

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број захтева: 290/3-6-7
Датум: 24.12.2014. године

ВЕЋЕ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ
БИОТЕХНИЧКИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

**за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији
за кандидата на докторским студијама**

Молимо да, сходно члану 47. став. 5. тачка 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 162/11-пречишћени текст, 167/12 и 172/13), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији:

Кандидат **ГОРДАНА (Сава) УЗЕЛАЦ**, студент докторских студија на студијском програму Прехрамбена технологија, пријавила је докторску дисертацију под називом: «КАРАКТЕРИЗАЦИЈА БАКТЕРИОЦИНА БАКТЕРИЈА МЛЕЧНЕ КИСЕЛИНЕ И МЕХАНИЗМИ ДЕЛОВАЊА НА СЕНЗИТИВНЕ ЋЕЛИЈЕ», из научне области Прехрамбена технологија.

Универзитет је дана 17.05.2012. године, својим актом број 06-18096/5-12 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила: «КАРАКТЕРИЗАЦИЈА БАКТЕРИОЦИНА БАКТЕРИЈА МЛЕЧНЕ КИСЕЛИНЕ И МЕХАНИЗМИ ДЕЛОВАЊА НА СЕНЗИТИВНЕ ЋЕЛИЈЕ».

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 29.10.2014. године, одлуком Факултета број 290/1-8.6., у саставу:

име и презиме члана комисије, звање, научна област, установа у којој је запослен

1. др Зорица Радуловић, ванредни професор, Технолошка микробиологија, Пољопривредни факултет Универзитета у Београду,
2. др Милан Којић, научни саветник, Молекуларна генетика и генетичко инжењерство, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду,
3. др Миомир Никшић, редовни професор, Технолошка микробиологија, Пољопривредни факултет Универзитета у Београду,
4. др Јелена Лозо, ванредни професор, Биохемија и молекуларна биологија, Биолошки факултет Универзитета у Београду,
5. др Ивана Страхињић, научни саветник, Молекуларна генетика и генетичко инжењерство, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду.

Наставно-научно веће факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној 24.12.2014. године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА
Проф. др Милица Петровић

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 290/3-6.7.
Датум: 24.12.2014. године
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 38. Правилника о правилима академских студија другог и трећег степена, Наставно-научно веће Факултета на седници одржаној 24.12.2014. године, донело је

О Д Л У К У

I ПРИХВАТА СЕ извештај о позитивној оцени урађене докторске дисертације коју је поднела **ГОРДАНА УЗЕЛАЦ, дипл. инж.** и одобрава јавна одбрана дисертације по добијању сагласности од Универзитета, под насловом: **«КАРАКТЕРИЗАЦИЈА БАКТЕРИОЦИНА БАКТЕРИЈА МЛЕЧНЕ КИСЕЛИНЕ И МЕХАНИЗМИ ДЕЛОВАЊА НА СЕНЗИТИВНЕ ЋЕЛИЈЕ».**

II Универзитет је дана 15.03.2012. године, својим актом број 06-17650/6-12 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације.

III Рад кандидата у часопису међународног значаја:

G. Uzelac, M. Kojic, J. Lozo, T. Aleksandrzak-Piekarczyk, C. Gabrielsen, T. Kristensen, I.F. Nes, D.B. Dzung, L Topisirovic (2013): A Zn-dependent metallopeptidase is responsible for sensitivity to LsbB, a class II leaderless bacteriocin of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5. *Journal of Bacteriology* 195 (24), 5614-5621

**П Р Е Д С Е Д Н И К
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
Д Е К А Н**

(Проф. др Милица Петровић)

Доставити: кандидату, ментору др Зорици Радуловић, ванредном професору, Институту за прехранбену технологију и биохемију, Студентској служби и архиви.

**НАСТАВНО НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

Предмет: Оцена урађене докторске дисертације Гордане Узелац, дипл. инж.

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду бр.290/1-8.6 од 29.10. 2014. године, именована је Комисија за оцену урађене докторске дисертације дипл. инж. Гордане Узелац, под насловом **”Карактеризација бактериоцина бактерија млечне киселине и механизми деловања на сензитивне ћелије”** у саставу: др Зорица Радуловић, ванредни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Милан Којић научни саветник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, др Миомир Никшић, редовни професор, Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Јелена Лозо, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Ивана Страхињић, научни саветник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство.

На основу анализе приложене докторске дисертације подносимо следећи:

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација дипл. инж. Гордане Узелац, под насловом **”Карактеризација бактериоцина бактерија млечне киселине и механизми деловања на сензитивне ћелије”** написана је на 143 стране (проред 1,5) у оквиру којих се налази 10 табела, и 18 слика. У докторској дисертацији је цитирано 188 извора литературе. Докторска дисертација садржи: Насловну страну на српском и енглеском језику, Податке о менторима и члановима комисије, Резиме на српском и енглеском језику, Скраћенице, Садржај, Текст по поглављима, Литературу и Биографију аутора. Текст дисертације садржи следећа поглавља: Увод (стр. 1-3), Преглед литературе (стр. 4-29), Циљеви рада (стр. 30-32), Материјал и методе (стр. 33-70), Резултати (стр. 71-97), Дискусија, (стр. 98-108), Закључци (стр. 109-114) и Литература (стр. 115-137). Поред наведеног садржи: Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјаву о коришћењу.

2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДИСЕРТАЦИЈЕ

2.1. Увод

У овом поглављу докторанткиња је најпре дала опис општих карактеристика бактерија млечне киселине и антимикробних супстанци које оне синтетишу, а које су биле предмет њеног истраживања.

Докторанткиња је посебно обратила пажњу на механизме деловања бактериоцина, где је описала све до сада познате начине деловања: за бактериоцине класе I је карактеристично да се везују за липид два компонента (прекурсор синтезе ћелијског зида) чиме се спречава синтеза ћелијског зида и формирају поре које доводе до цурења ћелијског садржаја; бактериоцини класе II (као што су лактококцин А и Б и микроцин E492), везују се за компоненте манозно фосфотрансферазног система (ман-ПТС) који је одговоран за унос шећера у ћелију и тако доводе до формирања пора и цурења ћелијског садржаја. Недавно је показано да је малтоза АБЦ транспортер одговоран за сензитивност ћелија на гарвицин МЛ, као и да је УппП (UppP) протеин договоран за сензитивност ћелија на двокомпонентни бактериоцин лактококцин Г.

На крају уводног дела докторанткиња указује на велику разноврсност до сада откривених и описаних бактериоцина, као и да се из тог разлога може очекивати и велика разноврсност рецептора на површини ћелија које они користе за своје деловање. С обзиром да је ово новија научна област и да су истраживања на самом почетку истакнут је и допринос резултата њене докторске тезе на разумевање деловања бактериоцина јер је кандидаткиња открила један од четири до сада позната механизма деловања.

2.2. Преглед литературе

Ово поглавље састоји се од девет (9) подпоглавља у којима је докторанткиња описала до сада објављене резултате других аутора који су директно или индиректно везани за предмет проучавања ове докторске дисертације као и за методолошке приступе које је користила и при томе је навела 188 извора литературе. Кандидаткиња је цитирала радове страних аутора услед тога што је предмет њене тезе била једна нова тематика која није изучавана на нашим просторима.

2.2.1. Бактерије млечне киселине

У овом подпоглављу прегледа литературе, кандидаткиња је дала општи опис бактерија млечне киселине са посебним освртом на род лактокока (*Lactococcus*) пошто је предмет њеног изучавања био бактериоцин који синтетише сој *L. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5. За наведени сој који је изолован у Лабораторији за молекуларну микробиологију Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство дат је преглед литературе објављен у претходном периоду. Кандидаткиња је са посебном пажњом анализирала радове објављене на бактериоцину ЛсбБ (LsbB): локација гена, организација бактериоцинског оперона, експресија и механизми заштите.

2.2.2. Бактериоцини

На основу литературних података кандидаткиња је дала једну општу дефиницију бактериоцина која обухвата најшире оквире пептидних антимикуробних компоненти. С обзиром да бактериоцини испољавају антимикуробно деловање слично антибиотицима кандидаткиња је навела све параметре који их међусобно разликују. Поред тога наведени су литературни подаци који подржавају употребу бактериоцина као презерватива хране као и предности које их препоручују као агенсе за употребу као терапеутика било самостално или у садејству са антибиотицима.

2.2.3. Класификација бактериоцина

Кандидаткиња је кроз литературне наводе дала историјски преглед класификације бактериоцина почев од прве 1993 (Klaenhammer, 1993) до најновије где су сви до сада описани бактериоцини сврстани у две групе. Кандидаткиња је истакла предности и мене различитих класификација и посебну пажњу посветила класификацији коју су предложили Котер и сарадници (Cotter *et al.*, 2005), а коју је користила у даљем раду пошто најадекватније описује и класификују бактериоцина бактерија млечне киселине. Након тога је детаљно описала сваку групу бактериоцина почев од представника који је чине, затим структуре полипептида, да ли има посттранслационо модификоване аминокиселине, који су све гени укључени у синтезу бактериоцина, гени за имуност и механизме деловања.

2.2.4. Имуни протеини бактериоцина

У овом делу докторандкиња је кроз литературне податке о протеинима одговорним за имуност на одговарајући бактериоцин показала да су имуни протеини специфични за сваки бактериоцин (сви оперони за синтезу бактериоцина садрже и гене за синтезу протеина за имуност) или могу заштитити ћелије које синтетишу сродне бактериоцине.

2.2.5. Резистенција бактерија на бактериоцине

Настанак мутаната резистентних на бактериоцине је у директној вези са механизмима деловања бактериоцина на сензитивне ћелије. Кандидаткиња је кроз литературне наводе приказала историјски како су откривани мутанти резистентни на одређене бактериоцине, код којих врста бактерија и који су механизми били укључени у резистенцију на генетичком нивоу (почев од откривеног мутанта *L. monocytogenes* који је резистентан на мезентероцин Y105, а носи мутиран *rpoN* ген). Ова истраживања су од великог значаја у циљу предвиђања појаве резистенције на бактериоцине који се намеравају или се примењују у прехранбеној индустрији или као допуна антибиотској терапији.

2.2.6. Транспорт бактериоцина

Бактериоцини своје деловање испољавају изван ћелије и из тих разлога се морају транспортовати ван ћелије. За већину бактериоцина је показано да се транспортују преко специфичних АБЦ транспортера. На аминок крају бактериоцини најчешће носе

лидер пептид који се приликом транспорта исеца (најчешће иза дуплог глицина) и у спољашњу средину се избацују активни пептиди. Неки од бактериоцина који не поседују дупли глицин на крају лидер пептида, након кога долази до исецања се најчешће транспортују генералним системима транспорта *sec*-типа.

2.2.7. Регулација продукције бактериоцина класе I и класе II

Регулација експресије бактериоцина класе I и II је најчешће регулисана на транскрипционом нивоу и то механизмом названим "Quorum sensing". Кандидаткиња је у овом делу описала само неке најкарактеристичније примере као што су регулација синтезе низина и плантарицина.

2.2.8. Примена бактериоцина

Услед потребе да се храна сачува за дужи временски период у прехранбеној индустрији се храни додају конзерванси хемијске природе који дуготрајним уношењем могу испољити негативне ефекте на здравље људи и животиња. Из наведених разлога појавила се потреба за изналажењем молекула који могу бити ефикасни презервативи хране а да не испољавају негативне ефекте на конзументе тако да су бактериоцини постали једни од најобећавајућих кандидата. Тако су два бактериоцина већ нашла примену у конзервирању хране: низин под комерцијалним именом „Nisaplin“, а педиоцин PA1 као „ALTA2431“.

2.2.9. Најновија открића у изучавању механизма деловања бактериоцина класе II

Како је ова област истраживања заиста нова и садржи само неколико литературних података кандидаткиња их је побројала по хронолошком појављивању назначавачући за који бактериоцин су откривени механизми и који гени-протеини су укључени, међу којима се налази и рад кандидаткиње који је проистекао из ове докторске тезе, на основу чега се може видети и њен велики допринос у овој области

3. ЦИЉЕВИ РАДА

Кандидаткиња је дефинисала три главна циља докторске тезе: 1. Дефинисање новог механизма који LsbV бактериоцин користи за улазак у сензитивну ћелију; 2. Структурно-функционална анализа-дефинисање доменске структуре LsbV бактериоцина; 3. Дефинисање региона рMN5 плаزمида одговорног за регулацију експресије LsbV бактериоцина) и за сваки од циљева представила адекватну методологију која омогућује корак по корак долазак до резултата који тачно дефинишу сваки од циљева. Постављени циљеви су научно амбициозни и у сагласности са потребама за решавањем најактуелнијих проблема данашњице везаним за бактериоцине бактерија млечне киселине.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

У овом поглављу кандидаткиња је описала велики број метода које је користила током израде тезе из различитих области: методе рада на бактеријама, на протеинима, на ДНК и РНК, подељених у 17 подпоглавља.

Листом сојева бактерија, плазида, комструката и олигонуклеотида коришћених у раду започето је прво подпоглавље.

У подпоглављима везаним за рад са живим бактеријама кандидаткиња је најпре набројала медијуме који су коришћени за раст различитих сојева бактерија, затим методе које је користила за детекцију синтезе и квантификавања количине синтетисаног бактериоцина, начина припреме бактериоцинских чврстих медијума за селекцију мутаната и методе које је користила за утврђивање способности катаболизма различитих извора угљеника (Биолог и АПИ тест). Ту су такође приказане коришћене методе за припрему компетентних ћелија за трансформацију различитих сојева *E. coli*, лактокока, лактобацила и ентерокока, методе насумичне и циљане мутагенезе, трансфекција бактерија ламбда бактериофагом и мерење активности бета галактозидазе.

У подпоглављима везаним за коришћену методологију за рад са ДНК описане су коришћене методе: за изолацију тоталне и плазмидне ДНК из различитих сојева бактерија и методе њеног пречишћавања, дигестије ДНК рестрикционим ензимима, лигације ДНК фрагмената, конструкција плазмидних вектора, умножавање ДНК методом ланчане полимеризације (PCR), метода место специфиче мутагенезе гена, конструкција козмидне библиотеке, електрофорезе ДНК (класична хоризонтална и у пулсирајућем пољу), методе припреме ДНК, пренос на најлонску мембрану и Southern хибридизација са обележеним ДНК пробама, методе секвенцирања ДНК (класична по Сангеру и секвенцирање нове генерације целокупних генома).

Од метода рада са РНК наведене су: методе за изолацију укупне РНК, електрофореза у агарозном гелу и реакције реверзне транскрипције.

5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Резултати истраживања су приказани у три поглавља и већи број подпоглавља с обзиром да је кандидаткиња обрадила добијене резултате из три посебне целине: Механизам деловања LsbV бактериоцина, LsbV бактериоцин-интеракција са рецептором и регулација експресије LsbV бактериоцина.

5.1. Механизам деловања LsbV бактериоцина

Да би установила да ли LsbV бактериоцин користи исти пут за деструкцију сензитивних ћелија као и до тада познати бактериоцини класе II урађен је бактериоцински тест са произвођачем LsbV бактериоцина на *Lc. lactis* subsp. *lactis* IL1403 и на његовог man-PTS “knock-out” мутанта B464. Када је установљено да LsbV бактериоцин не користи исти механизам приступило се тражењу одговора на који начин LsbV бактериоцин интерагије са сензитивним ћелијама. Да би била сигурна да све време ради само са једним бактериоцином кандидаткиња је клонирала ген за LsbV бактериоцин и експримирала га на *Lc. lactis* subsp. *cremoris* MG7284.

Приступ који је кандидаткиња користила за откривање рецептора на мембрани сензитивних ћелија који интерагује са LsbV бактериоцином је јединствен и оригиналан тако да је неопходно нагласити да је по први пут коришћен у свету. Она је најпре

направила банку мутаната соја *Lc. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-596 (који је сензитиван на LsbB бактериоцин) користећи мутаген MNNG (*N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine). Селекцијом је изоловала два типа мутаната (BGMN1-596R2 и BGMN1-596R3) који показују различит степен резистенције на LsbB бактериоцин. Трећу категорију мутаната је изоловала као спонтане мутанте који су израсли на високим концентрацијама синтетичког LsbB бактериоцина (BGMN1-596SR). Да би била сигурна да мутанти припадају соју BGMN1-596 урадила је електрофорезу у пулсирајућем пољу, *Sma*I рестрикциони фингерпринт и показала да су сви изоловани мутанти пореклом од соја BGMN1-596.

Користећи API i Biolog тест у којима је анализирала полазни сој и мутанте BGMN1-596R2 и BGMN1-596R3 искључила је могућност да је транспортни систем за неки други шећер укључен у интеракцију са LsbB бактериоцином.

Да би пронашла у којим генима је дошло до мутација које доводе до резистенције на LsbB бактериоцин, кандидаткиња је користила два приступа: конструкција козмидне библиотеке и комплементација мутаната појединачним козмидима (овај приступ је оригиналан и по први пут коришћен у свету за млечно киселинске бактерије захваљујући томе што је у Лабораторији за молекуларну микробиологију конструисан по први пут козмидни вектор који реплицира у овим бактеријама); други приступ је комплетно секвенцирање генома полазног соја BGMN1-596 и мутаната BGMN1-596R2 и BGMN1-596R3.

Комплементацијом резистентних мутаната изолован је један козмид (pAZILcos/MN2) који враћа сензитивност у мутантима (сензитивност је доминантна у хетерозиготном стању).

Скраћивањем козмида и преклонирањем гена дошло се до гена одговорног за сензитивност ћелија на LsbB бактериоцин (*uvjB* ген).

Секвенцирањем целокупних генома установљено је да мутанти заиста носе мутације у овом гену. Након тога су умножени и секвенцирани *uvjB* гени из свих мутаната и констатовано је да различите класе мутаната имају заступљене различите типове мутација; мутанти BGMN1-596R3 и BGMN1-596SR категорија имају мутације које доводе до настанка превременог стоп кодона услед чега се не синтетише комплетан протеин док код мутаната BGMN1-596R2 класе услед тачкастих мутација настале су различите базне замене које доводе до промене аминокиселине на 188 месту у протеину, глицин прелази у серин, док је дужина протеина остала идентична (сем код једног код кога је настао стоп кодон на 414 месту).

Докторандкиња је затим направила “knock-out” мутанте *uvjB* гена сојева BGMN1-596 и IL1403 у којима је индуковала резистенцију на LsbB бактериоцин и тако потврдила на још један начин улогу *uvjB* гена у резистенцији-сензитивности на LsbB бактериоцин.

Затим је *uvjB* ген трансформисан на плазмиду у сојеве различитих врста бактерија млечне киселине који су природно резистентни на LsbB бактериоцин: *Lc. lactis* subsp. *cremoris* MG7284, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* HN14 и *E. faecalis* BGZLS10-27 (хетерологна експресија). У свим сојевима експримирани *uvjB* ген је довео до сензитивности на LsbB бактериоцин чиме је дефинитивно показана улога у сензитивности на LsbB бактериоцин.

5.2. LsbB бактериоцин-интеракција са рецептором

LsbB бактериоцин је пептид од 30 аминокиселина. Да би се утврдило који домен је одговоран за интеракцију са *YvjB* протеином синтетисани су различити олигопептиди;

делови LsbB бактериоцина: првих петнаест аминокиселина, других петнаест аминокиселина, затим по десет аминокиселина итд., који су коришћени за заштиту сензитивног соја од дејства LsbB бактериоцина. Установљено је да су последњих 8 аминокиселина одговорне за специфичну интеракцију са YvjB протеином, док су други делови укључени у неспецифичне интеракције. У експериментима заштите је показано да су аминокиселине триптофан на позицији 26 и аланин на позицији 30 кључне за специфичну интеракцију.

Да би се то потврдило у *in-vivo* експериментима урађена је место-специфична мутагенеза 6 од последњих 8 аминокиселина (преведене у аланин) и мутирани LsbB бактериоцини су експримирујући у соју MG7284. У бактериоцином тесту је недвосмислено потврђено да су кључне аминокиселине одговорне за интеракцију са YvjB протеином триптофан на позицији 26 и аланин на позицији 30.

5.3. Регулација експресије LsbB бактериоцина

Када је докторандкиња клонирала *lsbB* ген и експримирувала га у соју MG7284 уочила је да је експресија LsbB бактериоцина у бактериоцином тесту много мања него код полазног соја BGMN1-596T.

Након конструкције великог броја клонова који су садржавали различите делове pMN5 плаزمид, као и делетаната констатовано је да је регион одговоран за повећање синтезе бактериоцина лоциран низводно од *lsbB* гена. Уочено је такође да тај регион мора бити у *cis* оријентацији са *lsbB* геном. Још увек није утврђено да ли је повећање синтезе последица транскрипционе или транслационе регулације синтезе, али је већа вероватноћа да је на транслационом новоу или повећање стабилности информационе RNK.

Овде треба истаћи да је за експерименте изучавања регулације експресије конструисан по први пут плазмидни вектор (pNZ8150lacZ) за конструкцију транскрипционих фузија и за мерење промоторске активности.

6. ДИСКУСИЈА

Кандидаткиња је у овом поглављу подробно дискутовала добијене резултате и поредила их са литературним подацима других аутора. Значај сваког приступа и добијених резултата је истакнут у овом поглављу са истицањем предности приступа који су коришћени у добијању резултата ове тезе. Важно је истаћи да је адекватно дискутована и примена нових приступа у дефинисању гена-протеина одговорних за одговарајуће функције у ћелији.

Такође и поглавље ”Дискусија” у докторату је сходно концепту добијених резултата (из три различите области) подељено на три подпоглавља.

6.1. Механизам деловања LsbB бактериоцина

У овом подпоглављу је истакнута улога бактериоцина као могућих презерватива хране и алтернативе или допуне антибиотској терапији. Услед настанка резистенција наглашен је значај познавања механизма деловања бактериоцина. Пошто су до времена почетака експеримената била откривена два механизма деловања бактериоцина то је био стимулус да се истражује механизам деловања LsbB, који је јединствен бактериоцин. На основу класификације бактериоцина LsbB бактериоцин је сврстан у класу II_d. У овом

докторату је коришћен комплексан приступ откривања механизма деловања који је укључио више нових приступа у поређењу са до сада објављеним литературним подацима и недвосмислено показао на више начина који су дали идентичан резултат да је YvjB протеин укључен у интеракцију са LsbB бактериоцином. Веома су значајни резултати добијени насумичном мутагенезом јер су показали значај одрђених аминокиселина YvjB протеина у интеракцији са LsbB бактериоцином дајући различите нивое резистенције. Интересантно је да је једна протеаза M50 фамилије укључена и сензитивност ћелија. За сада није познато да ли она у тој интеракцији испољава и пептидазну активност на бактериоцин. Такође није доказано и да ли су интеракције ова два протеина директне или индиректне, али дефинитивно ова два протеина су део система интеракције која доводи до сензитивности. Које аминокиселине YvjB протеина су кључне за интеракцију могло се наслутити из мутагенезе, али упоредна анализа YvjB протеина различитих сојева природно сензитивних или резистентних на LsbB бактериоцин је показала да је највероватније више аминокиселина укључено у то јер MG7284, који је природно резистентна лактокока има глицин на позицији 188 као и сензитивне лактококе, али поседује 31 различиту аминокиселину распоређене целом дужином полипептида. Захваљујући доминантности сензитивног алела у хетрозиготном стању успешно је експримиран ген у мутантима и природно резистентним сојевима. Доминантност је сасвим логична јер екстра ген који се експримира доприноси синтези и уграђивању YvjB протеина у мембрану који има способност да интерагује са LsbB бактериоцином и доведе до сензитивности, без обзира на присутност у мембрани и резистентног YvjB протеина.

6.2. Структурно функционална анализа LsbB бактериоцина

Овај рад је први резултат везан за изучавање улоге различитих региона LsbB бактериоцина у интеракцији са YvjB протеином. Показано је да су кључне аминокиселине одговорне за специфичну интеракцију са YvjB протеином триптофан на позицији 26 и аланин на позицији 30. Анализом секвенци структурно сличних бактериоцина EntQ, EJ97 and WP_002339170.1, показано је да и они имају исте аминокиселине на кључним позицијама и користе исте механизме интеракције са YvjB протеином.

6.3. Регулација експресије LsbB бактериоцина

На основу добијених резултата докторандкиња је закључила да за повећање експресије није одговоран експримиран *lsbA* ген како се претходно тврдило. За повећање активности одговоран је регион непосредно лоциран низводно од *lsbB* гена и анализирајући литературне податке установљено је да је овај начин регулације другачији од оне која је присутна код других бактериоцина.

7. ЗАКЉУЧЦИ

На основу анализе добијених резултата кандидаткиња је извела закључке на основу којих је утврђено да су остварени циљеви и потврђене хипотезе докторске дисертације. На основу добијених резултата ауторка закључује да LsbB бактериоцин не користи за своју активност на сензитивне ћелије ман-ПТС транспортер због тога што исказује подједнаку активност на сој IL1403 и на његовог ман-ПТС “knock-out” мутанта B464.

На основу API и Biolog теста може се закључити да не користи ни транспортере за друге шећере.

Мутагенезом добијени мутанти који су показали различиту резистенцију на произвођаче бактериоцина су комплементирани истим козмидом указујући да су мутанти у истом гену.

Козмид pAZILcos/MN2 односно *uvjB* ген враћа сензитивност у мутантима на LsbB бактериоцин.

“Knock-out” мутанти *uvjB* гена у сојевима BGMN1-596 и IL1403 су резистентни на LsbB бактериоцин.

Секвенцирање код свих мутаната соја у потпуности објашњава разлике у нивоу резистенције на LsbB бактериоцин (мутанти BGMN1-596R3 и BGMN1-596SR категорија имају мутације које доводе до настанка превременог стоп кодона услед чега се не синтетише комплетан протеин док код мутаната BGMN1-596R2 класе услед тачкастих мутација настале су различите базне замене које доводе до промене аминокиселине на 188 месту у протеину; глицин је прешао у серин).

Мутанти BGMN1-596R3 и BGMN1-596SR категорија показују висок ниво резистенције на (више од 1 mg/ml), мутанти BGMN1-596R2 категорије су резистентни на 62,5 µg/ml, док је полазни сој сензитиван већ на 125 ng/ml LsbB бактериоцина.

Последњих 8 аминокиселина LsbB бактериоцина су одговорне за специфичну реакцију са YvjB протеином.

Кључне аминокиселине у LsbB бактериоцину одговорне за специфичну интеракцију са YvjB протеином су триптофан на позицији 26 и аланин на позицији 30.

lsbA ген није одговоран за синтезу бактериоцина LsbA, а ни за регулацију експресије LsbB бактериоцина.

За повећану активност LsbB бактериоцина одговоран је регион непосредно лоциран низводно од *lsbB* гена и мора бити у *cis* оријентацији са *lsbB* геном.

8. ЛИТЕРАТУРА

У регистру литературе наведена су 188 извора, претежно страних аутора (178), а од домаћих аутора само 10 радова. Списак литературе је адекватан, актуелан и довољно широк да покрива сва поља истраживања и разматрана питања. Навођења литературе су јасна и примерена како по садржају тако и по месту.

9. ЗАКЉУЧАК КОМИСИЈЕ И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација Гордане Узелац, дипл. инж. под насловом ”Карактеризација бактериоцина бактерија млечне киселине и механизми деловања на сензитивне ћелије” представља оригиналан научни рад чији резултати имају фундаментални а и практични значај у области изучавања интеракције бактериоцина и рецептора на мембрани сензитивних ћелија. Тема докторске дисертације је изузетно актуелна, можемо рећи да је кандидаткиња један од пионира у датој области. На самом почетку кандидаткиња је систематски проучила доступне резултате других аутора, добро дефинисала предмет и програм истраживања, поставила исправне циљеве, затим је одабрала адекватну методологију за остварење задатих циљева где су уведени по први пут у свету нови приступи решавању постављених задатака.

Добијени резултати представљају трећи по реду у свету откривени рецептор за бактериоцине што је резултат светског значаја с обзиром на актуелност и применљивост како резултата тако и коршћене методологије у будућим истраживањима. Актуелност резултата ове тезе је потврђена квалитетом часописа у којима су публиковани (два рада у часопису М21 категорије) и цитираношћу радова. Истраживања приказана у овој докторској дисертацији су урађена у сагласности са планом и програмом који је предложен у Пријави докторске дисертације. На основу свега изнетог у овом извештају, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију Гордане Узелац, дипл. инж. под насловом ”Карактеризација бактериоцина бактерија млечне киселине и механизми деловања на сензитивне ћелије” и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену и омогући кандидату јавну одбрану.

Чланови Комисије:

др Зорица Радуловић, ванредни професор (Технолошка
микробиологија)
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

др Милан Којић, научни саветник (Молекуларна генетика и
генетичко инжењерство)
Институт за молекуларну генетику и генетичко
инжењерство, Универзитет у Београду

др Миомир Никшић, редовни професор (Технолошка
микробиологија)
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

др Јелена Лозо, ванредни професор (Биохемија и
молекуларна биологија)
Универзитет у Београду, Биолошки факултет

др Ивана Страхинић, научни саветник (Молекуларна
генетика и генетичко инжењерство)
Институт за молекуларну генетику и генетичко
инжењерство, Универзитет у Београду

Радови објављени у научним часописима са ISI листе који су директно проистекли из докторске дисертације Гордане Узелац, под насловом ”Карактеризација бактериоцина бактерија млечне киселине и механизми деловања на сензитивне ћелије”.

G. Uzelac, M. Kojic, J. Lozo, T. Aleksandrak-Piekarczyk, C. Gabrielsen, T. Kristensen, I.F. Nes, D.B. Dzung, L Topisirovic (2013): A Zn-dependent metalloproteinase is responsible for sensitivity to LsbB, a class II leaderless bacteriocin of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5. *Journal of Bacteriology* 195 (24), 5614-5621

K.V. Ovchinnikov, P.E. Kristiansen, **G. Uzelac**, Lj. Topisirovic, M. Kojic, J. Nissen-Meyer, I.F. Nes, D.B. Diep (2014): Defining the structure and receptor binding domain of the leaderless bacteriocin LsbB. *Journal of Biological Chemistry* 289 (34), 23838-23845.