

НАСТАВНО – НАУЧНОМ ВЕЋУ

ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА

УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

ПРЕДМЕТ: Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације Јелице Р. Милошевић, мастер биохемичара

На редовној седници Наставно – научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду, одржаној дана 12.03.2020. године, одређени смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидаткиње Јелице Р. Милошевић, мастер биохемичара, асистента Хемијског факултета, Универзитета у Београду, под називом:

„Диверзитет пептидних секвенци у амилоидном агрегирању протеина“

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је на својој седници одржаној дана 02.07.2020. године на захтев Хемијског факултета, дало сагласност на предлог теме докторске дисертације под редним бројем 61206-1886/2-20. Комисија је докторску дисертацију прегледала и Наставно – научног већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Јелице Р. Милошевић написана је на 157 страна, А4 формата, фонт 12, проред 1,5 и садржи 65 слика (од тога 8 у прилогу) и 21 табелу (од тога 8 у прилогу). Докторска дисертација је подељена на 9 поглавља: Увод (2 стране), Теоријски део (26 страна), Циљеви (3 стране), Материјал и методе (22 стране), Резултати (48 страна), Дискусија (20 страна), Закључак (4 стране), Литература (19 страна, 232 цитата), Прилози (13 страна) и. Поред наведеног, дисертација садржи и насловне стране на српском и енглеском језику, страну са именима чланова комисије, Захвалницу (2 стране), Сажетак на српском и енглеском језику (по 3 стране), Листу скраћеница (2 стране), Садржај (4 стране), Биографију кандидата (2 стране), Изјаву о ауторству (1 страна), Изјаву о истовестности (1 страна), и Изјаву о коришћењу (2 стране).

У **Уводу** је наведен предмет истраживања ове дисертације и изложен преглед најзначајнијих достигнућа и закључака новијих истраживања у области погрешног увијања и амилоидног агрегирања протеина. Истакнут је значај амилоидних фибрила због патолошких стања који се повезују са њиховим формирањем и потенцијала амилоидних фибрила за примену као наноматеријала. Приказане су актуелне теорије о амилоидном агрегирању и недостаци експерименталних потврда истих који илуструју значај истраживања у овој области.

Теоријски део је подељен на пет целина. У целини **Конформациони прелази протеина** описани су процеси увијања, погрешног увијања протеина, денатурације и агрегирања протеина са термодинамичког и кинетичког аспекта. Кроз кинетику ових процеса објашњено је постојање интермедијера увијања и погрешног увијања протеина. У целини **Амилоидни фибрили** детаљно су описани структурни аспекти амилоидних фибрила, пут њиховог настајања од различитих прекурсора, као и њихов значај за патолошка стања и биотехнолошке примене. Одељак **Методe за праћење формирања фибрила** даје преглед метода које се користе за праћење настајања, али и карактеризацију формираних амилоидних фибрила и интермедијера фибрилације. Последња два одељка - **Модел системи амилоидогених протеина** и **Модел системи за испитивање потенцијала фибрилације** описана су структурна и функционална својства овалбумина, лизозима, папаина и фицина на којима су рађена истраживања у оквиру ове дисертације.

Поглавље **Циљеви** приказије основни задатак ове дисертације, као и велики број специфичних циљева који су постављени како би омогућили одговарање на главни циљ истраживања.

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

Поглавље **Резултати** организовано је у пет целина. Прва целина приказује резултате изоловања протеинских модел система – овалбумина, папаина и фицина, као и идентификацију и карактеризацију пречишћене и идентификоване изоформе фицин 1ц. Друга и трећа целина приказују резултате дестабилизације протеина јајета и оптимизоване протоколе за брзу фибрилацију овалбумина и спору фибрилацију лизозима уз формирање стабилних олигомерних интермедијера. Приказани су резултати детаљне анализе промена секундарних структура при формирању фибрила и олигомера ових модел система добијени методом инфрацрвене спектроскопије. У петом поглављу дат је упоредни приказ стабилности преостала два модел система – папаина и фицина у различитим дестабилизујућим условима, као и испитивање услова за њихово амилоидно агрегирање.

Дискусија доводи у везу резултате ове дисертације и најзначајније литературне податке. Упоредном анализом ових типова података потврђене су или оповргнуте иницијалне хипотезе и дата су претпостављена објашњења описаних феномена.

У **Закључку** је дат кратак преглед резултата ове докторске студије и одговора на питања формулисана у оквиру циљева ове дисертације.

У одељку **Прилози** дати су резултати експеримената и биоинформатичких анализа који допуњују резултате приказане у главном делу дисертације.

Литература (236 референци) даје списак извора (научних радова, књига) са информацијама релевантним за истраживања у оквиру ове дисертације.

Б. Кратак приказ резултата

У овој дисертацији испитана је подложност различитих протеина амилоидном агрегирању. Као модел системи коришћени су овалбумин и лизозим из кокошјег јајета, протеини за које је познато да граде амилоидне фибриле, као и цистеин-протеазе папаин и фицин, протеини за које претходно нису пријављене амилоидне форме. Овалбумин, папаин и фицин изоловани су из природних извора или комерцијалних препарата таложним и хроматографским методама. Фицин је изолован као смеша изоформи из латекса смокве, од којих је једна успешно пречишћена и идентификована као фицин 1ц на основу доступних резултата транскриптомске анализе. Карактеризација фицина 1ц у контексту структурних својстава и стабилности потврдила је велику подударност са другим претходно описаним изоформама, као и са папаином из папаје.

Оптимизирана је процедура за брзо добијање зрелих амилоидних фибрила овалбумина у року од 24 сата инкубирања постигнута комбинацијом екстремних услова – рН 2 и температуре 90°C. У процесу фибрилације овалбумина у поменутих условима није детектовано постојање стабилних интермедијерних стања. У току фибрилације уочене су значајне промене у садржају секундарних структура праћене инфрацрвеном спектроскопијом. Фине структурне промене на путу фибрилације показане су методом деконволуције амидног I региона инфрацрвених спектра. Утврђено је да се 33% полипептидне кичме овалбумина налази у форми интермолекулске агрегационе β -плочице карактеристичне за амилоидне фибриле. Пораст садржаја агрегационих β -плочица последица је нарушавања секундарних структура нативног овалбумина, превасходно α -хеликса и неуређеног низа.

Оптимизирана је метода фибрилације лизозима која је за разлику од фибрилације овалбумина спор процес који захтева два месеца инкубирања у 90% раствору етанола. На путу формирања зрелих амилоидних фибрила у овим дестабилизујућим условима показано је постојање стабилног интермедијера у форми олигомера који се формира у току прва 4 дана инкубирања. Испитане су fine структурне промене при преласку у стање олигомера, као и при формирању зрелих фибрила. Утврђено је да се садржај агрегационе β -плочице у фибрилној форми износи 35,5%, док у форми олигомера износи 31,7%. С обзиром на почетни садржај ове секундарне структуре у нативном узорку лизозима који износи 6,6% резултати указују на велику промену у садржају секундарних структура приликом формирања олигомерних интермедијера која се у мањој мери мења при преласку у форму зрелих амилоидних фибрила.

Коришћење модел система брзо и споро фибрилирајућих протеина омогућило је додатни развој методологије за анализу инфрацрвених спектра протеина у процесу формирања амилоидних агрегата. Симултаном анализом амидног I, II и III региона може се анализирати како квалитативно, тако и квантитативно настајање амилоидне форме протеина. Амидни I и III регион услед велике зависности од конформационог стања

полипептидне кичме дају потврду за формирање агрегационих β -плочица и нарушавање нативних структура. Развијена је брза и једноставна метода за квантитативно праћење формирања зрелих фибрила и олигомерних интермедијера праћењем односа интензитета трака у амидном I региону и амидне II траке која је коришћена као интерни стандард. У овој дисертацији је показано да је код брзо фибрилирајућих модел система пораст тенденције заузимања агрегационе β -плочице праћен овом методом у одличној корелацији (0,93354 и 0,95489 за праћење траке агрегационе β -плочице високе и ниске фреквенције) са стандардном методом за квантитативно праћење формирања амилоида – флуоресценцијом тиофлавина Т. Показано је на примеру модел система споро фибрилирајућег протеина да ова метода може служити за детекцију олигомерних интермедијера амилоидног агрегирања, за разлику од флуоресцентних метода описаних у литератури.

Упоредна анализа стабилности папаина, појединачног полипептидног ланца и смеше изоформи фицина у различитим дестабилизујућим условима показала је већу стабилност фицина. С обзиром на секвенцијалне и структурне сличности папаина и познатих изоформи фицина, као и на сличности у погледу стабилности, резултати ове студије потврђују да је смеша изоформи фицина стабилизована управо превенцијом агрегирања услед постојања хетерогене смеше полипептида.

У овој студији је први пут показано да дводоменски протеин папаин може формирати амилоидне фибриле након дестабилизације стабилног домена богатог β -плочицама уреом. При истим условима, смеша изоформи фицина не формира амилоидне фибриле, али формира олигомерна стања на путу фибрилације како је показано комбинацијом квантитативне методе за анализу инфрацрвених спектра и методе флуоресценције тиофлавина Т.

Показано је да амилоидни фибрили овалбумина везују јоне кадмијума и олова из раствора што их чини потенцијално примењивим за пречишћавање отпадних вода.

В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Иако се тенденција формирања амилоидних фибрила сматра универзалном особином свих пептида, мали је број глобуларних протеина са дефинисаном тродимензионалном структуром на којима је ова хипотеза потврђена. На тенденцију агрегирања утиче пептидна секвенца и последично – наелектрисање, заступљеност хидрофобних региона, секундарне структуре присутне у нативном стању, који заједно утичу на могућност формирања компакте структуре [1]. С обзиром на диверзитет особина пептида за које је показано да формирају фибриле, разликују се и услови који ову промену фаворизују, укључујући и различите пријављене протоколе фибрилације за исти протеин. Ипак, чест је случај фибрилације протеина у условима ниске рН у којима се фаворизују стање стопљене

глобуле, као што је показано на примеру два модел система ове студије, овалбумина и лизозима [2, 3]. У овој студији су оптимизовани протоколи за фибрилацију ових протеина, тако је да је за овалбумин постигнуто формирање зрелих фибрила за само 24 сата, а код лизозима споро формирање фибрила које омогућава структурне анализе олигомера. На тај начин су детаљно мапиране структурне промене које се јављају при преласку нативног у ова измењена стања инфрацрвеном спектроскопијом што је у мањој мери заступљено у литератури с обзиром на захтевну методу деконволуције амидног I региона протеинских спектра [4]. У овој студији је из тог разлога развијена једноставнија метода за праћење формирања зрелих фибрила и олигомера с обзиром на потребу метода за брзу и поуздану детекцију ових форми. За олигомере је показано да су токсична врста у амилоидном агрегирању код неуродегенеративних поремећаја [5], али поред токсичности олигомера потврђени су и негативни ефекти самог агрегирања протеина у амилоидозама [6]. Осим значаја развијене методе за детекцију амилоидних форми у патолошким узорцима, метода праћења нормализованих интензитета трака које одговарају агрегационој β -плочици у амидном I региону значајна је и за претрагу услова за амилоидно агрегирање разноврсних протеина што поједностављује испитивања на фундаменталном нивоу која треба да дају одговоре на многа нерасветљена питања у овој области.

Како је међу полипептидима са потврђеном тенденцијом агрегирања велики број протеина у којима је доминантна секундарна структура α -хеликс (инсулин, хемоглобин, говеђи и хумани серум албумин), као и протеина са комбинованим начином увијања (овалбумин, лизозим), папаин је одабран као модел систем дводоменског протеина са израженим разликама у погледу садржаја секундарних структура и стабилности [7]. С обзиром на присуство једног домена који је у потпуности α -хеликоидан и другог који је у потпуности у конформацији β -плочице, на примеру папаина је показано да дестабилизација само α -хеликоидног домена није довољна за постизање амилоидног агрегирања, већ да је потребно дестабилизovati и домен богат β -плочицама које у неизмењеном облику нису у адекватној конформацији да представљају језгро растућих амилоидних фибрила.

Одабиром смеше фицина као преосталог модел система показано је да велики диверзитет секвенци, без обзира на структурне одлике које нису показане као препрека у грађењу амилоида на примеру хомологог појединачног полипептида папаина, може спречавати ове облике агрегирања. На овај начин је показано да хетерогеност пептидних секвенци може пружати стабилизацију смеси протеина што објашњава разлог за експресију великог броја изоформи без функционалних разлика у системима које карактерише висока концентрација протеина. Значај истраживања ових питања је пре свега фундаменталан, али је и у основи размевања патогенезе многих болести које су изазване погрешним увијањем и амилоидним агрегирањем протеина.

Поред значаја резултата ове дисертације за развој методологије и разумевање фундаменталних концепата везаних за амилоидно агрегирање, формирање амилоидних агрегата од разноврсних лако доступних протеина је од значаја због њихове

биотехнолошке примене. Због својих изузетних својстава у погледу чврстине и стабилности [8], амилоидни фибрили имају способност везивања јона различитих тешких метала, као што је показано на примеру амилоидних фибрила β -лактоглобулина [9, 10], и на примеру амилоидних фибрила овалбумина у овој дисертацији.

Литература:

1. Knowles, T.P.J., Vendruscolo, M., Dobson C.M. *The amyloid state and its association with protein misfolding diseases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(6): p. 384-96.
<https://doi.org/10.1038/nrm3810>
2. Lara, C., Gourdin-Bertin, S., Adamcik J., Bolisetty S., Mezzenga R. *Self-assembly of ovalbumin into amyloid and non-amyloid fibrils*. Biomacromolecules, 2012. **13**(12): p. 4213-21.
<https://doi.org/10.1021/bm301481v>
3. Frare, E., Polverino de Laureto, P., Zurdo, J., Dobson, C.M., Fontana, A. *A highly amyloidogenic region of hen lysozyme*. J Mol Biol, 2004. **340**(5): p. 1153-65.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.056>
4. Frare, E., Mossuto, M., Polverino de Laureto, P., Tolin, S., Menzer, L., Dumoulin, M., Dobson, C.M., Fontana, A. *Characterization of oligomeric species on the aggregation pathway of human lysozyme*. J Mol Biol, 2009. **387**(1): p. 17-27.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.01.049>
5. Kaye, R., C.A. Lasagna-Reeves. *Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity*. J Alzheimers Dis, 2013. **33 Suppl 1**: p. S67-78. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-129001>
6. Pepys, M.B., *Amyloidosis*. Annu Rev Med, 2006. **57**: p. 223-41.
<https://doi.org/10.1146/annurev.med.57.121304.131243>
7. Raskovic, B., Popović, M., Ostojić, S., Anđelković, B., Tešević, V., Polović, N. *Fourier transform infrared spectroscopy provides an evidence of papain denaturation and aggregation during cold storage*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2015. **150**: p. 238-246.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.05.061>
8. Lamour, G., Lamour, G., Nassar, R., Chan, P.H.W., Bozkurt, G., Li, J., Bui, J.M., Yip, C.K., Mayor, T., Li, H., Wu, H., Gsponer, J.A. *Mapping the Broad Structural and Mechanical Properties of Amyloid Fibrils*. Biophys J, 2017. **112**(4): p. 584-594.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.12.036>
9. Bolisetty, S., R. Mezzenga, *Amyloid-carbon hybrid membranes for universal water purification*. Nat Nanotechnol, 2016. **11**(4): p. 365-71. <https://doi.org/10.1038/nnano.2015.310>
10. Bolisetty, S., Reinhold, N., Zeder, C., Orozco, M.N, Mezzenga, R. *Efficient purification of arsenic-contaminated water using amyloid-carbon hybrid membranes*. Chemical Communication, 2017. **53**(42): p. 5714-5717. <https://doi.org/10.1039/C7CC00406K>

Г. Објављени радови и саопштења који чине део дисертације

I Радови

1. Jelica Milošević, Jovan Petrić, Branko Jovčić, Brankica Janković, Natalija Polović, Exploring the potential of infrared spectroscopy in qualitative and quantitative monitoring of ovalbumin amyloid fibrillation, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 229 (2020): 117882. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117882> (IF2019 3,232, M21, 7/42 Spectroscopy)
2. Jelica Milošević, Brankica Janković, Radivoje Prodanović, Natalija Polović, Comparative stability of ficin and papain in acidic conditions and the presence of ethanol, *Amino Acids* 51 (2019): 829–838. <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02724-3> (IF2019 3,063, M22, 153/297 Biochemistry & Molecular Biology)
3. Jelica Milošević, Lidija Vrhovac, Filip Đurković, Brankica Janković, Saša Malkov, Jurij Lah, Natalija Polović, Isolation, identification, and stability of Ficin 1c isoform from fig latex, *New Journal of Chemistry* 44 (2020): 15716-15723. <https://doi.org/10.1039/D0NJ02938F> (IF2019 3,288, M22, 68/177 Chemistry, Multidisciplinary)
4. Jelica Milošević, Radivoje Prodanović, Natalija Polović, On the Protein Fibrillation Pathway: Oligomer Intermediates Detection Using ATR-FTIR Spectroscopy, *Molecules* 26 (2021): 970. <https://doi.org/10.3390/molecules26040970> (IF2019 3,267, M22, 37/126 Chemistry, Multidisciplinary, 41/161 Biochemistry & Molecular Biology)

II Саопштења

1. Milošević Jelica, Polović Natalija, The difference of amyloid fibril formation after reduction and denaturation of crude protein preparation, FEBS3+ Meeting, Hungary: From molecules to living systems, Siófok, Hungary, 2-5 September 2018. ISBN 978-615-5270-47-5. (M34)
2. Milošević Jelica, Polović Natalija, Amyloid fibrillation of ovalbumin, Serbian Biochemical Society Eighth Conference Proceedings, pp. 155 - 156, Beograd, 10 November 2018. ISBN 978-86-7220-096-6. (M64)
3. Jelica Milošević, Nemanja Mijin, Luka Maleš, Aleksandra Milovanović, Branko Jovčić, Natalija Polović, Kinetics of amyloid fibril formation in the presence of metal ions and low-molecular-weight compounds, Serbian Biochemical Society Ninth Conference Proceedings, pp. 133 - 133, Beograd, 14-16 November 2019. ISBN 978-86-7220-101-7. (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.). На основу провере оригиналности докторске дисертације „Диверзитет пептидних секвенци у амилоидном агрегирању протеина” ауторке Јелице Р. Милошевић, констатујемо да утврђено подударање текста износи мање од 5%. Овај степен подударности последица је цитата, личних имена/звања, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података, и претходно публикованих резултата истраживања докторанткиње, који су проистекли из ове дисертације што је у складу са чланом 9. Правилника. На основу свега изнетог, Комисија сматра да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Ђ. Закључак

Комисија је на основу детаљног прегледа докторске дисертације под насловом: „Диверзитет пептидних секвенци у амилоидном агрегирању протеина“ закључила да је кандидаткиња Јелица Р. Милошевић успешно одговорила на постављене циљеве ове дисертације, а који се односе на разумевање утицаја диверзитета пептидних секвенци на тенденцију амилоидног агрегирања и формирања олигомерних интермедијера на овом путу.

Научно-истраживачки рад кандидаткиње публикован је у оквиру 4 научна рада (1 категорије M21 и 3 категорије M22) проистекла из докторске дисертације. Поред тога, резултати проистекли из ове докторске дисертације саопштени су и на 3 научна скупа од којих је један од међународног значаја.

Комисија сматра да резултати поднети у приложеној докторској дисертацији представљају значајан допринос у области биохемије, будући да доприносе разумевању путева амилоидног агрегирања различитих полипептида и структурних промена на том путу. Ова дисертација пружа искорак у примени инфрацрвене спектроскопије у квантитативној анализи амилоидног агрегирања и примени исте у претрази услова за ефикасну фибрилацију протеина. Применом методологије развијене у оквиру дисертације, први пут је пријављено формирање амилоидних фибрила папаина и показано је коришћењем адекватних модел система да хетероген садржај полипептидних форми представља облик стабилизације нативне форме протеина кроз превенцију формирања амилоидних агрегата. Развој методологије и нових модел

система амилоидогених протеина од значаја је како за одговарање на фундаментална питања, тако и у погледу примене амилоидних фибрила као наноматеријала.

На основу свега изложеног, а у складу са Законом о високом образовању, Статутом Хемијског факултета, Комисија сматра да су испуњени сви услови за одбрану докторске дисертације и предлаже Наставно-научном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду да, поднету докторску дисертацију Јелице Р. Милошевић под насловом „**Диверзитет пептидних секвенци у амилоидном агрегирању протеина**“ прихвати и одобри њену одбрану за стицање академског звања доктора биохемијских наука.

Београд, 31.5.2021.

Комисија:

др Наталија Половић

ванредни професор
Хемијски факултет, Универзитет у Београду

др Марија Гавровић-Јанкуловић

редовни професор
Хемијски факултет, Универзитет у Београду

др Бранко Јовчић

редовни професор
Биолошки факултет, Универзитет у Београду
