

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**

**ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА**

**УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

**ПРЕДМЕТ:** Извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације Татјане Ђурашиновић, мастер биохемичара

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду одржаној 13.06.2024. године, одређени смо за чланове Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидаткиње Татјане Ђурашиновић, мастер биохемичара, под насловом:

**„ Испитивање алергености природне и рекомбинантно произведене S-аденозил-L-хомоцистеин хидролазе из банане (*Musa acuminata* Colla)“**

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је на седници одржаној 27. октобра 2022. године на захтев Хемијског факултета (евиденциони број: 145/5 од 09.03.2023. године) дало сагласност на предлог теме докторске дисертације (евиденциони број: 61206-3174/4-22).

Комисија је докторску дисертацију прегледала и Наставно-научном већу подноси следећи

## **ИЗВЕШТАЈ**

### **А. Приказ садржаја дисертације**

Докторска дисертација Татјане Ђурашиновић написана је на 100 страна, А4 формата, фонт 12, проред 1, и садржи 42 слике и 20 табела. Докторска дисертација је подељена на 8 поглавља: Увод (1 страна), Општи део (17 страна), Циљ рада (1 страна), Резултати (30 страна), Дискусија (4 стране), Закључак (1 страна), Материјал и методе (26 страна), Литература (20 страна, 230 цитата). Поред наведеног, дисертација садржи и насловне стране на српском и енглеском језику, једну страну са именима ментора и чланова комисије, Захвалницу (1 страна), Сажетак на српском и енглеском језику (по 1 страна), Листу скраћеница (2 стране), Садржај (3 стране), Биографију кандидата (1 стране), Изјаву о

ауторству (1 страна), Изјаву о истоветности (1 страна), Изјаву о коришћењу (2 стране) и Етичке дозволе (3 стране).

**Увод** садржи осврт на пораст обољевања од нутритивних алергија са посебним акцентом на алергију на банане. Описан је проблем коришћења алергених екстраката за дијагностику алергија на храну и значај употребе појединачних пречишћених или рекомбинантно добијених алергена у дијагностици алергија раздвојеној на компоненте (Component Resolved Diagnostics -CRD).

**Теоријски део** је подељен на 3 целине. Целина **Алергије** даје преглед механизма настанка алергијских реакција. Највећа пажња је посвећена нутритивним алергенима, Б и Т ћелијским епитопима алергена и настанком укрштене реактивности алергених протеина. Друга целина, **Банана (*Musa acuminata*)**, описује банану као извор алергена са посебним освртом на S-аденозил-L-хомоцистеин хидролазу. Описан је механизам дејства овог ензима уз посебно истицање његове алергености и улоге у развоју укрштене реактивности. Објашњен је концепт паналергена. У трећој целини, **Дијагностика алергије на храну и значај унапређења дијагностичких реагенаса за алергије** описан је значај молекулске алергологије у дијагностици алергија. Приказана је предност дијагностике са појединачним алергенима (CRD) у односу на коришћење протеинских екстраката. Описане су могућности и предности коришћења алергена добијених рекомбинантном ДНК технологијом у дијагностици и лечењу алергија.

У поглављу **Циљ рада** наведени су основни циљеви ове докторске дисертације. Такође, дат је и приказ постављених задатака како би се омогућило остваривање главних циљева.

У поглављу **Резултати** приказани су резултати остварени током израде ове докторске дисертације. Ово поглавље је организовано у седамнаест целина. Прве две целине се односе на добијање S-аденозил-L-хомоцистеин хидролазе из банане (nSAHH). Описано је добијање протеинског екстракта банане и изоловање и пречишћавање ензима употребом катјонске и анјонске јоноизмењивачке хроматографије. У трећој целини приказана је масена спектроскопија SAHH изоловане из банане. У четвртој целини анализирана је заступљеност SAHH у бананама различитог стадијума зрелости мерењем хидролитичке активности ензима. У петој, шестој и седмој целини описана је стратегија клонирања pET-23b-SAHH плаزمида у циљу добијања рекомбинантне SAHH (rSAHH) и експресија добијеног плаزمида у *E.coli*. У осмој целини описана је оптимизација експресије rSAHH кроз селекцију експресионог система, и изналажењем оптималне температуре, концентрације IPTG и дужине трајања експресије. У деветој целини приказано је изоловање rSAHH метал-афинитетном хроматографијом. У десетој, једанаестој и дванаестој целини приказана је карактеризација rSAHH, у оквиру које су одређивани молекулска маса, pI, температурни и рН оптимум, ензимска активност и кинетички параметри, након чега је урађена масена спектрометрија и карактеризација циркуларним дихроизмом (ЦД). У тринаестој целини приказано је испитивање IgE реактивности rSAHH и nSAHH у имуноблоту и дот блоту са серумима пацијената алергичних на банану. У

четрнаестој и петнаестој целини описане су молекулске основе укрштене реактивности и профилисање Б и Т ћелијских епитопа поређењем секвенци и *in silico* предвиђање В-ћелијских епитопа у 3D структури SAHH банане (*Musa acuminata*), љуља (*Lolium perenne*), латекса (*Hevea brasiliensis*) и кивија (*Actinidia chinensis*). Упоредном анализом аминокиселинских секвенци помоћу БЛАСТ програма утврђена је хомологија секвенци >92%. У шеснаестој и седамнаестој целини описано је испитивање активности SAHH у протеинским екстрактима банане, љуља, латекса и кивија мерењем ензимске активности помоћу Елмановог реагенса, и детекција SAHH специфичног IgE код особа алергичних на љуљ, латекс и киви.

Поглавље **Дискусија** критички разматра резултате проистекле из ове дисертације и позиционира их у контексту постојећих литературних података. Упоредном анализом доступних експерименталних и литературних података потврђене су иницијалне хипотезе и претпостављена су објашњења описаних феномена.

**Закључак** даје кратак преглед резултата ове докторске студије и одговора на питања формулисана у оквиру циљева ове дисертације.

**Материјал и методе** садрже детаљан опис опреме, реагенаса, узорака као и експерименталних метода и процедура коришћених у овој докторској дисертацији.

## **Б. Кратак приказ резултата**

У овој докторској дисертацији изолован је и пречишћен SAHH из банане комбиновањем две јоноизмењивачке хроматографије. Прво је рађена катјонска јоноизмењивачка хроматографија на HiTrap SP FF, а затим анјонска јоноизмењивачка хроматографија на HiTrap QFF колони. SDS-PAGE након пречишћавања nSAHH је показала присуство додатних трака на 55 kDa и 60 kDa поред траке на 53 kDa која потиче од nSAHH. Након тога је рађена масена спектроскопија која је потврдила да трака од 60 kDa одговара D-глукозидази, док трака од 55 kDa потиче од UTP-глукозо-1-фосфат уридилтрансферазе и серин протеазе. Како ова два протеина имају сличне молекулске масе (55.72 kDa и 51.34 kDa) и *pI* вредности (6.50 и 5.57) као и nSAHH (53.06 kDa *pI* 5.95), описаним протоколима није било могуће потпуно пречистити и издвојити nSAHH. Додатно пречишћавање је онемогућено ниским приносом nSAHH који је износио 7 µg по g пулпе банане, па је даље истраживање усмерено на рад са рекомбинантно добијеном SAHH.

Стратегија која је примењена за добијање рекомбинантне SAHH заснована је на клонирању гена за SAHH у pET-23b вектор где се рекомбинантном протеину додаје 6His tag на С терминалном крају. Прво су гени за SAHH (pUC57-SAHH ) и pET-23b вектор умножени у *E.coli* DH5α ћелијама, изоловани су плазмиди па је рађена лигација SAHH гена у pET-23b вектор у моларном односу 3 : 1 (SAHH ген : pET-23b-вектор). *E.coli* DH5α ћелије су трансформисане лигационом смешом, а израсле колоније су умножене помоћу colony PCR. Провера успешности лигације SAHH гена у pET-23b вектор извршена је агарозном електрофорезом након дупле дигестије плаزمида изолованих из ћелија трансформисаних

pET-23b-SAHN вектором. Како би се добио што већи принос rSAHN, оптимизовани су услови производње селекцијом експресионог система и оптимизацијом услова експресије. За одабир најпогоднијег експресионог система тестирана су три различита соја *E.coli*: BL21(DE3), RosettaTM(DE3) и SHuffle®T7. Праћењем зависности експресије rSAHN у одабраним експресионим системима помоћу SDS-PAGE и мерењем активности SAHN у аликвотима узетим пре индукције као и у одеђеним временским интервалима (3, 5, 7, 20, 24 и 28 h) након индукције, показало се да су *E.coli* BL21(DE3) ћелије имале највећи принос rSAHN и да је хидролитичка активност rSAHN добијене из ових ћелија значајно виша у односу на активност rSAHN добијену из RosettaTM(DE3) и SHuffle®T7 соја. На основу ових резултата *E.coli* BL21(DE3) ћелије су изабране за даљи рад.

Модификацијом температуре, концентрације IPTG и времена експресије оптимизовани су услови под којима је рађена експресија rSAHN. Највећи принос rSAHN је добијен када је култура гајена 20 сати на 20°C а индукција извршена помоћу 0.5 M IPTG. Пречишћавање rSAHN је изведено метал-афинитетном хроматографијом на Hi TrapIMAC колони у једном кораку. У циљу карактеризације rSAHN одређени су молекулска маса помоћу SDS PAGE, 2D PAGE и гел филтрације (55 kDa), pI вредност (5.83), pH и температурни оптимум (5.5 и 37°C), ензимска активност и кинетички параметри (Km 1.81  $\mu$ M, v<sub>max</sub> 3.14  $\mu$ mol min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> и K<sub>cat</sub> 1.11 s<sup>-1</sup>). Снимањем ЦД спектра потврђено је да rSAHN има углавном структуру  $\alpha$ -хеликса.

IgE реактивност rSAHN и nSAHN испитивана је имуноблот и дот блот техником са пулом серума као и са појединачним серумима пацијената алергичних на банану обезбеђених од стране Универзитетске клинике у Либеку, Немачка. У анализи са појединачним серумима показано је да десет од дванаест пацијената (83.3%) имају IgE реактивност на rSAHN. Увидом у податке о пацијентима примећено је да је код већине пацијената поред алергије на банану пријављена алергија и на друге наимрнице као и на инхалаторне алергене. Увидом у литературне податке где је SAHN пријављен као алерген (кромпир, полен платана) и наше податке о пацијентима, претпостављено је да SAHN може бити узрочник укрштене реактивности. Поређењем секвенци SAHN из банане, кромпира (*Solanum tuberosum*), платана (*Platanus acerifolia*) и жуте лупине (*Lupinus luteus*) нађен је висок степен хомологије (>90%). Коришћењем ВЕРИТОР и ВеріPred 2.0 програма урађено је *in silico* предвиђање и мапирање Б ћелијских епитопа у 3D структури SAHN. Пронађено је пет Б ћелијских епитопа изложених на површини SAHN код све четири анализираних секвенце.

Након потврђене високе хомологије секвенци SAHN из банане, кромпира, платана и жуте лупине, претражена је NCBI база података и преузете су секвенце SAHN за киви (*Actinidia chinensis*), љуљ (*Lolium perenne*) и латекс (*Hevea brasiliensis*). Сви одабрани протеини су имали 485 ак и сличне молекулске масе. Провером хомологије утврђено је преко 92% поклапања у аминокиселинској секвенци. Помоћу Veritope и VeriPred2.0 сервера

потврђено је да су Б-ћелијски епитопи за панел анализираних протеина идентични као и у претходној анализи извршеној за SAHH из кромпира, платана и жуте лупине.

Даљом *in silico* анализом помоћу NetMHCIIpan 4.0 програма, мапирани су Т-ћелијски епитопи SAHH за банану, киви, љуљ и латекс. Утврђено је да банана SAHH садржи једанаест Т-ћелијских епитопа са дужином пептида од петнаест аминокиселина за референтни сет MHCII молекула. Иста анализа је показала присуство 17 Т-ћелијских епитопа код SAHH из кивија, 12 Т-ћелијских епитопа код SAHH из љуља и 8 Т-ћелијских епитопа код SAHH из латекса. Пронађена су четири Т-ћелијска епитопа идентична код SAHH из банане и кивија, четири код SAHH из банане и љуља и два заједничка епитопа код SAHH из банане и латекса.

У протеинским екстрактима кивија, љуља и латекса је потврђено присуство SAHH мерењем ензимске активности. С обзиром на високу хомологију секвенци и присуство идентичних Б-ћелијских епитопа, поставило се питање да ли рекомбинантна SAHH из банане може да веже IgE из серума особа алергичних на љуљ, латекс и киви. У имуноблоту је IgE реактивност на банана SAHH детектована код 3 од 3 особе алергичне на латекс, 5 од 6 особа алергичних на љуљ и 2 од 3 особе алергичне на киви.

Добијени резултати су показали да SAHH има високо конзервирану структуру и између удаљених врста, а пронађени заједнички Б-ћелијски епитопи код свих испитиваних SAHH секвенци указују да се SAHH може сматрати паналергеном одговорним за укрштenu реактивност.

## **В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе**

Алергије су једно од најчешћих хроничних обољења у свету. Између 200 и 250 милиона људи пати од алергија на храну (1). Банана је намирница благог укуса и квалитетног нутритивног састава која се рано уводи у исхрану беба (2). Иако има низак алергени потенцијал, препозната је као извор нутритивних алергена која може изазвати озбиљну алергијску реакцију као што је анафилакса (3). Детекција и карактеризација алергених протеина је значајна за унапређење дијагностичких реагенаса као и за развој алерген-специфичне имунотерапије (4). 2D мапирањем IgE реактивних протеина банане и њиховом анализом прво помоћу MALDI TOF а затим помоћу MASCOT програма поред шест већ регистрованих алергена банане препознати су додатни IgE реактивни протеини за које нема литературних података као о алергенима из банане (5). Један од протеина детектован техником масеног отиска прста је SAHH. Овај ензим је у литератури описан као инхалаторни алерген из полена платана (Pl1 5) (6), што је додатно оправдало идеју да се SAHH из банане изолује, окарактерише и испита његова IgE реактивност. Коришћење протеинских екстраката за дијагностику алергија је непоуздано због немогућности стандардизовања састава и концентрације појединих протеина. Екстракти биљних алергена су подложни варијацијама пошто је експресија протеина регулисана биотичким

и абиотичким факторима, степеном зрелости, начином транспорта и условима складиштења (7). Изоловање и пречишћавање протеина из природних производа носи низ изазова као што су сложен матрикс из кога се комбинацијом техника за изоловање и пречишћавање током 3-4 недеље добија мали принос жељеног протеина (7 µg по граму очишћене банане) уз присуство нечистоћа, тј. у нашем случају присуство протеина D-глукозидазе и UTP-глукозо-1-фосфат уридилтрансферазе и серин протеазе који због блиских молекулских маса и pI вредности нису могли бити уклоњени. Проблеми повезани са производњом, репродуктивношћу и стандардизацијом природних алергена за примену у дијагнози и терапији алергија могу се превазићи коришћењем рекомбинантно добијених алергена (5) чији је поступак производње и пречишћавања знатно краћи, једноставније и са знатно већим приносом (10 mg протеина из 1L ћелијске културе). Карактеризацијом и имунолошком анализом рекомбинантно добијеног SAHH показано је да поседује IgE реактивност а поређењем аминокиселинских секвенци са SAHH из других алергених извора (латекс, полен платана и љуљ) показано је да SAHH има високо конзервирану структуру као и да постоје Б-ћелијски епитопи присутни у свим анализираним секвенцама. Додатним имунолошким анализама је показана IgE реактивност серума пацијената алергичних на латекс, полен платана и љуљ са рекомбинантно добијеном SAHH што је потврдило хипотезу SAHH као алергена и узрочника укрштене реактивности. SAHH испуњава критеријуме паналергена који обухватају протеине који су укључени у основне биолошке процесе, широко су распрострањени и имају конзервиране секвенце и структуре (8). Ови протеини доприносе настанку бројних укрштених реакција, чак и код филогенетски удаљених и несродних организама (8). Њихова идентификација је важна за унапређење дијагностике раздвојене на компоненте (CRD). Битно је нагласити важност заједничких Б- и Т-ћелијских епитопа (9). Идентификацијом уобичајених Т-ћелијских епитопа код паналергена, CRD може пружити увид у обрасце унакрсне реактивности и побољшати прецизност дијагностике алергија (10). Преовлађујући узрок и механизам Т-ћелијске унакрсне реактивности често произилази из сличности секвенци Т-ћелијских епитопа који учествују у укрштеној реактивности пронађених код блиско повезаних алергених извора (11). Присуство унакрсно реактивних епитопа у препаратима алергена који се користе за имунотерапију алергија је кључно за безбедност и ефикасност лечења као и за постизање десензитизације и клиничке толеранције што је циљ терапије (12). Скорашње студије су показале да су особе које су подвргнуте сублингвалној имунотерапији на траве показале значајну толеранцију према биљној храни (13). Контрола над унакрсно реактивним епитопима у имунотерапији алергије на храну може помоћи у десензибилизацији на више намирница коришћењем добро окарактерисаних Т-ћелијских епитопа (12). Тренутни напредак у имуноинформатичким алатима нуди потенцијална решења помажући у идентификацији специфичних заједничких унакрсних пептидних секвенци које покривају низ различитих извора алергена, чиме се решава изазов дизајнирања једног кандидата заснованог на пептидној или протеинској секвенци (12).

*In silico* анализом идентификовали смо Т-ћелијске епитопе из банане, кивија и љуља који се приказују у оквиру молекула МНС класе II. Утврђено је присуство четири идентична Т-ћелијска епитопа банане са Т-ћелијским епитопима кивија (328, 278, 142 и 341) и љуља (278, 142, 96 и 341) и два идентична Т-ћелијска епитопа са латексом (278 и 341). Ови резултати указују да пептиди 278 и 341 сами или у комбинацији са пептидима 328, 96 и 142 могу бити потенцијални кандидати за алерген-специфичну имунотерапију (AIT) који пружају могућност превазилажења или ублажавања алергија на поменуте унакрсно реактивне алергене. Примећена унакрсна реактивност SAHH из банане са серумима пацијената алергичних на киви, љуљ и латекс наглашава важност истраживања заједничких епитопа и алергених компоненти између различитих алергених извора, као и на потребу за свеобухватним дијагностичким приступима и терапеутским стратегијама у управљању алергијама

Б-ћелијски епитопи се интензивно истражују за развој терапеутских вакцина за AIT јер коришћење интактних нутритивних алергена у превентиви или у терапеутске сврхе носи ризик од анафилаксе. Овакав приступ је тренутно одобрен само у третману инхалаторних алергена (14). Примена укрштене реактивности Б-ћелијских епитопа представља потенцијално нов приступ терапије алергија. Обећавајући резултати су недавно приказани за третман алергије на млеко коришћењем протеина изолованог из соје (15).

Ова сазнања могу имати вишеструку примену у дијагностици и лечењу алергија на храну, безбедности намирница а отвара се и могућност даљих истраживања на пољу молекуларне алергологије.

#### Литература:

1. Pawankar R. It's time for an evolution. *Asia Pac Allergy* 2021;11(1): p e11.
2. Kocacik UDF, Filiz S, Bingöl A. An evaluation of banana allergy in children living in the Mediterranean region. *Turk J Med Sci.* 2018;48(3):469–75.
3. Jacob JK, Tiwari K, Correa-Betanzo J, Misran A, Chandrasekaran R, Paliyath G. Biochemical basis for functional ingredient design from fruits. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2012;3(1):79–104.
4. Schramm G, Kahlert H, Suck R, Weber B, Stuwe HT, Muller WD, et al. Allergen engineering: variants of the timothy grass pollen allergen Phl p 5b with reduced IgE-binding capacity but conserved T cell reactivity. *J Immunol.* 1999;162(4):2406–14.
5. 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.

6. Miralles J. C., Caravaca F., Guillen F., Lombardero M., Negro J. M. Cross-reactivity between Platanuspollen and vegetables. *Allergy* 2. 2008 Sep 23;57(2):146–9.
7. Gavrovic-Jankulovic M, Polovic N, Prusic S, Jankov RM, Atanaskovic-Markovic M, Vuckovic O, et al. Allergenic potency of kiwi fruit during fruit development. *Food Agric Immunol*. 2005;16(2):117–28.
8. McKenna OE, Asam C, Araujo GR, Roulias A, Goulart LR, Ferreira F. How relevant is panallergen sensitization in the development of allergies? Vol. 27, *Pediatric Allergy and Immunology*. Blackwell Publishing Ltd; 2016. p. 560–8.
9. Furci F, Ricciardi L. Plant food allergy improvement after grass pollen sublingual immunotherapy: A case series. *Pathogens*. 2021 Nov 1;10(11).
10. Borres MP, Maruyama N, Sato S, Ebisawa M. Recent advances in component resolved diagnosis in food allergy. Vol. 65, *Allergology International*. Japanese Society of Allergology; 2016. p. 378–87.
11. Sewell AK. Why must T cells be cross-reactive? Vol. 12, *Nature Reviews Immunology*. 2012. p. 669–77.
12. Kamath SD, Bublin M, Kitamura K, Matsui T, Ito K, Lopata AL. Cross-reactive epitopes and their role in food allergy. Vol. 151, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Elsevier Inc.; 2023. p. 1178–90.
13. Matsuo H, Yokooji T, Taogoshi T. Common food allergens and their IgE-binding epitopes. Vol. 64, *Allergology International*. Japanese Society of Allergology; 2015. p. 332–43.
14. Valenta R, Campana R, Niederberger V. Recombinant allergy vaccines based on allergen-derived B cell epitopes. *Immunol Lett*. 2017 Sep 1;189:19–26.
15. Candreva ÁM, Smaldini PL, Cauherff A, Petruccelli S, Docena GH. A novel approach to ameliorate experimental milk allergy based on the oral administration of a short soy cross-reactive peptide. *Food Chem*. 2021 Jun 1;346:128926.

#### **Г. Објављени радови и саопштења који чине део докторске дисертације**

Из резултата ове докторске дисертације проистекла су три научна рада од којих је један публикован у врхунском међународном часопису изузетних вредности (категирија M21a), други у врхунском међународном часопису (категирија M21) а трећи у међународном часопису (категирија M23).

#### **1) Радови**



### **Међународни часопис изузетних вредности (M21a)**

Ђурашиновић Т, Лопандић З, Протић-Росић И, Нешић А, Трбојевић-Ивић Ј, Јапе У, Гавровић-Јанкуловић М. Identification of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from banana fruit as a novel plant panallergen. Food Chemistry, 2024, 437. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137782> (IF 8,8 (2022), Chemistry, Applied (5/73), Food Science & Technology (9/142), Nutrition & Dietetics (5/89) ISSN 0308-8146).

### **Врхунски међународни часописи (M21):**

Ђурашиновић Т, Лопандић З, Протић-Росић И, Равнсборг Т, Благојевић Г, Буразер Л, Јенсен О Н, Гавровић-Јанкуловић М. Utilising the Banana S-Adenosyl-L-Homocysteine Hydrolase Allergen to Identify Cross-Reactive IgE in Ryegrass-, Latex-, and Kiwifruit- Allergic Individuals. Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 5800. <https://doi.org/10.3390/ijms25115800> (IF 6.2 (2022), Biochemistry & Molecular Biology (61/285), Chemistry, Multidisciplinary (46/178), ISSN 1661-6596).

### **Међународни часопис (M23):**

Ђурашиновић Т, Базовић В, Нешић А, Рамдан А, Махфуд А, Трбојевић-Ивић Ј, Гавровић-Јанкуловић М. Expression, purification and partial characterization of recombinant S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from banana. Appl biochem and microbiology, 2024. <https://doi.org/10.1134/S000368382460489X> (IF 0.8 (2022), Biotechnology & Applied Microbiology (155/159), Microbiology (130/135) ISSN 0003-6838).

## **Д. Провера оригиналности докторске дисертације**

Оригиналност докторске дисертације Татјане Ђурашиновић је проверена употребом програма iThenticate на начин прописан Правилником о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета у Београду, бр. 204/22.06.2018.). Утврђено је да је степен подударности од 17% настао као последица цитата, личних имена, библиографских података коришћених у литератури, тзв. општих места и података у вези са темом ове дисертације, као и претходно публикованих резултата истраживања проистеклих из дисертације, што је прихватљиво у складу са чланом 9. овог Правилника. Стога сматрамо да је докторска дисертација Татјане Ђурашиновић у потпуности оригинална, као и да су у потпуности поштована академска правила цитирања.

## **Ђ. Закључак**

На основу приказаних података и резултата, Комисија је закључила да је у поднетој дисертацији под насловом „Испитивање алергености природне и рекомбинантно произведене S-аденозил-L-хомоцистеин хидролазе из банане (*Musa acuminata Colla*)“ кандидат Татјана Ђурашиновић успешно одговорила на задате циљеве у оквиру којих је изоловала и пречистила природни SAHH из банане, оптимизовала услове за добијање рекомбинантног SAHH у ћелијама *E. coli*, и произвела и пречистила рекомбинантни SAHH. Банана SAHH приказан у овој докторској дисертацији је једини рекомбинантно добијени биљни SAHH до сада. Савременим инструменталним и биохемијским методама је окарактерисала овај ензим: потврдила аминокиселинску секвенцу, одредила је молекулску масу, *pI*, *pH* и температурни оптимум, ензимску активност, кинетичке параметре и снимила је CD спектар. Након тога је испитивала алергеност природне и рекомбинантно добијене SAHH са серумима пацијената алергичних на банану. Кандидат је испитивао и укрштenu реактивност SAHH из банане са серумима пацијената алергичних на љуљ, латекс и киви. *In silico* анализом утврдила је висок степен хомологије између секвенце SAHH из банане и SAHH пореклом из кромпира, платана, жуте лупине, кивија, љуља и латекса као и 5 заједничких Б-ћелијских епитопа код свих анализираних секвенци. Даљом *in silico* анализом идентификовала је Т-ћелијске епитопе из банане, кивија и љуља који се приказују у оквиру молекула МНС класе II. Потврђена су по четири идентична Т-ћелијска епитопа између банане и кивија и банане и љуља и два између банане и латекса, од којих су два идентична Т-ћелијска епитопа потврђена у све четири анализиране секвенце.

Резултати научно – истраживачког рада кандидата постигнути у оквиру ове докторске дисертације су објављени у три научна рада категорија M21a, M21 и M23. На основу изложеног Комисија предлаже Наставно – научном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду, да поднету докторску дисертацију Татјане Ђурашиновић под насловом „Испитивање алергености природне и рекомбинантно произведене S-аденозил-L-хомоцистеин хидролазе из банане (*Musa acuminata Colla*)“ прихвати и одобри њену одбрану за стицање академског звања доктора биохемијских наука.

У

Београду,

19.07.2024.

**Комисија:**

---

Др Зоран Вујчић,  
редовни професор,  
Хемијски факултет,  
Универзитет у Београду

---

Др Лидија Буразер,  
виши научни сарадник,  
Институт за вирусологију, вакцине и серуме „Торлак

---

Др Радивоје Продановић,  
редовни професор,  
Хемијски факултет,  
Универзитет у Београду