović**, M. Krstić, M. Starkhammar, T. Ćirković Veličković, C. Hamsten, M. van Hage, Peptidomics of α -Gal carrying protein – stability and allergenic properties., Food Allergy and Anaphylaxis Meeting (FAAM), Rome, Italy, Oct. 2016.
14. T. Barisani-Asenbauer, A. Inic-Kanada, K. Smiljanic, E. Stein, **J. Mihailović**, N. Schuerer, E. Ghasemian, T. Cirkovic Velickovic, Immunoproteomics of Relevant Chlamydial Antigens in Trachomatous Trichiasis Patients from Ethiopia and Sudan, Investigative Ophthalmology and Visual Science, ARVO Annual Meeting 2016, Sietl, Washington, USA, May, 2016, pp. 4811 - 4811
15. I. Prodić, D. Apostolović, D. Stanić-Vučinić, J. Radosavljević, **J. Mihailović**, T. Ćirković Veličković, Digestomics of Raw Peanut and Characterization of Gastric-Phase Released Peptides of Peanut Allergens, 15th Human Proteome Organization World Congress (HUPO), Taipei, Taiwan, Sep. 2016.
16. **J. Mihailović**, K. Smiljanic, A. Inic-Kanada, E. Stein, M. Perusko, S. Trifunovic, N. Schuerer, D. Stanic Vucinic, E. Ghasemian, T. Barisani-Asenbauer, Tanja Cirkovic Velickovic, Trachoma associated *Chlamydia trachomatis* antigens quantitative study. X Annual Congress of the European Proteomics Association 2016, Istanbul, Turkey, Jun. 2016, P36
17. D. Apostolović, S. Commins, **J. Mihailović**, M. Starkhammar, T. Ćirković Veličković, T. Platts-Mills, C. Hamsten, M. van Hage, IgE and allergenic activity against α -Gal containing

proteins in the ticks *Ixodes ricinus* and *Amblyomma americanum*, 7th International Symposium on Molecular Allergology (ISMA) Luxembourg, Luxembourg, Nov. 2017

18. E. Stein, **J. Mihailović**, A. Inic-Kanada, K. Smiljanic, M. Perusko, S. Trifunović, N. Schuerer, D. Stanic-Vucinic, E. Ghasemian, T. Barisani-Asenbauer, T. Cirkovic Velickovic, Quantitative proteome study of *Chlamydia trachomatis* ocular serovar B proteins associated with trachomatous trichiasis, Investigative Ophthalmology and Visual Science, . ARVO Annual Meeting 2017, Baltimore, MD, USA, Jun. 2017, pp. 3575 - 3575
19. S. Liu, **J. Mihailovic**, K. Smiljanic, M. Epstein, T. Cirkovic Velickovic, Characterisation of peanut allergens and possible post-translational modifications (PTMs), 4th ImpARAS conference Portici, Italy, Jun. 2018, F03, pp 57
20. I. Prodic, P. Dubiela, **J. Mihailovic**, D. Stanic-Vucinic, K. Smiljanic, K. Hoffmann-Sommergruber, T. Cirkovic Velickovic, Digestomics of walnut and its nsLTPs allergens reveals their ultimate resistance to gastric digestion. 4th ImpARAS conference Portici, Italy, Jun. 2018, F05, pp 59

M64 - Саопштења са скупова националног значаја штампана у изводу

1. **J. Mihailović**, D. Stanić-Vučinić, T. Ćirković-Veličković, Semi-preparative separation and purification of catechins from green tea extract and comparison with black tea and cacao extracts, 2nd CEFSE Workshop, Novi Sad, Serbia, Sep. 2011, pp. 22 - 22
2. **J. Mihailović**, Lysine acetylation of major *Chlamydia trachomatis* serovar B antigens, Serbian Biochemical Society Fifth Conference - Integrated research in life science, Belgrade, Serbia, Nov. 2015, pp. 115 - 115
3. I. Prodić, D. Stanic-Vucinić, D. Apostolović, **J. Mihailović**, J. Radosavljević, K. Smiljanić, T. Ćirković Velicković, Whole grain of peanut digestomics according to harmonized static digestion protocol suitable for solid food and characterization of short digestion resistant fragments, 7th Meeting of the Serbian Biochemical Society, Belgrade, Serbia, Nov. 2017, pp. 195 - 197
4. I. Prodić, D. Stanić-Vučinić, D. Apostolović, **J. Mihailović**, J. Radosavljević, K. Smiljanić, T. Ćirković Veličković, Digestion stability and allergenic potential assessment of peanut

allergen gastric digesta fragments in harmonized static in vitro digestion protocol, 54th Meeting of the Serbian Chemical Society, Belgrade, Serbia, Sep. 2017 pp. 50 - 50

5. **J. Mihailović**, D. Apostolovic, K. Smiljanic, T. Cirkovic Velickovic, Posttranslacione modifikacije (PTM) epitopa glavnih alergena kikirikija nastale kao rezultat prečišćavanja, 55. savetovanje Srpskog hemijskog društva, Novi Sad, Srbija, Jun. 2018, BH P01, pp66

V. Образложење теме

1. Научна област:

Научна област предложене теме је биохемија (протеомика, квантификација протеина, анализа посттранслационих модификација и интеракција протеина), за коју је матичан Хемијски факултет Универзитета у Београду.

2. Предмет рада:

Предмет истраживања предвиђених овом докторском дисертацијом је карактеризација антигена пореклом из три царства – бактеријског, биљног и животињског. Биће урађена протеомичка анализа, квантификација и анализа ко- и посттранслационих модификација (ПТМ) антигена. Поред тога, биће испитане интеракције селектованих антигена са релевантним биолошким молекулима / структурама. Циљ планираних испитивања је сагледавање улоге специфичних антигена у различитим видовима имунског одговора. Према типу имунског одговора који покрећу протеини који ће бити у фокусу истраживања ове докторске тезе дефинисана су два дела истраживања.

Фокус првог дела истраживања ће бити на протеинима који се доводе у везу са нутритивним алергијама, са акцентом на епитопске секвенце описане у литератури и ту ће бити испитане:

- количина, односно заступљеност главних алергена кикирикија у термички третираном и нетретираном протеинским екстракту

- хемијске модификације и ПТМ главних алергена кикирикија, које настају као резултат термичке обраде кикирикија
- ковалентне и нековалентне интеракције главних алергена кикирикија са молекулима матрикса хране
- карактеристике и модификације протеина пореклом из говеђег меса и крпеља који се повезују са алергијама на црвено месо

У другом делу истраживања ће бити анализиран протеом елементарног тела (*енгл. elementary body*) грам негативне бактерије *Chlamydia trachomatis*, серовар В (*CtB*), која изазива окуларне инфекције. Истраживања ће обухватати:

- квантификацију *CtB* протеина са посебним освртом на удео имунореактивних протеина
- испитање ПТМ *CtB* антигена, са акцентом на ацетилацију лизина, као новооткривене ПТМ у свету прокариота.
- утврђивање релевантности уочених ПТМ за имунореактивност *CtB* антигена

Количине имунореактивних протеина и њихови релативни удели код окуларног соја *CtB* ће бити упоређени са доступним резултатима који се односе на антигене гениталних сојева *C. trachomatis*. Релевантност уочених ПТМ за имуногеност одређених *CtB* протеина биће процењена кроз поређење са доступним подацима који се односе на њихову имунореактивност. У крајњој инстанци, релевантност ових детаљних и квантитативних истраживања *CtB* протеома је дизајну и припреми прве окуларне вакцине против трахоме.

3. Циљ рада

Циљ рада је разумевање повезаности између (1) количине, модификација и интеракција које успостављају специфични антигени различитог порекла (бактеријског, биљног и животињског) и (2) њихових функционалних карактеристика битних за успостављање одређеног типа имунског одговора (подложности деловању дигестивних ензима,

имунореактивност и сл.). Ради остварења наведеног циља, у оквиру докторске тезе формулисано је неколико истраживачких задатака:

- 1) Квалитативна и квантитативна карактеризација посттранслационих и хемијских модификација главних алергена кикирикија насталих током термалног третмана
- 2) Испитивање интеракција биоактивних молекула матрикса хране са главним алергенима кикирикија *Ara h 2* и *Ara h 6* и њиховог утицаја на структуру алергена
- 3) Анализа ПТМ гликопептида од значаја у алергији на црвено месо масеном спектрометријом
- 4) Карактеризација протеинског састава екстракта европских крпеља *Ixodes ricinus* и ПТМ протеина који се повезују са развојем алергије на црвено месо
- 5) Квалитативна карактеризација протеома елементарног тела (*енгл. elementary body*) грам негативне бактерије CtV
- 6) Квантификација већ описаних имунореактивних протеина у CtV екстракту
- 7) Испитивање ПТМ CtV протеинског екстракта, са акцентом на ацетилацију лизина као новооткривене ПТМ у свету прокариота

4. Методе истраживања

Како би се остварили наведени циљеви, у току израде докторске дисертације биће коришћене следеће експерименталне методе:

- **Биохемијске методе:** одређивање концентрације протеина бицихронском методом, електрофоретске методе анализе протеина (SDS PAGE, 2D PAGE);
- **Структурне инструменталне методе:** испитивање интеракција протеина и малих молекула снимањем спектра методама флуориметрије и циркуларног дихроизма (CD);
- **Тестови дигестибилности и ензимски есеји:** испитивање дигестибилности протеина у симулираним условима интестиналног тракта *in vitro*, уклањање шећера са протеина ензимским путем;

- **Методе протеомике:** исецање електрофоретски раздвојених протеинских трака и њихова дигестија у гелу, течна хроматографија-масена спектрометрија (LC-MS) у циљу карактеризације протеина и пептида;
- **Биоинформатичке методе:** софтверско претраживање протеинских база података ради идентификације протеина, посттранслационих и хемијских модификација и квантификације познатих имунореактивних протеина (антигена) коришћењем PEAKS и Max Quant алгоритама, поређење протеинских секвенци коришћењем BLAST и ALIGN алатки.

5. Актуелност проблематике у свету

Упркос напретку технологије и развоју нових експерименталних приступа, детаљне структурне карактеристике великог броја протеина су још увек непознате. Непознаницу првенствено представљају модификације протеина које се дешавају у биолошким системима, а које могу битно утицати на њихове функционалне карактеристике. Алергије и бактеријске инфекције представљају велики проблем савременог друштва, а дизајнирање ефикасних приступа за њихов третман су изазов великом броју научника. Недовољно изучена веза између структуре и функције релевантних антигена један је од разлога што, упркос интензивним истраживањима, за велики број алергија и бактеријских инфекција још увек не постоји ефикасан профилактички и/или терапијски приступ. Стога ће у оквиру ове тезе бити анализирани структурне карактеристике и њихов утицај на функционалне карактеристике протеина који могу покренути алергијску реакцију (нутритивне алергије) или су битни за развој бактеријске инфекције (окуларна хламидијална инфекција) у организму.

Алергија на храну представља претерану реакцију имуног система на храну. Алергијска реакција изазива симптоме који могу бити благи (нпр. свраб, отицање језика и грла, ринитис), али и веома озбиљни (анафилакса) и могу довести до смрти. Према најновијим проценама 4 – 8% светске популације пати од неке форме алергије на храну [1]. Тренутно не постоји лек против алергије на храну и избегавање хране која изазива алергијску

реакцију је једини начин за спречавање озбиљних последица. У том смислу, прецизна и правовремена дијагностика нутритивних алергија је од непроцењивог значаја.

Алергија на кикирики је окарактерисана као једна од најопаснијих због своје преваленце, перзистентности и озбиљности симптома [2]. Кикирики је широко распрострањена намирница и у прехранбеној индустрији се често користи као додатак производима. До сада је окарактерисано 11 протеина кикирикија који изазивају алергију. *Ara h 1*, *Ara h 2*, *Ara h 3* и *Ara h 6* се сматрају главним алергенима кикирикија јер изазивају реакцију у бар 50% пацијената алергичних на кикирики [3]. Алергија на црвено месо (говедина, јагњетина и свињетина) је новооткривен тип алергијске реакције одложеног типа, са симптомима који се развијају 3 – 8 сати након ингестије. Имуни систем особа са дијагнозом алергије на црвено месо реагује на шећерну структуру галактоза-алфа-1,3-галактоза (*α -Gal*) која се налази на гликопротеинима и гликолипидима свих сисара осим примата [4]. Сматра се да поред ингестије црвеног меса, алергијску реакцију могу изазвати и крпељи који уједом могу пренети *α -Gal* носеће протеине са животиња на људе [5].

Карактеризација протеина који изазивају алергијске реакције методама протеомике и проучавање њихових модификација и интеракција са другим молекулима хране би могла допринети развоју стратегија за превенцију и лечење. Сматра се да би врста и позиција модификација наведених алергена могли специфично утицати на њихове функционалне особине попут подложности деловању ензима дигестивног тракта и алергеност, али ова узрочно-последична веза није у потпуности испитана.

Одлука да део истраживања у оквиру израде ове докторске тезе буде фокусиран на антигене *Chlamydia trachomatis* (Ct) донета је на основу чињенице да је Ct, грам-негативна бактерија и облигатни интрацелуларни паразит, водећи инфективни узрочник губитка вида (слепила) и стерилитета [6]. Бактерије врсте Ct разврстане су на окуларне, гениталне и лимфогранулома сероваре. Упркос интензивним истраживањима, механизми патогености Ct као и фактори који воде у перзистентну инфекцију у значајном проценту инфицираних људи, још увек су недовољно познати [7]. Последица тога је да још увек није формулисана ефикасна вакцина против Ct инфекција.

Скоро 800 милиона људи широм света пати од губитка вида изазваног инфекцијом *St*, док је 500 милиона под ризиком да ослепи у ендемским подручјима [8]. Једини сигуран начин за ефикасно и дугорочно решење оваквог проблема представља ефикасна вакцина [9]. Истраживања чији је главни циљ формулисање вакцине која би омогућила ефикасну контролу хламидијалних инфекција обухватају испитивања оптималне руте имунизације, погодног адјувантног система / система за допремање вакциналних антигена, као и дефинисање кључних вакциналних антигена. Детаљне протеомичке анализе су од великог значаја у тим истраживањима јер омогућавају добар увид у структуру протеинских антигена. Протеомичке анализе указују на велики број различитих ПТМ и дају основ за истраживања функционалне улоге тих модификација. У оквиру планираних истраживања на *St* протеинима посебна пажња ће бити посвећена ацетилацији лизина као новооткривеној ПТМ у свету прокариота [10]. Такође, планиране анализе могу допринети објашњењу због чега је *St* толико успешна и истрајна у инфекцији јер, у односу на геномске студије, дају одговор о нивоу експримираних протеина, као и њиховим модификацијама у појединим развојним условима и фазама животног циклуса патогена.

6. Очекивани резултати

У овој тези ће бити разматрани антигени биљног и животињског порекла који су укључени у поремећај алергије на храну и бактеријски антигени који могу имати важну улогу у развоју имунског одговора против инфекција.

У оквиру тезе биће анализирани главни алергени изоловани из сировог или термички обрађеног кикирикија. Биће урађена дигестија ових алергена ради анализе течном хроматографијом-масеном спектрометријом (LC-MS). Добијени спектри пептида ће бити упоређени са протеинским базама података помоћу PEAKS и Max Quant алгоритама, ради идентификације, квантификације антигена и анализе њихових хемијских и посттранслационих модификација. Очекује се да ова истраживања покажу да ли и у којој мери термичка обрада утиче на заступљеност и особине главних алергена кикирикија. Такође, спетроскопским методама (флуориметријски и CD) ће бити испитане

нековалентне интеракције које се успостављају између алергена кикирикија *Ara h 2* и *Ara h 6*, и главног фенола зеленог чаја *EGCG* и начин на који он утиче на њихову структурну стабилност. На дигестивност наведених протеина би првенствено могле утицати интеракције и модификације у близини места деловања протеолитичких ензима, док би модификације у оквиру епитопских секвенци протеина кикирикија могле имати утицаја на способност везивања антитела а тиме и на интензитет алергијске реакције. Планирана истраживања би требало да покажу у којој мери су уочене модификације протеина кикирикија релевантне за њихову отпорност на деловање протеолитичких ензима и имунореактивност, факторима који битно утичу на покретање и развој алергијске реакције.

Такође, планирана истраживања би требало да покажу у којој мери је α -Gal епитоп битан за алергијски одговор на црвено месо и на који начин крпељи могу допринети развоју овог типа алергије. У оквиру ових истраживања посебна пажња ће бити посвећена говеђем тироглобулину, гликопротеину који се често користи у дијагностици алергије на црвено месо и који дуж аминокиселинске секвенце садржи 13 места *N*-гликозилације. Пептиди настали у условима *in vitro* симулиране гастричне дигестије говеђег тироглобулина, ће бити анализирани LC-MS и помоћу PEAKS алгорита ће бити проверено присуство α -Gal. Подаци о подложности / отпорности гликопротеина пепсинској дигестији и присуству / одсуству α -Gal епитопа би могли дати бољи увид у механизам алергијске реакције одложеног типа. На који начин крпељи могу допринети развоју алергије на црвено месо биће проверено анализом протеинског екстракта европских крпеља *Ixodes ricinus*. Протеински екстракт крпеља, након анализе електрофоретског профила и дигестије протеинских трака у гелу, биће анализиран помоћу LC-MS. Претрагом протеинских база података помоћу PEAKS алгоритама ће бити идентификовани садржани протеини, проверено присуство α -Gal шећера на њима и порекло протеина носиоца. На овај начин ће бити показано да ли су за алергијску реакцију на црвено месо одговорни α -Gal носећи протеини пореклом из сисара којим се крпељ хранио или пак потичу од самог крпеља.

Реализација планираних анализа протеина *CtB* даће бољи увид у структурне карактеристике хламидијалних антигена, али и у њихову локализацију и

имунореактивност. Стога би ова истраживања могла значајно допринети дизајнирању ефикасне вакцине против окуларних хламидијалних инфекција, првенствено са аспекта селекције потенцијалних вакциналних антигена. Претпостављамо да бактеријски патоген попут Ct користи посттранслационе модификације протеина као сигнални / адаптациони механизам. У циљу расветљавања механизма који чине Ct успешним патогеном биће окарактерисане посттранслационе модификације главних антигена. Протеом *C. trachomatis* (комерцијално доступан сој HAR-36, ATCC® VR-573™), пропагиране и изоловане из McCoу ћелијске културе (комерцијално доступна ћелијска линија ATCC® CRL-1696™) ће након анализе електрофоретског профила, и дигестије протеинских трака у гелу бити анализиран методом LC-MS. Спектри пептида добијени на тај начин ће бити упоређени са протеинским базама података помоћу PEAKS и Max Quant алгоритама, ради идентификације што већег броја протеина хламидије и претраге хемијских и посттранслационих модификација. Идентификовани протеини хламидије, а посебно већ описани антигени ће бити квантификовани методама без обележавања (engl. *Label free quantification – LFQ* и *intensity based absolute quantification - iBAQ*) уз помоћ PEAKS Q Max Quant алгоритама. Хомологија Ct и хуманих протеина који су познати као еволутивно конзервирани ће бити проверена коришћењем алгоритама BLAST и ALIGN ради искључења протеина који би, услед високог степена структурне хомологије са протеинима човека, могли да доведу до успостављања неадекватног имунског одговора након имунизације.

Литература

1. Kagan, R.S., *Food allergy: an overview*. Environmental Health Perspectives, 2003. **111**(2): p. 223-225.
2. Loza, C. and J. Brostoff, *Peanut allergy*. Clinical & Experimental Allergy, 1995. **25**(6): p. 493-502.
3. Mueller, G.A., S.J. Maleki, and L.C. Pedersen, *The Molecular Basis of Peanut Allergy*. Current Allergy and Asthma Reports, 2014. **14**(5): p. 429.

4. Commins, S.P. and T.A.E. Platts-Mills, *Delayed Anaphylaxis to Red Meat in Patients with IgE Specific for Galactose alpha-1,3-Galactose (alpha-gal)*. Current allergy and asthma reports, 2013. **13**(1): p. 72-77.
5. Kuehn, B.M., *Tick bite linked to red meat allergy*. JAMA, 2018. **319**(4): p. 332-332.
6. Hu, V.H., et al., *Epidemiology and control of trachoma: systematic review*. Trop Med Int Health, 2010. **15**(6): p. 673-91.
7. Hu, V.H., M.J. Holland, and M.J. Burton, *Trachoma: protective and pathogenic ocular immune responses to Chlamydia trachomatis*. PLoS Negl Trop Dis, 2013. **7**(2): p. e2020.
8. Resnikoff, S., et al., *Global data on visual impairment in the year 2002*. Bull World Health Organ, 2004. **82**(11): p. 844-51.
9. Nunes, A., et al., *Bioinformatic Analysis of Chlamydia trachomatis Polymorphic Membrane Proteins PmpE, PmpF, PmpG and PmpH as Potential Vaccine Antigens*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0131695.
10. Mihailovic, J., et al., *Lysine acetylation of major Chlamydia trachomatis antigens*. EuPA Open Proteomics, 2016. **10**: p. 63-69.

Г. Закључак комисије

На основу свега изнетог, Комисија је мишљења да је предложена тема докторске тезе под насловом:

„ Протеомика и интерактомика антигена бактеријског, биљног и животињског порекла од интереса у алергијама на храну и окуларним инфекцијама ”

научно заснована и да кандидат Јелена Д. Михаиловић, мастер-биохемичар, испуњава све услове за почетак израде докторске тезе за стицање академског звања ДОКТОР БИОХЕМИЈСКИХ НАУКА.

Препоручујемо Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Хемијског факултета да одобри кандидату израду докторске тезе под наведеним насловом. За ментора предлажемо др Тању Ћирковић Величковић, редовног професора Хемијског факултета.

Чланови комисије:

Проф. др Тања Ћирковић Величковић
Редовни професор Универзитета у Београду - Хемијског факултета
Дописни члан Српске академије наука и уметности

Проф. др Владимир Бешкоски
Ванредни професор Универзитета у Београду - Хемијског факултета

др Катарина Смиљанић
Научни сарадник, Универзитет у Београду - Хемијски факултет

др Маријана Стојановић
Виши научни сарадник, Институт за вирусологију, вакцине и серуме „Торлак“

др Весна Јовановић,
Научни сарадник, Универзитет у Београду - Хемијски факултет

Већу научних области природних наука
Универзитета у Београду

МОЛБА

Одлуком Већа научних области природних наука, Универзитета у Београду 02-07 број 61206-1972/2-16 МЦ од 28.04.2016 је дата сагласност на предлог теме докторске дисертације **Јелене Д. Михаиловић, мастер биохемичара** под називом:

„ Карактеризација протеома окуларног соја *Chlamydia trachomatis* “

на енглеском језику: “ **Proteome characterization of an ocular *Chlamydia trachomatis* strain “**

Молимо Веће научних области природних наука за поништење наведене теме докторске дисертације како би се боље осликао вишегодишњи рад и омогућио приказ додатних резултата који докторску тезу и продубљују и тематски проширују.

Ову молбу прилажемо као додатак извештају комисије за оцену испуњености услова и научне заснованости новопредложене теме за израду докторске дисертације под насловом:

„Протеомика и интерактомика антигена бактеријског, биљног и животињског порекла од интереса у алергијама на храну и окуларним инфекцијама”

У Београду,

Јелена Михаиловић, докторанд
Истраживач сарадник

Проф. др Тања Ћирковић Величковић, ментор
Редовни професор Универзитета у Београду - Хемијског факултета
Дописни члан Српске академије наука и уметности