

Наставно научно већу

Хемијског факултета

Универзитета у Београду

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду одржаној 09.02.2017. године одређени смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације мастер биохемичара Марије Блажић под насловом:

„Протеински инжењеринг и развој високо ефикасних метода за претраживање библиотеке гена целобиоза-дехидрогеназе из *Phanerochaete chrysosporium* у циљу повећања ензимске активности”

Поднету дисертацију смо прегледали и подносимо Научно-наставном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Марије Блажић написана је на 165 страна, А4 формата и садржи 40 слика и 7 табела. Рад оухвата Увод (3 стране), Теоријски део (36 страна), Циљеви (1 страна), Материјал и методе (38 страна), Резултати и дискусија (45 страна), Закључци (2 стране), Литература (11 страна, 192 цитата) и Прилози (10 страна). Поред наведеног, дисертација садржи извод на српском и енглеском језику (по 3 стране), Садржај (5 страна), Листу скраћеница (2 стране), Захвалницу (1 страна) и Биографију кандидата (1 страна).

У **Уводу** је описан предмет истраживања ове докторске дисертације као и њени циљеви. Истакнут је значај ензима у биокатализи, са посебним освртом на целобиоза-дехидрогеназу, њену улогу у природи, и методе којима се могу унапредити карактеристике ензима. Описане су примене целобиоза-дехидрогеназе у биокатализи као и значај високо ефикасних метода претраживања биокатализатора за проналажење варијанти целобиоза-дехидрогеназа са већом ензимском активношћу.

Теоријски део обухвата четири целине. У првој целини је описана целулоза и њена структура. Друга целина даје општи приказ разградње дрвета од стране гљива, врсте гљива које постоје и њихов значај. Трећа целина детаљно описује физичке и хемијске особине целобиоза-дехидрогеназе (ЦДХ), њену структуру, каталитички механизам, биолошку улогу и примену. Четврта целина даје општи преглед протеинског инжењеринга и дириговане еволуције са методама за конструисање библиотеке гена и методама за претраживање библиотека.

Материјал и методе садрже детаљан опис експерименталних метода и процедура, реагенаса и узорака који су коришћени у овој дисертацији.

У делу **Резултати и дискусија** кандидаткиња је приказала и детаљно продискутовала добијене резултате који су подељени у три целине. Прво су приказани резултати клонирања и експресије целобиоза-дехидрогеназе у квасцу *Saccharomyces cerevisiae* InvSc1. Затим су описани резултати стварања библиотеке гена целобиоза-дехидрогеназе, њене претраге, проналаска побољшаних варијанти ензима и њихове карактеризације. У другој целини је испитивана експресија ензима у квасцу *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 у виду химере са Aga2 протеином експортиране на површину ћелија за потребе протеинског инжињеринга. У оквиру ове целине је прво тестирана употребљивост експресије у виду химере на познатом моделу глукоза оксидазе. Такође је приказан и развој флуоресцентног високо ефикасног метода за претраживање библиотека гена целобиоза-дехидрогеназе у циљу проналажења варијанти са већом ензимском активношћу. Детаљно је описана оптимизација добијеног метода на систему растворног ензима и ензима приказаног на површини ћелија квасца. На крају су приказани резултати претраге библиотеке гена целобиоза дехидрогеназе приказане на површини ћелија квасца и основна карактеризација добијених мутаната. У трећој целини су описани резултати клонирања и експресије добијених мутаната у квасцу *Pichia pastoris*, њихово пречишћавање и детаљна кинетичка карактеризација.

У **Закључку** је кандидаткиња објединила добијене резултате у току израде докторске дисертације.

У делу **Литература** су наведени релевантни радови из области истраживања којим се бавила ова теза.

У **Прилозима** су дате нуклеотидне секвенце прајмера коришћених у протоколу клонирања, вишеструко поравнање секвенци 28 целобиоза-дехидрогеназа и резултати предвиђања N и O гликозилационих места.

Б. Кратак приказ резултата

У овој докторској дисертацији испитивана је могућност експресије целобиоза-дехидрогеназе из *Phanerochaete chrysosporium* у квасцу *Saccharomyces cerevisiae*. Прво је коришћен сој InvSc1 за експресију ЦДХ у виду растворног екстрацелуларног протеина. Направљена је одговарајућа библиотека гена и претрагом у микротитар плочицама добијена су три мутанта ЦДХ са повећаном ензимском активношћу. S137N мутант је показао два пута већу активност за лактозу и целобиозу од дивљег типа ензима произведеног у истом соју. M65S мутант је показао 1,6 пута већу активност од дивљег типа за лактозу, док је M685V показао 1,14 пута већу активност за целобиозу од дивљег типа. Овим је показано да се експресиони систем у квасцу *Saccharomyces cerevisiae* InvSc1 може користити за дириговану еволуцију ЦДХ и том приликом је добијено неколико мутаната са повећаном активношћу.

Систем за експресију протеина у виду химере са Aga2 протеином приказане на површини ћелија квасца је прво тестиран за употребу у диригованој еволуцији на познатом моделу са глукоза-оксидазом. Резултати су показали да мутанти са већом активношћу у нативном облику, такође показују већу активност и у конструкту са Aga2 што показује да се добијени конструкти могу користити за дириговану еволуцију ензима и развој високо ефикасних метода претраживања пошто је њихова активност пропорционална активности нативног ензима. Након тога развијен је нови флуоресцентни есеј заснован на ресазурину као супстрату за детекцију активности ЦДХ на површини ћелија квасца и оптимизован у

микротитар плочама за проналажење мутаната са побољшаном активношћу. Пошто дивљи тип ЦДХ није показао мерљиву активност у виду химере на површини ћелија квасца библиотека гена ЦДХ је направљена од троструког мутанта ЦДХ, претходно добијеног у једном другом истраживању. Флуоресцентни ресазурински есеј је показао и потенцијал за детекцију активности целобиоза-деhidрогеназе проточном цитометријом. Развијени есеј базиран на ресазурину и експресиони систем ЦДХ у виду химере са Aga2 протеином је употребљен за проналажење побољшаних биокатализатора у виду целих ћелија у експериментима дириговане еволуције. Овим системом су пронађени мутанти Н5 и Н9 са повишеном активношћу према лактози и целобиози.

На крају су три мутанта ЦДХ (Н5, Н9 и D2) нађена током дириговане еволуције ензима на површини ћелија квасца клонирани из pCTCON2 у pPICZα вектор за екстрацелуларну експресију у нативном облику у *P. pastoris* KM71H под метанолном индукцијом. Мутанти су пречишћени и детаљно кинетички окарактерисани, и показали су већу активност за лактозу и целобиозу у односу на претходно описане варијанте ЦДХ у литератури. Висока каталитичка константа од $43,5 \text{ s}^{-1}$ Н5 мутанта чини обећавајућим биокатализатором за производњу лактобионске киселине, док висока константа специфичности мутанта Н9 од $132 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ га чини одличним биокатализатором за употребу у биосензорима. Приказани резултати су потврдили да експресиони системи и методе протеинског инжињеринга развијени за ЦДХ у оквиру ове дисертације могу бити од значаја за добијање нових биокатализатора за производњу лактобионске киселине и развој биосензора са већом осетљивошћу за лактозу и целобиозу.

В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Целобиоза-деhidрогеназа је ензим којег гљива беле трулежи производи у количини од 0,5% од свих ванћелијских протеина. С обзиром да производња ензима у гљивама траје дуго и модификација протеинске структуре и активности ензима у гљивама није лака, било је потребно да се ген за ЦДХ клонира и експримира у квасцу. Квасац *S. cerevisiae* InvSc1 је погодан експресиони систем који може да се користи за експерименте дириговане еволуције. До сада је била публикована употреба овог соја квасца за дириговану еволуцију разних оксидо-редуктаза али није био коришћен за ЦДХ из *Phanerochaete chrysosporium*. Успешним клонирањем, прављењем библиотеке и проналажењем мутаната са повећаном активношћу је доказано да се овај експресиони систем може користити и за дириговану еволуцију ЦДХ из *Phanerochaete chrysosporium*.

Експресија ензима у квасцу *S. cerevisiae* EBY100 у виду химере на површини ћелија квасца је посебно погодна за експерименте дириговане еволуције јер се у том систему одржава веза између генотипа и фенотипа. Да би се додатно потврдила употребљивост овог експресионог система било је битно утврдити да ли различити мутанти оксидо-редуктаза задржавају однос активности када су на површини ћелија у односу на своје растворне облике. Стога су мутанти глукоза-оксидазе који су били претходно описани у литератури, експримирани у овом систему и изоловани са површине ћелија квасца у растворном облику за детаљну кинетичку карактеризацију. Сличан однос активности мутаната који је добијен у овој дисертацији у односу на претходно публиковане, потврђује могућност коришћења овог експресионог система за детекцију побољшаних варијанти оксидо-редуктаза и за развој високо ефикасних метода претраживања. С обзиром да се овај експресиони систем показао успешним за глукоза-оксидазу он је по први пут у оквиру ове дисертације тестиран за протеински инжињеринг ЦДХ. У литератури су описане различите методе за детекцију активности ЦДХ, међутим ни једна до сада није коришћена за детекцију активности ЦДХ на

проточном цитометру. Ресазурин се као боја до сада користио за мерење вијабилности ћелија проточним цитометром и за одређивање концентрације глукозе у крви, али не и за детекцију активности ЦДХ. У овој дисертацији је оптимизацијом услова мерења добијен линеарни однос флуоресценције редукованог ресазурина и концентрације ензима ЦДХ, што омогућава да се овај флуоресцентни есеј користи за детектовање побољшаних варијаната овог ензима.

Претрагом библиотеке гена користећи развијени флуоресцентни есеј, добијени су мутанти ЦДХ са побољшаном активношћу на површини ћелија квасца. Мутанти су клонирани и за експресију у растворном облику, где су задржали активности, пропорционалне онима које су показали на површини ћелија квасца, што потврђује претходно публиковане радове о примени експресионог система у квасцу *S. cerevisiae* EBY100 у диригованој еволуцији.

Г. Објављени радови и саопштења који чине део дисертације

1) Објављени радови

1. **Marija Blažić**, Ana Marija Balaž, Vojin Tadić, Bojana Draganić, Raluca Ostafe, Rainer Fischer, Radivoje Prodanović (2019). Protein engineering of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* in yeast *Saccharomyces cerevisiae* InvSc1 for increased activity and stability. *Biochemical Engineering Journal*, **146**, 179-85. (M21, ИФ 2017: 3,226)

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X1930110X>

2. **Marija Blažić**, Ana Marija Balaž, Olivera Prodanović, Nikolina Popović, Raluca Ostafe, Rainer Fischer, Radivoje Prodanović (2019). Directed evolution of cellobiose dehydrogenase on the surface of yeast cells using resazurin based fluorescent assay. *Applied Sciences*, **9(7)**, 1413. (M22, ИФ 2017: 1,855)

<https://www.mdpi.com/2076-3417/9/7/1413>

3. **Blažić Marija**, Kovačević Gordana, Prodanović Olivera, Ostafe Raluca, Gavrović-Jankulović Marija, Fischer Rainer, Prodanović Radivoje (2013). Yeast surface display for the expression, purification and characterization of wild-type and B11 mutant glucose oxidases. *Protein Expression and Purification*, **89**, 175-80. (M23, ИФ 2014: 1,695)

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592813000594?via%3Dihub>

2) Саопштења

1. **Marija Blažić**, Radivoje Prodanović, „Directed evolution of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* in yeast *Saccharomyces cerevisiae* for increased activity”, *42nd FEBS congress*, Jerusalem 2017, FEBS journal **284**, p. **104**. (2017) (M34)
2. **Blažić Marija**, Ostafe Raluca, Fischer Rainer, Prodanović Radivoje, „Directed evolution of the cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* in yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *The Annual International Conference Romanian Society for Biochemistry & Molecular Biology*, Timisoara 2017, NEW FRONT. CHEM. **26**, **2**. (2017) (M34)

3. **Blažić Marija**, „Development of fluorescent assay for high-throughput screening system based on flow cytometry for directed evolution of cellobiose dehydrogenase”, *41st FEBS congress*, Kushadasi 2016, FEBS journal **283**, p. **210-11**. (2016) (M34)
4. **Blažić Marija**, Prodanović Radivoje, „Expression of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* in yeast *Saccharomyces cerevisiae* for directed evolution”, *40th FEBS congress*, Berlin 2015, FEBS journal **282**, p. **191**. (2015) (M34)
5. **Marija Blažić**, Gordana Kovačević, Raluca Ostafe, Rainer Fischer, Vasile Ostafe, Radivoje Prodanović, „Heterologous expression of cellobiose-dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* in *Saccharomyces cerevisiae* for cellulose conversion to biofuels”, *5th International congress for cell biology*, Timisoara 2013, Bulletin of Romanian Society for Cell Biology No. **41** p.**70**. (2013) (M34)
6. **Marija Blažić**, Gordana Kovačević, Nevena Zelenović, Raluca Ostafe, Marija Gavrović-Jankulović, Rainer Fischer, Radivoje Prodanović, „Yeast surface display expression and purification of chimera glucose oxidase construct with Aga2 protein”, *50 Savetovanje Srpskog Hemijskog Društva*, Beograd 2012, Srpsko Hemijsko Društvo, p.**119**. (2012) (M64)

Д. Провера оригиналности докторске дисертације

Оригиналност ове докторске дисертације је проверена 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.). Помоћу програма *iThenticate*, утврђено је да количина подударана текста износи 20%. Овај степен подударности последица је цитата, личних имена, библиографских података коришћених у литератури, тзв. општих места и података у вези са темом дисертације, као и претходно публикованих резултата истраживања проистеклих из дисертације, што је у складу са чланом 9. овог Правилника.

Стога сматрамо да је утврђено да је докторска дисертација **Марије Блажић** у потпуности оригинална, као и да су у потпуности поштована академска правила цитирања.

Ђ. Закључак

У приложеној докторској дисертацији под насловом „Протеински инжењеринг и развој високо ефикасних метода за претраживање библиотеке гена целобиоза-дехидрогеназе из *Phanerochaete chrysosporium* у циљу повећања ензимске активности” кандидат Марија Блажић је успешно одговорила на све постављене задатке који се односе на протеински инжењеринг и клонирање ензима целобиоза-дехидрогеназе у три различита експресиона система. Успешно је развијена високо ефикасна флуоресцентна метода претраживања библиотеке гена целобиоза-дехидрогеназа. Такође, добијено је неколико мутаната који су показали већу активност од дивљег типа ензима и могућност потенцијалне примене у биокатализи.

Научно-истраживачки рад кандидата је публикован у оквиру 3 научна рада, која су проистекла директно из докторске дисертације (један рад у категорији M₂₁, један рад у категорији M₂₂ и један рад у категорији M₂₃). Додатно, резултати истраживања проистекли из ове докторске дисертације су саопштени и на пет научних скупова од међународног значаја и

једном скупу од националног значаја. Комисија сматра да резултати поднети у приложеној докторској дисертацији представљају значајан допринос у области биохемије, јер поред тестираних експресионих система и развијених високо-ефикасних метода за претраживање библиотека гена целобиоза-дехидрогеназе, као и због пронађених и окарактерисаних мутаната овог ензима доприносе бољем разумевању утицаја структуре протеина на његову активност. На основу свега изложеног Комисија предлаже Научно-наставном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду, да поднету докторску дисертацију Марије Блажић под насловом „**Протеински инжењеринг и развој високо ефикасних метода за претраживање библиотеке гена целобиоза-дехидрогеназе из *Phanerochaete chrysosporium* у циљу повећања ензимске активности**” прихвати и одобри њену одбрану за стицање академског звања доктора биохемијских наука.

Београд, 10.04.2019.

Комисија:

др Радивоје Продановић

Ванредни професор, Универзитет у Београду-Хемијски факултет

др Марија Гавровић-Јанкуловић

Редовни професор, Универзитет у Београду-Хемијски факултет

др Ксенија Радотић Хаџи-Манић

Научни саветник, Институт за мултидисциплинарна истраживања,

Универзитет у Београду