

# УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

## ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

### ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b>I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ</b>
<p>1. Датум и орган који је именовao комисију</p> <p>На 2. седници одржаној 15.11.2018. године, Наставно-научно веће Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду</p> <p>2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен:</p> <p><b>др Данијела Којић, ванредни професор</b>, ужа научна област Биохемија, датум избора: 01.07.2015. године, Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет; председник комисије</p> <p><b>др Едвард Петри, ванредни професор</b>, ужа научна област Биохемија, датум избора: 18.07.2018. године, Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет, ментор</p> <p><b>др Јелена Пураћ, ванредни професор</b>, ужа научна област Молекуларна биологија, датум избора: 01.07.2015. године, Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет, члан</p> <p><b>др Анђелка Ћелић, ванредни професор</b>, ужа научна област Молекуларна биологија, датум избора: 18.07.2018.године, Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет, члан</p> <p><b>др Душко Благојевић, научни саветник</b>, ужа научна област Физиологија, датум избора: 20.07.2007. године, Универзитет у Београду, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, члан</p>
<b>II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ</b>
<p>1. Име, име једног родитеља, презиме: Јована, Милена, Плавша</p> <p>2. Датум рођења, општина, држава: 21.05.1989. Суботица, Србија</p> <p>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер стечени стручни назив</p> <p>Природно-математички факултет, Мастер биолог – модул молекуларни биолог</p> <p>4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија</p> <p>2013. године, доктор наука – биолошке науке</p> <p>5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: -</p> <p>6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: -</p>
<b>III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:</b>
<p>„Идентификација и анализа потенцијалних супстрата и инхибитора хуманих протеина подфамилије 1С алдо-кето редуктаза (AKR1C3) добијених рекомбинантном експресијом“</p>

#### IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Докторска дисертација Јоване Плавша је написана на српском језику, ћириличним писмом, са кључном документацијском информацијом на српском и енглеском језику. Текст је написан на 164 страна А4 формата и садржи 85 слика, 17 табела и 161 литературни навод. Дисертација је организована у 12 поглавља: Уводно разматрање - 1 страна, Алдо-кето редуктазе - 9 страна, AKR1C ензими у метаболизму - 15 страна, Ензими као мете за лекове - 5 страна, Инхибитори AKR1C3 - 12 страна, Технике коришћене у истраживању - 29 страна, Циљеви истраживања - 2 стране, Материјал и методе - 21 страна, Резултати и дискусија - 56 страна, Закључци - 2 стране, Литература - 10 страна, Прилози - 2 стране. На почетку дисертације налази се предговор, списак скраћеница, списак илустрација, списак табела и садржај, а након литературних навода следе прилози, биографија кандидаткиње и кључна документацијска информација.

#### V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

**Наслов** докторске дисертације је јасно дефинисан, презентује суштину проблематике која је испитивана и директно указује на циљ испитивања.

У **Уводном разматрању** је укратко описан предмет и циљ истраживања ове докторске дисертације.

Детаљније, општи приказ и увођење у тематику истраживања је представљено кроз 5 поглавља. У првом поглављу **Алдо-кето редуктазе** су описане опште карактеристике алдо-кето редуктаза, њихова номенклатура и класификација са посебним акцентом на хумане протеине подфамилије 1C алдо кето редуктазе. Детаљнија улога и значај AKR1C ензима у различитим процесима стероидогенезе, контроли активности нуклеарних рецептора, њиховом значају у патолошким стањима као и у метаболизму ксенобиотика описане су у другом поглављу **AKR1C ензими у метаболизму**. Следеће поглавље **Ензими као мете за лекове** описује основне каталитичке и кинетичке карактеристике ензима, као и компаративан преглед на врсте инхибиције ензимске активности. Поглавље **Инхибитори AKR1(C3)** представља најзначајније инхибиторе ензимске изоформе C3, њихов значај у лечењу канцера простате, као и структурни увид у селективну инхибицију C3 изоформе на основу доступних кристалних структура. Последње поглавље увода је **Технике коришћене у истраживању** у коме је приказан део коришћених техника, од рекомбинантне експресије протеина, преко различитих структурних, *in vitro* и *in silico* анализа, а затим и методе протеинске кристалографије.

У оквиру уводног разматрања и општег приказа тематике истраживања, кандидаткиња је успешно представила значај истраживања и досадашња сазнања о проблематици докторске дисертације.

У поглављу **Циљеви истраживања** јасно су дефинисане потребе и значај даљег истраживања алдо-кето редуктаза, дефинисан је општи циљ који обухвата оптимизацију ензимског есеја и испитивање ефеката потенцијалних лиганата на ензимску активност одређених хуманих AKR1C ензима. Поред наведеног, циљ истраживања је обухватио и испитивање везе између структуре и функције тестираних једињења (лиганата) према ензиму и то кроз одређивање структуре комплекса ензим-лиганд рендгенском структурном анализом.

Наведени циљеви су у складу са циљевима наведеним приликом пријаве докторске дисертације.

У поглављу **Материјал и методе** прво је наведен и описан материјал који је коришћен, а који укључује компетентне бактерије, плазмиде, као и синтетисана једињења, комерцијалне хемикалије и биљне екстракте који су тестирани у ензимском есеју. Затим су описани протоколи и методе које су коришћене за реализацију наведених циљева, као што су:

- припрема компетентних батерија,
- трансформација бактерија,
- изолација плазмидне ДНК,
- индукција експресије рекомбинантних протеина,
- пречишћавање протеина,
- концентровање и складиштење протеина,
- SDS-PAGE,
- ензимски есеј и одређивање кинетичких параметра,
- кристализација протеина и

-рачунарске (*in silico*) анализе.

Комисија оцењује да су материјали и методе адекватни и савремени. Такође, веома су прецизно и систематично наведени и омогућавају поновљивост анализа.

Поглавље **Резултати и дискусија** подељено је на 5 потпоглавља који прате редослед фаза истраживања које су наведене и у циљу и у материјалима и методама: Оптимизација и анализа раста, индукције, експресије и пречишћавање протеина, Ензимски есеји за AKR1C: оптимизација есеја и тестирање једињења, Карактеристике установљених инхибитора AKR1C3 протеина, Кристализација AKR1C3, Кокристализација AKR1C3 протеина са инхибиторима. У оквиру првог потпоглавља приказани су хронолошки кораци оптимизације сваког од наведеног корака да би се као резултат добио чист активан ензим. После сваког корака је наведен кратак резиме који је био кључан да би се одредио следећи корак. Овим делом је обухваћена анализа коришћених плаزمида, а затим за сваки рекомбинантни протеин (17βHSD1, AKR1C3-GST, AKR1C1, 2, 3 и 4) је посебно приказан процес оптимизације индукције, експресије и пречишћавања. Кандидаткиња је овде навела коначан протокол који је оптимизован за пречишћавање неколико протеина са фокусом на изоформи AKR1C3. У следећем делу је приказана оптимизација есеја базираног на оксидацији супстрата и ефекат различитих тестираних комерцијалних једињења на оксидујућу активност AKR1C3-GST протеина. Посебно се издвојило комерцијално доступно једињење NSN (1-нитросонафтол) као добар инхибитор активности AKR1C3. Затим је приказана оптимизација реакција редукције на примеру изоформе AKR1C3 и ефекта различитих синтетисаних стероидних једињења и биљних екстраката на редукујуће активности различитих изоформи AKR1C протеина. Изоформе C1 и C4 нису приказале јасну ензимску активност, тако да са наведеним изоформама није даље рађено тестирање ефеката једињења. На изоформи C2 је тестирано више стероидних једињења, од којих је најбољу инхибицију показало једињење AKR-2. Највећи део резултата реакција редукције је добијен у раду са изоформом C3. Сва стероидна једињења су тестирана на овој изоформи. Посебно су се издвојила једињења AKR-1, -2, -3, -7, -9, -19 и -22. Затим су на истој изоформи тестирани ефекти биљних екстраката где су се издвојили екстракти вирка (*Alchemilla vulgaris*) и боровнице (*Vaccinium myrtillus*) као потенцијални инхибитори активности AKR1C3. У наредном потпоглављу приказане су структуре и анализа рачунарског молекуларног усидравања ових једињења, као једињења која су показала најбоље инхибиторне карактеристике у претходном потпоглављу. Кинетичке карактеристике наведених једињења су затим упоређена са литературним подацима. У потпоглављу Кристализација AKR1C3 је приказана припрема узорка и његове крајње карактеристике, затим је приказана модификована метода *in situ* протеолизе која је као таква дала добре кристалографске резултате који су у виду слика и вредности резолуције приказани, а потом је направљен приказ утицаја протеолизе на морфологију кристала, квалитет дифракције кристала и ефективност протеолизе у растворима преципитаната. Последње потпоглавље приказује резултате кристализације комплекса протеина са лигандима за који су успешно решене структуре у атомској резолуцији. Приказани резултати кокристализације су са једињењем AKR-7 и AKR-19.

Комисија сматра да је поглавље Резултати и дискусија добро написано. Резултати су представљени табеларно, графички и у сликама структура, представљени су прецизно и јасно што је омогућило јасну интерпретацију и разумевање које је пропраћено паралелно и дискусијом, која је опсежно написана. Резултати су детаљно анализирани и дискутовани заједно са актуелним литературним подацима, а закључци су добро аргументовани.

У поглављу **Закључци** су истакнути закључци који произилазе из добијених резултата и дискусије, као и њихов значај и потенцијална будућа примена.

На основу наведеног, Комисија закључује да су остварени планирани циљеви истраживања у оквиру докторске дисертације.

**Литература** цитирана у оквиру докторске дисертације (161 референца) је савремена, адекватно одабрана и указује на значај и актуелност остварених истраживања. Библиографија је навођена на одговарајући начин.

У поглављу **Прилог** се налази табела која садржи аминокиселинске секвенце хуманих изоформи подфамилије AKR1C и 17βHSD1, а затим и слика на којој је приказана номенклатура и структура аминокиселина са једно- и трословном ознаком.

Комисија сматра да је прилог информативан и да на адекватан начин употпуњује дисертацију.

## **VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ**

Резултати ове докторске дисертације су до сада објављени у два рада у часописима међународног значаја, пет саопштења на међународном скупу штампаном у изводу и шест саопштења на националном скупу штампаном у изводу.

### **Категорија М22 – ИФ=2,342 (2017 Kobson)**

Savić, M. P., Ajduković, J. J., **Plavša, J. J.**, Bekić, S. S., Ćelić, A. S., Klisurić, O. R., Jakimov, D. S., Petri, E. T., Djurendić, E. A. 2018. Evaluation of A-ring fused pyridine d-modified androstane derivatives for antiproliferative and aldo-keto reductase 1C3 inhibitory activity. *MedChemComm*. **9**:969-981.

### **Категорија М23 – ИФ=0,989 (2017 Kobson)**

**Plavša, J. J.**, Řezáčová, P., Kugler, M., Pachel, P., Brynda, J., Voburka, Z., Ćelić, A., Petri, E. T., Škerlová, J. 2018. In situ proteolysis of an N-terminal His tag with thrombin improves the diffraction quality of human aldo-keto reductase 1C3 crystals. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*. **74**(5):300-6.

### **Категорија М34**

Ćelić, A. S., Petri, E. T., Bekić, S. S., Marinović, M. A., **Plavša, J.**, Sakač, M. N. 2018. Use of hormone-sensitive fluorescent biosensors and in vitro assays for characterization of steroidal compounds with antiproliferative activity against breast and prostate cancer cell lines. *FEBS OPEN BIO*, **8**, suppl. 1, p. 291.

Petri, E., Ćelić, A., **Plavša, J.**, Marinović, M., Bekić, S., Klisurić, O., Sakač, M. 2016. Use of X-ray crystallographic data for computational modelling of receptor-ligand interactions: design of steroidal inhibitors of breast and prostate cancer cell growth. *16<sup>th</sup> International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules, Praha, Materials Structure*, **23**(2), p. 117.

**Plavša, J.**, Bekić S., Marinović M., Ćelić A., Petri E. 2016. Development of a protocol for enzymatic assay, docking and crystallization of aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3) with specific inhibitors. *Materials structure in Chemistry, Biology, Physics and Technology*. Vol. 23, 2b, p. a53, ISSN 1211-5894. *FEBS Advanced course in protein crystallography: Nove Hradey*.

**Plavša, J.**, Ćelić, A., Petri, E. 2015. Structural analysis and molecular docking of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases. *The 3<sup>th</sup> Symposium of Biologists and Ecologists of Republic of Srpska, Banja Luka*, Book of Abstracts, p. 124.

**Plavša, J.**, Bekić, S., Krtinić, J., Benić, A., Kitanović, N., Petri, E., Ćelić, A. 2015. Hormone-sensitive fluorescent biosensors and in vitro assays for steroid receptors and steroid oxidoreductases. *FEBS3+ Meeting Molecules of Life, and 11th Meeting of the Slovenian Biochemical Society, Portorož, Ljubljana: Slovenian Biochemical Society*, Book of Abstracts, p. 131.

### **Категорија М64**

**Plavša-Puž, J. J.**, Řezáčová, P., Brynda, J., Ajduković, J. J., Savić, M. P., Ćelić, A., Petri, E. T., Škerlová, J. 2018. Crystal structures of AKR1C3 protein with new potent steroid inhibitors. *The 8<sup>th</sup> Conference of Serbian Biochemical Society, Novi Sad*, Book of Abstracts, p. 171-172.

**Plavša, J. J.**, Řezáčová, P., Brynda, J., Ćelić, A., Petri, E. T., Škerlová, J. 2018. Effect of Modified *In Situ* Proteolysis on Diffraction Quality of Protein AKR1C3 Crystals. *25<sup>th</sup> Conference of the Serbian Crystallographic Society, Bajina Bašta*. Book of Abstracts, p. 78-79.

**Plavša, J. J.**, Ajduković, J. J., Ćelić, A., Sakač, M., Petri, E. T. 2017. Identification of potential inhibitors of AKR1C3 and preparation for structural analyses. *The 7th Conference of Serbian Biochemical Society*,

Belgrade, Book of Abstracts, p. 193-194.

**Plavša, J., Čelić, A., Petri, E.** 2017. Development of a protocol for enzymatic assay, docking and crystallization of aldo keto reductase 1 C2 and C3 (AKR1C2 and C3) with specific inhibitors. *1st Congress of Molecular Biologists of Serbia, Belgrade, Book of Abstracts.* p. 158.

**Plavša, J., Bekić, S., Marinović, M., Čelić, A., Petri, E.** 2016. Development of a protocol for crystallization of aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3). *23rd Conference of the Serbian Crystallographic Society, Andrijevica, Book of Abstracts,* p. 82-83.

**Plavša, J., Nedeljković, M., Petri, E.** 2014. Use of crystallographic data to model the molecular structures and functions of the 17 $\beta$ -HSD oxidoreductases, *21st Conference of the Serbian Crystallographic Society, Užice. Book of Abstracts,* p. 92-93.

## VII ZAKЉUČCI OДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Ензимским есејом који је оптимизован у оквиру ове дисертације су испитивани потенцијални лиганди и њихови ефекти на ензимску активност одређених хуманих изоформи протеина из подфамилије AKR1C, са акцентом на AKR1C3.

Ензимски есеји су показали да комерцијално доступно једињење NSN има добар инхибиторни потенцијал. Од анализираних биљних екстраката, екстракт вирка поседује одређен терапеутски потенцијал као и екстракт лишћа боровнице. Кроз ензимске есеје су се издвојила синтетисана стероидна једињења која су се показала као добри инхибитори активности AKR1C3: AKR-1, -2, -3, -7, -9, -19 и -22. Једињења су по јачини инхибиције била упоредива са познатим инхибитором ибупрофеном. За једињење AKR-2 се испоставило да има потенцијал да буде дуални инхибитор у антиканцерогеним терапијама хормон-зависног канцера простате и то као инхибитор и AKR1C3 и CYP17A1.

Током рада на тези развијен је нови метод кристализације техником *in situ* протеолизе што је резултовало квалитетнијим кристалима протеина AKR1C3. Дифракцијом X зрака на овим кристалима решена је структура протеина, при чему су добијене резолуције међу најбољим у Протеинској бази података (PDB) за овај протеин. Структура протеина без лиганда решена је са резолуцијом од 1,5 Å, док је протеин у комплексу са лигандом AKR-19 имао 1,6 Å и протеин са AKR-7, 1,7 Å. Структуре су показале да делови оба инхибитора окупирају део везног места ензима који се зове подшеп SP1, а окупираност SP1 места са инхибитором се сматра кључном карактеристиком доброг специфичног инхибитора AKR1C3. Дакле, ово су први резултати успешне кристализације протеина, решавања структуре и утачавања из Србије.

Значај свих ових резултата је у томе што су указали на потенцијал биљног материјала, обезбедили одличну основу за будућа дизајнирања и модификовања једињења која се синтетишу и омогућили да даља рачунарска моделовања и молекуларна усидравања буду прецизнија и тачнија, а све то са циљем унапређења инхибиторних карактеристика једињења, потенцијалних терапеутика за различита патолошка стања у чијем развоју учествује AKR1C3 протеин.

## VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

На основу прегледа докторске дисертације, Комисија сматра да је она јасно структурирана. Резултати истраживања су прегледно представљени и правилно анализирани, детаљно дискутовани и упоређени са резултатима других аутора. На основу резултата и дискусије изведени су закључци који дају одговор на постављене циљеве истраживања.

Комисија даје позитивну оцену приказа и тумачења резултата истраживања.

<b>IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:</b>	
1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме	<b>Да</b> , Комисија оцењује да је докторска дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.
2. Да ли дисертација садржи све битне елементе	<b>Да</b> , дисертација садржи све битне елементе неопходне за овакву врсту рада: дефинисану тему истраживања, преглед постојећих истраживања у области, детаљан приказ експерименталних метода и техника, јасан и прегледан приказ резултата и њихову дискусију коришћењем доступне литературе. Закључци су правилно изведени из добијених резултата.
3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци	Резултати ове докторске дисертације пружају увид у новооткривене инхибиторе протеина AKR1C3 и то у виду екстракта вирка и листова боровнице као биљни извор инхибитора, потом NSN као комерцијално доступног једињења, а затим и синтетисаних стероидних једињења AKR-1, -2, -3, -7, -9, -19 и -22. Нови инхибитори имају јачине и карактеристике упоредиве са публикованим инхибиторима. У оквиру ове дисертације установљен је и први дуални инхибитор AKR1C3 који инхибира у стероидогенези и CYP17A1. Као резултат ове дисертације је публикован нови метод <i>in situ</i> протеолизе и добијени су први протеински кристали из Србије. Рендгенском анализом дифракције X зрака протеинских кристала су решене структуре протеина са новим инхибиторима у одличној резолуцији које спадају међу најбоље у Протеинској бази података за овај протеин и то са инхибитором AKR-7 у резолуцији од 1,7 Å, а са AKR-19 у резолуцији 1,6 Å. Решене структуре су омогућиле структурни и функционални увид у интеракције протеина и инхибитора. Анализом је успостављено да део од оба инхибитора се везује за специфично место које је кључно да би се једињење сматрало добрим инхибитором AKR1C3. Део добијених резултата је публикован у два научна рада категорије M22 и M23, што све заједно указује на квалитет и оригиналност спроведених истраживања.
4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања	По мишљењу Комисије, ова докторска дисертација нема значајних недостатака.

<b>X ПРЕДЛОГ:</b>
На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:
На основу укупне оцене дисертације, Комисија предлаже да се докторска дисертација под називом „Идентификација и анализа потенцијалних супстрата и инхибитора хуманих протеина подфамилије 1С алдо-кето редуктаза (АКR1С3) добијених рекомбинантном експеријом“ <b>прихвати</b> , а кандидату Јовани Плавша <b>одобри одбрана</b> .

У Новом Саду, 18.12.2018.

#### ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

\_\_\_\_\_  
др Данијела Којић, ванредни професор,  
Природно-математички факултет,  
Универзитет у Новом Саду, председник

\_\_\_\_\_  
др Едвард Петри, ванредни професор,  
Природно-математички факултет,  
Универзитет у Новом Саду, ментор

\_\_\_\_\_  
др Јелена Пураћ, ванредни професор,  
Природно-математички факултет,  
Универзитет у Новом Саду, члан

\_\_\_\_\_  
др Анђелка Ћелић, ванредни професор,  
Природно-математички факултет,  
Универзитет у Новом Саду, члан

\_\_\_\_\_  
др Душко Благојевић, научни саветник,  
Институт за биолошка истраживања  
„Синиша Станковић”,  
Универзитет у Београду, члан