

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

На Х редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 08.09.2017. године, прихваћен је извештај ментора др Бранке Вуковић-Гачић о урађеној докторској дисертацији мр Катарине Петровић-Булатовић, докторанда на Катедри за микробиологију Биолошког факултета у Београду, под насловом **„Развој високо аутоматизованих микротитарских тестова на *Saccharomyces cerevisiae* за детекцију једињења са антифунгалним и цитостатским дејством”** и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Бранка Вуковић-Гачић, редовни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет, др Јелена Кнежевић-Вукчевић, редовни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет и др Дејан Крњаић, редовни професор, Универзитет у Београду - Факултет ветеринарске медицине. Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација мр Катарине Петровић-Булатовић под насловом **„Развој високо аутоматизованих микротитарских тестова на *Saccharomyces cerevisiae* за детекцију једињења са антифунгалним и цитостатским дејством”** написана је на 138 страна и садржи 8 поглавља: Увод (22 стране), Циљ рада (1 страна), Материјал и методе (31 страна), Резултати (36 страна), Дискусија (11 страна), Закључци (2 стране), Литература (13 страна) и Прилог (21 страна). На почетку дисертације приложен је апстракт на српском и енглеском језику. Дисертација садржи 2 табеле и 38 слика. Поглавље литература садржи 117 библиографских јединица. На крају дисертације приложена су следећа документа: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације:

У поглављу УВОД, кандидаткиња је у оквиру осам потпоглавља изнела детаљан приказ значаја испитивања нових лекова који се користе у сузбијању инфективних болести и канцера, а у контексту развоја високо специфичних персонализованих терапија. Описано је порекло природних продуката и истакнута њихова важност у истраживању нових лекова, са посебним освртом на тестирање великих колекција хемијских једињења, нарочито малих молекула. Такође, описане су постојеће групе антифунгалних лекова и цитостатика који се примењују у клиничкој пракси и њихови механизми деловања. Описан је процес преклиничког развоја нових лекова и проблеми који се јављају, а који се пре свега односе на обимност, брзину и избор оптималних стратегија за одабир активних

супстанци. Представљени су високо аутоматизовани тестови и предности коришћења биолошких есеја на микроорганизмима у односу на анималне моделе и биохемијске есеје. Поред стандардних *in vitro* тестова за мерење цитотоксичности, описане су и неинвазивне методе за мерење ћелијске вијабилности које се користе у савременим истраживањима антимикробних и цитостатских агенаса. Описан је еукариотски модел организам, квасац *Saccharomyces cerevisiae*, његов животни циклус и особине због којих се често користи у молекуларно-биолошким истраживањима. Истакнуто је да је због високог степена хомологије између релевантних гена квасца, других гљива и сисарских ћелија, изучавање структуре протеина *S. cerevisiae* и разумевање њихове улоге у модулацији сигналних путева од посебног значаја у детекцији нових антифунгалних и цитостатских агенаса. Представљене су и предности коришћења *S. cerevisiae* у високо аутоматизованим тестовима у односу на сисарске ћелијске културе. Да би се превазишао проблем пропустљивости ћелијске мембране, истакнута је и важност коришћења сојева квасца којима је уклоњен један (*pdr5*) или два (*pdr5snq2*) гена чији производи учествују у процесу активног транспорта кроз ћелијску мембрану. Описана је савремена метода хаплодефицијентног профилисања (ХИП) и указано на важност њеног коришћења у разумевању начина деловања биолошки активних молекула, што је од посебног значаја у откривању нових антипролиферативних мета.

Полазећи од ових основа, мр Катарина Петровић - Булатовић је поставила ЦИЉЕВЕ истраживања: (i) развој биолошких есеја за праћење раста *S. cerevisiae* мерењем јачине флуоресцентног сигнала редукованог *amarBlue*® (реагенс са ресазурином) и мерењем оптичке густине; (ii) детекција антипролиферативне активности малих молекула из колекције фармацеутске компаније Новартис. У том циљу дефинисани су задаци: (i) испитивање ефекта различитих параметара на раст културе квасца и квалитет *amarBlue*® есеја у микротитарским плочама са 384 и 1536 бунарчића, као и детекција антипролиферативног потенцијала колекције малих молекула у ултра високо аутоматизованим условима; (ii) испитивање утицаја различитих параметара на раст културе квасца и квалитет теста заснованог на мерењу оптичке густине у микротитарским плочама са 96, 384 и 1536 бунарчића; (iii) компарација осетљивости развијених тестова на основу инхибиторне концентрације 50% (IC₅₀) одређене у наведеним тестовима; (iv) испитивање разноликости начина деловања једињења активних у примарном тестирању, коришћењем хаплодефицијентних сојева квасца; (v) испитивање начина деловања активних једињења са цитостатским и антифунгалним дејством у хаплодефицијентним сојевима.

Поглавље МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ организовано је у два потпоглавља у којима је описано порекло супстанци и материјала, инструменти коришћени у високо аутоматизованим условима, као и експерименталне процедуре и методе коришћене приликом израде ове докторске дисертације: припрема малих молекула за примарно и валидационо тестирање, култивација сојева квасца, одређивање апсорпционог и трансмисионог спектра медијума, одређивање осетљивости *EnVision 2100* мултичитача и методе за одређивање утицаја различитих фактора на раст културе током развоја тестова. Осетљивост есеја у високо аутоматизованим условима представљена је преко односа минималног и максималног сигнала, а квалитет је одређиван израчунавањем Z' фактора

помоћу софтверског пакета (*Microsoft Office 2007*, САД). Описана је метода нормализације добијених резулата, као и критеријум који се користио за раздвајање активних од неактивних молекула. За компарацију осетљивости развијених тестова преко инхибиторне концентрације 50% (IC_{50}) коришћен је Новартисов интерно развијен софтверски Хелиос програм. Детаљно је описана припрема почетног стока хаплодефицијентних сојева квасца и компетитивног узгајања културе у присуству испитиваних једињења, као и начин екстракције геномске ДНК. Присуство сваког хаплодефицијентног соја одређено је применом PCR, GeneFlex Tag16K v2 микрочип хибридизације, а резултати тумачени коришћењем софтверског пакета (*Microsoft Office 2007*, САД) и SpotFire® (*Tibco*).

У поглављу РЕЗУЛТАТИ кандидаткиња је приказала добијене резултате у пет целина. У првом потпоглављу су приказани резултати оптимизације alamarBlue® методе у микротитарским плочама са 384 и 1536 бунарчића са дивљим сојем (wt) у које је укључено тестирање различитих параметара. Најбољи резултати у микротитарским плочама са 384 бунарчића су добијени када је почетна култура густине OD_{600} од 0,01 до 0,015 гајена у волумену од 12 μ L по бунарчићу током 16 сати, а пре читавања флуоресцентног сигнала инкубирана три сата са 3% alamarBlue® у 150 mM фосфатном пуферу pH 5,9. Због смањеног волумена ћелијске културе претходно дефинисани параметри су тестирани на микротитарским плочама са 1536 бунарчића, при чему су најбољи резултати добијени при густинама почетне културе OD_{600} од 0,006 до 0,028, волумену 4-6 μ L по бунарчићу и инкубацији од три сата са 1,5% alamarBlue® у пуферу pH 6,4. Смањење волумена културе и концентрације alamarBlue® није утицало на раст *pdr5* соја и осетљивост на циклохексамид. За разлику од wt и *pdr5* сојева где концентрација DMSO до 2% не утиче на квалитет есеја, 1% DMSO је инхибирао пролиферацију ћелија *pdr5snq2* соја. Приказана је и репродукцибилност alamarBlue® теста која износи 80% уколико се изводи под истим условима, односно 50% уколико један од параметара није оптималан.

У другом потпоглављу су приказани резултати оптимизације методе за праћење раста квасца мерењем оптичке густине. У плочама са 96 и 384 бунарчића најбољи резултати су добијени при густинама почетне културе OD_{600} 0,05 до 0,1 у богатом медијуму и OD_{600} 0,1 до 0,2 у минималном медијуму, у волумену од 150 μ L (96 бунарчића) и изнад 30 μ L (384 бунарчића) и инкубацији од 9 односно 13 сати. У високо аутоматизованим условима на плочама са 1536 бунарчића најбољи резултати су добијени гајењем ћелија у 8 μ L минималног медијума, при густини почетне културе OD_{600} од 0,01 до 0,05 уз високу влажност и аерацију помоћу високофреквентног вортекса у трајању од 5 секунди на свака два сата током 16 сати.

У трећем потпоглављу представљена је Z' вредност за сваку појединачну плочу коришћену у примарној претрази (alamarBlue® тест) у ултра високо аутоматизованим условима и показан антипролиферативни ефекат малих молекула из Новартисове колекције. Од 1.101.408 тестираних једињења 25.144 (2,28%) је инхибирало раст квасца (Z' вредност је од 0,5 до 0,9).

У четвртном и петом потпоглављу дат је број молекула различитих структура одабраних за даљу валидацију и резултати компарације инхибиторног ефекта 50% (IC_{50})

одређеног преко јачине флуоресцентног сигнала *alarBlue*® и оптичке густине и констатовано да је оптичка густина осетљивија метода.

У шестом и седмом потпоглављу приказана је разноврсност начина деловања 572 одабрана једињења из примарне претраге. Анализом раста хаплодефицијентних сојева квасца показано је да она утичу на 25% од укупног броја протеина у геному квасца, што је слично деловању једињења добијених из других извора. Потврђени су подаци из литературе о начину деловања сквалестатина, нокодазола, реверомицина, конканамицина, ауреобазидина и рапамицина на протеине квасца. Такође, приказан је и ефекат рокогламида и FR171456, једињења чији механизам деловања није познат. Сојеви са смањеном количином протеина кодираних *TIF5*, *TIF34* и *TIF35* генима осетљивији су на присуство рокогламида, па су могуће мете његовог деловања субјединице eIF3 неопходне за формирање 48S транслационог пре-иницирајућег комплекса. Ефекат FR171456 на раст *ERG26/erg26* соја указује да је стерол-4-алфа-карбоксилат-3-дехидрогеназа могућа мета његовог деловања. У последњем потпоглављу је приказан утицај ерголинског једињења NGx04 на раст колекције хаплодефицијентних сојева. Поређењем осетљивости *SEC14/sec14* и *KES1/kes1* сојева у односу на wt сој, закључено је да NGx04 своје инхибиторно деловање на раст квасца остварује кроз могућу интеракцију са продуктом *SEC14* гена.

У поглављу ДИСКУСИЈА представљена је анализа и интерпретација резултата добијених овим истраживањем. Добијене резултате мр Катарина Петровић - Булатовић повезује у одговарајуће целине и проналази њихов значај у оквиру испитиване проблематике. У овом поглављу компетентно су дискутовани добијени резултати с освртом на литературне податке и вршено њихово поређење са истраживањима везаним за развој других метода и модел организама. Дискусија је груписана у четири дела. У првом је дискутована оптимизација *alarBlue*® есеја, указано на значај пажљивог одабира параметара и њиховог међусобног утицаја, као и осетљивости мерних инструмената на квалитет есеја у високо аутоматизованим условима. Наглашен је значај тестирања репродукцибилности методе за одабир молекула са антипролиферативном активношћу и њихову даљу валидацију у преклиничким и клиничким истраживањима. Дискутована је и могућност употребе сојева којима је уклоњена једна или две пумпе (*pdr5* или *pdr5snq2*) одговорне за мултирезистенцију на лекове.

У другом делу дискутована је метода праћења раста *S. cerevisiae* мерењем оптичке густине у високо аутоматизованим условима и утицај појединачних параметара (медијума, волумена културе, аерације) у микротитарским плочама са 96, 384 и 1536 бунарчића. У трећем делу су дискутовани резултати примарног и валидационог тестирања и предности коришћења *alarBlue*® методе за примарно тестирање. Кандидаткиња се бавила проблемом неподударности резултата добијених праћењем ћелијског раста преко јачине флуоресцентног сигнала и оптичке густине културе, као и могућим факторима који утичу на добијање лажно позитивних и лажно негативних резултата.

У четвртном делу је дискутована разноврсност деловања молекула добијених примарним тестирањем на хаплодефицијентне сојеве квасца у односу на молекуле са познатим начином деловања, као и могући начини деловања рокогламида и једињења

ФР171456. Поред тога, дискутован је могући начин деловања једињења из примарне претраге NGx04 на активност Sec14p протеина. Висока хомологија квасца са другим гљивама пружа основ за даља испитивања молекула у контексту истраживања нових антифунгалних лекова.

У поглављу ЗАКЉУЧЦИ мр Катарина Петровић - Булатовић сумира добијене резултате и износи преглед најзначајнијих закључака. Закључено је да су alamarBlue® и оптичка густина у високо аутоматизованим условима изузетно добри тестови, а *Saccharomyces cerevisiae* адекватан модел систем за тестирање потенцијалних лекова, имајући у виду висок степен хомологије између релевантних гена квасца, других гљива и сисарских ћелија. Закључује се да је методом халподефицијентног профилисања могућа карактеризација механизма деловања, како познатих, тако и нових антифунгалних једињења.

Поглавље ЛИТЕРАТУРА садржи 116 библиографских јединица. Увид у цитирану литературу показује да је мр Катарина Петровић - Булатовић студиозно приступила истраживању и избором релевантне литературе успешно испунила задате циљеве. Литературни извори су адекватно и на одговарајућим местима цитирани у тексту докторске дисертације.

У поглављу ПРИЛОГ дате су инхибиторне концентрације 50% (IC₅₀) вредности за 1930 молекула, добијене у валидационим тестовима употребом alamarBlue® есеја и методе мерења оптичке густине.

Радови и конгресна саопштења која чине део докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **M21a** Filipuzzi, I., Cotesta, S., Perruccio, F., Knapp, B., Fu, Y., Studer, C., Pries, V., Riedl, R., Helliwell, S.B., **Petrovic, K.T.**, Movva, N.R., Sanglard, D., Tao, J., Hoepfner, D. (2016) High-Resolution Genetics Identifies the Lipid Transfer Protein Sec14p as Target for Antifungal Ergolines. PLOS Genetics 12, e1006374. doi:10.1371/journal.pgen.1006374 **IF 6.100**
2. **M22** **Petrovic, K.**, Pfeifer, M., Parker, C.N., Schuierer, S., Tallarico, J., Hoepfner, D., Movva, N.R., Scheel, G., Helliwell, SB. (2017) Two low complexity ultra-high throughput methods to identify diverse chemically bioactive molecules using *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Res., 199, 10-18. doi: 10.1016/j.micres.2017.02.004. **IF 3.037**

Мишљење и предлог комисије:

Докторска дисертација мр Катарине Петровић-Булатовић под насловом „Развој високо аутоматизованих микротитарских тестова на *Saccharomyces cerevisiae* за детекцију једињења са антифунгалним и цитостатским дејством” представља свестрано и савремено урађену студију из области микробиологије и експерименталне фармакологије. Докторска дисертација је урађена у складу са циљевима наведеним у пријави теме и садржи све релевантне елементе. По обиму, садржају, оригиналности резултата, начину њиховог представљања и интерпретацији, уз осврт на актуелну и релевантну литературу, поднети текст има све одлике докторске дисертације.

Комисија сматра да докторска дисертација мр Катарине Петровић-Булатовић представља значајан допринос развоју високо аутоматизованих есеја који су неопходни у фармацеутској индустрији за истраживање нових антифунгалних и цитостатских лекова. Поред оптимизације два таква есеја на *Saccharomyces cerevisiae* као модел организму, мр Катарина Петровић-Булатовић је помоћу њих идентификовала већи број активних молекула из тестиране колекције и дошла до нових података о могућим механизмима деловања једињења са антифунгалним ефектом.

Комисија са посебним задовољством закључује да је мр Катарина Петровић-Булатовић до сада, из резултата који представљају део докторске дисертације, публиковала два рада у међународним часописима од чега је један у категорији M21a и један у категорији M22 и да је у једној публикацији први аутор.

На основу свега изложеног, комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитиван Извештај и одобри јавну одбрану ове докторске дисертације.

Београд, 20.10.2017.

Комисија:

др Бранка Вуковић-Гачић, редовни професор
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Јелена Кнежевић-Вукчевић, редовни професор
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Дејан Крњић, редовни професор
Универзитет у Београду - Факултет ветеринарске
медицине