

**Nastavno – naučnom veću
Hemijskog fakulteta
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Dekanu prof. dr. Branimiru Jovančičeviću

Na redovnoj sednici Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, održanoj 17. januara 2013. godine određeni smo u Komisiju za ocenu i odbranu doktorske disertacije Kandidata Milana B. Dragičevića, diplomiranog biohemičara, istraživača saradnika Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, pod naslovom: „**Analiza subjedinčnog sastava i regulacije izoformi glutamin-sintetaze kod biljaka *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. i *Lotus corniculatus* L.**”

Komisija je pregledala doktorsku disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću sledeći

I Z V E Š T A J

A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija Milana Dragičevića pod navedenim naslovom napisana je na 163 strane A4 formata kucanog teksta, sadrži 47 slika i 18 tabela. Disertacija obuhvata sledeća poglavlja: 1. Uvod (33 strane), 2. Cilj rada (1 strana), 3. Materijal i metode (26 strana), 4. Rezultati (35 strana), 5. Diskusija (29 strana), 6. Zaključci (1 strana), 7. Literatura (28 strana) sa 240 navoda i 8. Prilozi (9 strana). Pored navedenog, disertacija sadrži Sadržaj, Izvod na srpskom i engleskom jeziku, Zahvalnice i Biografiju autora.

U **Uvodu** Kandidat navodi značaj i uloge različitih izoformi glutamin-sintetaze (GS) u asimilaciji amonijum-jona poreklom iz različitih metaboličkih procesa u biljnoj ćeliji. Opisana je kvaternerna struktura ovog enzima, sa posebnim osvrtom na strukturu aktivnih centara. Potom su opisani mehanizmi regulacije biljne glutamin-sintetaze, od regulacije ekspresije, preko regulacije

aktivnosti i stabilnosti posttranslacionim modifikacijama. Sledi detaljan osvrt na izoforme glutamin-sintetaze kod model-biljke *A. thaliana*, gde je pored literaturnih podataka prikazano i poravnanje aminokiselinskih sekvenci različitih subjedinica sa osvrtom na uticaj razlika u primarnoj strukturi na opažene kinetičke parametre. Potom su opisane različite izoforme glutamat-sintaze (GOGAT) kod *A. thaliana*, enzima koji sa glutamin-sintetazom katališe asimilaciju amonijum-jona kod biljaka. U ovom odeljku Kandidat je opisao i povezanost puteva transdukcije signala različitih klasa fitohormona u regulaciji preuzimanja i asimilacije azota. Navedeni su i najpoznatiji inhibitori glutamin-sintetaze, sa naročitom pažnjom na analogu glutamata, fosfinotricinu, njegovoj upotrebi kao neselektivnog herbicida i mehanizmu ireverzibilne inhibicije glutamin-sintetaze. Sledi kratak opis fenomena hormoneze i različitih herbicida koji dovode do ovog fenomena, uključujući i fosfinotricin. Na kraju ovog poglavlja kandidat navodi osnovne karakteristike i značaj model biljaka *Arabidopsis thaliana* i *Lotus corniculatus* koje je koristio u istraživanju.

U odeljku **Cilj rada**, sažeto su predloženi osnovni ciljevi ove teze.

U odeljku **Materijal i metode** Kandidat je detaljno opisao sve materijale, tehnike, metode, hemikalije i reagense koje je koristio u svom radu. Kandidat je primenio široki spektar metoda i pristupa, počev od tehnike kulture biljnih tkiva *in vitro*, preko molekularno-bioloških i biohemijskih metoda, uključujući izolovanje organela, različite načine ekstrakcije i odvajanja nukleinskih kiselina i proteina, amplifikacije nukleinskih kiselina, kvantifikaciju genske ekspresije RT-qPCR-om i imunodetekciju specifičnih proteina. Treba naglasiti da je Kandidat pojedine protokole samostalno razvio i da je na originalan način kombinovao različite metode. Kandidat je, takođe, koristio i različite bioinformatičke programe, alate i baze podataka.

Poglavlje **Rezultati** podeljeno je u 8 delova i sadrži 33 slike i 2 tabele. Na početku je dat kratak osvrt na protokol ekstrakcije proteina nakon detekcije aktivnosti u nativnim gelovima, koji je Kandidat iskoristio kako bi u drugoj dimenziji SDS PAGE/western blot-om odredio molekulsku masu subjedinica koje ulaze u sastav detektovanih izoformi glutamin-sintetaze kod *A. thaliana*. Potom su predstavljeni rezultati ispitivanja ekspresije gena koji kodiraju glutamin-sintetaze u korenu, listu i kalusu. Zatim je prikazan koncentraciono zavisni uticaj tretmana različitim regulatorima rasteња (kinetin, giberelinska kiselina, abscisinska kiselina i 2,4-dihlorfenoksiacetat) na ekspresiju gena koji kodiraju glutamin-sintetaze i glutamat-sintaze u korenu i listu *A. thaliana*. Sledi prikaz selekcije T-DNK insercionih homozigota u genima koji

kodiraju glutamin-sintetaze korišćenjem *cDNA* i DNK markera. Kandidat je potom prikazao da izolovani T-DNK insercioni homozigoti ne sadrže transkripte odgovarajućih gena RT-PCR-om i qPCR-om, i utvrdio da postoje razlike u elektroforetskim profilima izoformi glutamin-sintetaze u izolovanim mutantima. U poslednjem delu ovog odeljka predstavljan je uticaj niskih koncentracija fosfinotricina na stimulaciju rasta izdanaka *L. corniculatus*, kao i interakcija ovog i strukturno sličnog inhibitora metionin-sulfoksimina sa izoformama glutamin-sintetaze iz pomenute biljke, koja je praćena EMSA (electrophoretic mobility shift assay) metodom.

Poglavlje **Diskusija** sastoji se od sedam celina, u okviru kojih Kandidat tumači dobijene rezultate i povezuje ih sa relevantnim literaturnim podacima. U ovom odeljku dat je i predlog stehiometrije subjedinica u detektovanim izoformama glutamin-sintetaze kod *A. thaliana* koji je obrazložen na osnovu razlika u zimogramima dobijenih kod različitih *knockout* mutanata, a izložene su prednosti i mane ovakvog pristupa pri određivanju subjediničnog sastava. Na osnovu interakcije fosfinotricina sa izoformama glutamin-sintetaze kod *L. corniculatus* predložen je model hormetičkog efekta fosfinotricina na biljke zvezdana na molekularnom nivou, koji je potpuno u skladu sa rezultatima i literaturnim podacima.

U odeljku **Zaključak** Kandidat je ukratko sumirao zaključke koji su proistekli iz rezultata ove doktorske disertacije.

Navedena **Literatura** obuhvata 240 radova iz oblasti istraživanja i iscrpno pokriva sve delove disertacije.

B. KRATKI OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

U okviru disertacije Milana Dragičevića ispitivan je subjedinični sastav, regulacija ekspresije i interakcija sa inhibitorom fosfinotricinom biljne glutamin-sintetaze na primerima izoformi ovog enzima kod dva model-organizma *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. и *Lotus corniculatus* L. Kako bi se ispitao subjedinični sastav izoformi glutamin-sintetaze selektovani su *knockout* mutanti u genima koji kodiraju subjedinice citosolnih izoformi ovog enzima iz heterozigotnih i homozigotnih T-DNK insercionih linija koje potiču iz SAIL i SALK biblioteka mutanata *A. thaliana*. Na osnovu izoformskih profila glutamin-sintetaza pri nativnoj

elektroforezi kod knockout mutanata, zaključeno je da GLN1;1 i GLN1;3, kao i GLN1;2 i GLN1;3 subjedinice mogu da se kombinuju u svim stehiometrijskim odnosima odgovarajućim za dekamerne enzime. Na osnovu veoma niske ekspresije GLN1;4 i GLN1;5 gena, koja je određena qPCR-om, i zbog nedostatka razlika u izoformskim profilima između knockout mutanata u ovim genima i *wt* biljaka zaključeno je da subjedinice kodirane sa ova dva gena ne ulaze u sastav detektovanih izoforni.

Pokazano je da sve ispitivane klase regulatora rasteња imaju uticaj na ekspresiju gena koji kodiraju glutamin-sintetaze i glutamat-sintaze kod *Arabidopsis*-a. Sintetički citokinin kinetin doveo je do značajne represije svih testiranih gena u korenu, na nivo od 10-30% u odnosu na netretiranu kontrolu u širokom opsegu koncentracija (10^{-7} - 10^{-5} M, u slučaju nekih gena i pri 10^{-8} M), dok na nivou lista nije imao efekata, na osnovu čega je zaključeno da ova klasa regulatora rasteња isključivo učestvuje u represiji primarne asimilacije amonijum-jona. Tretman giberelinskom kiselinom doveo je do indukcije većine ispitivanih gena u listu (100-400% u odnosu na netretiranu kontrolu) u širokom opsegu koncentracija (10^{-7} - 10^{-5} M), dok su u korenu, ali znatno manje u poređenju sa listom, indukovani geni GLN2, koji kodira hloroplastnu izoformu glutamin-sintetaze i GLT1, koji kodira NADH zavisnu izoformu glutamat-sintaze. Na osnovu ovoga zaključeno je da giberelini povećavaju kapacitet za sekundarnu asimilaciju amonijum-jona u listovima. Tretman abscisinskom kiselinom indukovao je ekspresiju pojedinih gena (GLN1;1, GLN1;3 i GLN2 glutamin-sintetaza i GLU2 glutamat-sintaze) na nivou lista i korena. Tretman sintetičkim auksinom 2,4-dihlorfenoksiacetatom doveo je do sličnih efekata kao i tretman kinetinom, tako da je zaključeno da auksini i citokinini imaju preklapajuće uloge u regulaciji primarne asimilacije amonijum-jona.

Ispitivanjem uticaja fosfinitricina na rast *L. corniculatus* izdanaka pokazano je da subtoksične doze ovog herbicida dovode do značajne stimulacije proizvodnje biomase (119% u odnosu na kontrolu, pri $12,5 \cdot 10^{-5}$ M). Pored toga pokazano je da tretman biljaka ovim herbicidom dovodi do povećanja mobilnosti izofomi glutamin-sintetaze iz *L. corniculatus*. Korišćenjem EMSA tehnike utvrđeno je da ireverzibilno vezivanje fosfinitricina u prisustvu ATP-a dovodi do povećanja mobilnosti GS izofomi. Pored toga pokazano je da se inhibitor ne vezuje ireverzibilno za sve aktivne centre na enzimu i da u opsegu koncentracija koje dovode do promena mobilnosti GS izofomi, dovodi do povećanja aktivnosti hloroplastne izoforme glutamin-sintetaze, verovatno kroz povećanje katalitičke efikasnosti neinhibiranih aktivnih

centara na enzimu, a potencijalno i kroz reasocijaciju disosovanih subjedinica u aktivne holoenzime. Pošto je praktično isti koncentracioni opseg fosfinotricina doveo do stimulacije rasta *L. corniculatus* izdanaka i do aktivacije GS2, a imajući u vidu literaturne podatke koje dovode GS2 u korelaciju sa produkcijom lisne biomase, zaključeno je da je opaženi hormetički efekat verovatno rezultat direktnog delovanja niskih koncentracija PPT-a na GS2 u prisustvu unutarćelijskog ATP-a.

C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA KANDIDATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

Zbog značaja reakcije koju katališe, za razvoj i produktivnost biljaka, glutamin-sintetaza je u fokusu istraživanja biljne biohemije i fiziologije. I pored toga postoje brojne nepoznanice vezane za ovaj enzim, o čemu svedoči i činjenica da je do pre nekoliko godina smatrano da je ovaj enzim oktamer, što je odbačeno novijim kristalografskim studijama kojima je utvrđena dekamerna struktura. O regulaciji ekspresije gena koji kodiraju izoforme ovog enzima, kao i svojstvima samih enzima, najviše se zna upravo iz eksperimenata rađenim sa izoformama poreklom iz *A. thaliana*. Međutim, i pored toga potpuno je nepoznato da li glutamin-sintetaze kod ove biljke postoje isključivo u obliku homomera ili mogu da formiraju i heteromere. Heteromerne glutamin-sintetaze su detektovane kod malog broja biljnih vrsta pri čemu su ova istraživanja rađena pre dve i više decenija. Rezultati ove doktorske disertacije aktuelizovali su ovu problematiku pokazavši prisustvo heteromernih izoformi glutamin-sintetaze na najpoznatijem biljnom model-sistemu.

Pored iscrpnih saznanja o efektima nutritivnog sastava podloge, pre svega soli azota, na ekspresiju gena koji kodiraju glutamin-sintetaze kod različitih biljnih vrsta, malo se zna o ulogama različitih klasa fitohormona u regulaciji ekspresije GS gena. Imajući u vidu savremene trendove koji pridaju sve veći značaj fitohormona u regulaciji preuzimanja i metabolizma azota kod biljaka, kao i činjenicu da regulacija ekspresije GS i GOGAT gena fitohormonima praktično nije ispitivana, rezultati o koncentraciono zavisnom uticaju biljnih regulatora rastenja na

ekspresiju ovih gena kod *A. thaliana*, dobijeni u ovoj tezi, imaju i fundamentalni i primenjeni značaj.

Pozitivni biološki efekti prouzrokovani niskim dozama tokšnih supstanci ili drugih faktora stresa, ili, preciznije, bifazni adaptivni odgovori poznati kao hormeza, pobuđuju sve veće interesovanje u medicini, toksikologiji, ekologiji i biologiji. Pokazano je da nekoliko herbicida, među kojima je i inhibitor glutamin-sintetaze fosfinitricin, pri niskim koncentracijama mogu da dovedu do stimulacije različitih parametara rasta kod biljaka. Međutim, potpuno je nepoznat način kojim do ovoga dolazi, što izaziva nepoverenje i sumnjičavost prema hormezi i sprečava potencijalnu upotrebu ovog fenomena za poboljšanje prinosa poljoprivrenih kultura. Ispitivanjem koncentraciono zavisnih efekata fosfinitricina na prirast biomase *L. corniculatus* Kandidat je pokazao da ovaj herbicid dovodi do više nego dvostruke stimulacije proizvodnje biomase u određenim subtkosičnim koncentracijama. Ovaj rezultat dobija izrazit praktičan značaj, ako se ima u vidu da je *L. corniculatus* zbog visoke hranjive vrednosti i akumulacije proantocijanidina u listovima koji poboljšavaju varenje preživara, vrlo značajan u proizvodnji stočne hrane, a zbog svoje adaptabilnosti i endosimbiotskih odnosa sa azotofiksatorima i gljivama dobar kandidat za fitoremedijaciju siromskih i kontaminiranih zemljišta. Dodatno, ispitivanjem vezivanja fosfinitricina za GS izoforme iz *L. corniculatus* pokazano je da je opažena stimulacija rasta najverovatnije rezultat delovanja fosfinitricina na hloroplastnu GS2 izoformu, što pri niskim koncentracijama inhibitora dovodi do povećanja aktivnosti ovog enzima. Na osnovu ovih rezultata predložen je prvi put u literaturi, koliko je nama poznato, mehanizam hormetičkog delovanja herbicida na molekularnom nivou.

D. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI RADOVI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Rad u istaknutom časopisu međunarodnog značaja (M22)

1. M. Dragičević, J. Platiša, R. Nikolić, S. Todorović, M. Bogdanović, A. Simonović, Herbicide Phosphinothricin Causes Direct Stimulation Hormesis. Dose-Response (2012),

DOI: 10.2203/dose-response.12-039.Simonovic (IF 1.915 za 2011, Kategorija M22, 51/116)

Rad u časopisu međunarodnog značaja (M23)

1. M. Dragičević, V. Tanacković, D. Mišić, T. Cvetić, S. Todorović, M. Bogdanović, A. Simonović, Coupling native PAGE/activity-staining with SDS-PAGE/immunodetection for the analysis of glutamine synthetase isoforms in spinach. Arch. Biol. Sci (2011) 63 (4), 965-969 (IF 0.360 za 2011, Kategorija M23, 76/85)

Saopštenje sa međunarodnog skupa, štampano u izvodu (M-34)

1. M. Dragičević, J. Platiša-Popović, A. Simonović, N. Mitić, R. Nikolić, B. Vinterhalter, The effects of Phosphinothricin on glutamine synthetase activity and mobility in *Lotus corniculatus* L., 5th Balkan Botanical Congress, Belgrade, Serbia, 7-11. September 2009. Book of abstracts, p. 119

Saopštenja sa skupa nacionalnog značaja, štampano u izvodu (M-64)

1. M. Dragičević, M. Bogdanović, S. Todorović, N. Ghalawenji, A. Simonović, D. Grubišić, Screening for glutamine synthetase knockout mutants in *Arabidopsis*, 19th symposium of the Serbian Society for Plant Physiology Banja Vrujci, Serbia, 13-15. June 2011. Book of abstracts, p. 49
2. M. Dragičević, A. Simonović, T. Cvetić, D. Grubišić, Heteromeric GS in *Arabidopsis thaliana*: new insights on an old enzyme. 18th symposium of the Serbian Society for Plant Physiology, Vršac, Serbia, 25-27. May 2009. Book of abstracts, p. 67
3. V. Tanacković, M. Dragičević, T. Cvetić, A. Simonović, Detection of novel glutamine synthetase isoforms in spinach (*Spinacia oleracea* L.), 18th symposium of the Serbian Society for Plant Physiology, Vršac, Serbia, 25-27. May 2009. Book of abstracts, p. 17

E. ZAKLJUČAK

Komisija je na osnovu pregleda doktorske disertacije kandidata Milana Dragičevića, pod naslovom „Analiza subjedinčnog sastava i regulacije izoformi glutamin -sintetaze kod biljaka *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. i *Lotus corniculatus* L.” zaključila da je ova disertacija rezultat samostalnog rada Kandidata i da je Kandidat uspešno realizovao postavljene ciljeve teze. Korišćenjem *in vitro* kulture biljaka, PCR i RT-PCR tehnika selektovao je *knockout* mutante u *GSI* genima *A. thaliana*. Poređenjem elektroforetskih profila izoformi glutamin-sintetaze različitih *knockout* mutanata utvrdio je da *GSI* subjedinice iz ove biljke mogu da se kombinuju u svim stehiometrijskim odnosima koji odgovaraju dekamernom enzimu. Upotrebom kvantitativnog PCR (qPCR) Kandidat je pokazao da različite klase biljnih regulatora rastjenja diferencijalno regulišu ekspresiju *GS* i *GOGAT* gena u listu i korenu *A. thaliana*. Primenom *in vitro* kulture biljaka *L. corniculatus* i nativne elektroforeze (EMSA) utvrdio je da je hormetički efekat herbicida fosfinitricina rezultat specifičnih interakcija sa hloroplastnom *GS2* izoformom.

Iz svega navedenog može se zaključiti da rezultati ove teze značajno doprinose razumevanju strukture, regulacije ekspresije, interakcija sa inhibitorima i fiziološke uloge biljne glutamin-sintetaze. Imajući u vidu da je najveći udeo organskog azota u biosferi proizvod asimilacije amonijum-jona tokom *GS-GOGAT* ciklusa, kao i da se manipulacijom ekspresije i aktivnosti biljne *GS* značajno može uvećati prinos poljoprivrednih kultura, dobijeni rezultati imaju fundamentalni, ali i primenjeni značaj u oblasti biohemije biljaka. Rezultati istraživanja proistekli iz ove doktorske disertacije objavljeni su u okviru dva rada štampana u međunarodnim naučnim časopisima (jedan kategorije M22 i jedan kategorije M23), jednom saopštenju na skupu međunarodnog značaja i tri saopštenja na skupovima nacionalnog značaja, štampanim u izvodu.

Na osnovu svega navedenog, Komisija sa zadovoljstvom predlaže Nastavno-naučnom veću Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, da podnetu doktorsku disertaciju **Milana Dragičevića**, diplomiranog biohemičara, pod naslovom: „**Analiza subjedinčnog sastava i regulacije izoformi glutamin-sintetaze kod biljaka *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. i *Lotus corniculatus* L.**“ prihvati i odobri njenu odbranu za sticanje akademskog zvanja doktora biohemijskih nauka

U Beogradu,
27. maja 2013.

Komisija:

dr Ana Simonović, naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”,
Univerzitet u Beogradu, mentor

dr Radivoje Prodanović, docent
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, mentor

dr Ljuba Mandić, redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Slađana Todorović, naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”,
Univerzitet u Beogradu