

Univerzitet u Beogradu-Hemijski fakultet

Nastavno-naučno veće

Predmet: Izveštaj Komisije za pregled i ocenu doktorske disertacije Tatjane Tripković,
diplomiranog hemičara - mastera

Na redovnoj sednici Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, održanoj 08. decembra 2016. godine, određeni smo za članove Komisije za pregled i ocenu doktorske disertacije Tatjane Tripković, diplomiranog hemičara - mastera, prijavljene pod nazivom:

„Analiza proteinskih veziva u umetničkim delima metodama masene spektrometrije”

Pošto smo podnetu disertaciju pregledali podnosimo sledeći:

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja disertacije

Doktorska disertacija Tatjane M. Tripković, diplomiranog hemičara - mastera, napisana je na 155 strana A4 formata (prored 1,5) i obuhvata sledeća poglavlja: Izvod (2 strane), Abstrakt (2 strane), Uvod (3 strane), Opšti deo (67 strana), Eksperimentalni deo (16 strana), Rezultati i diskusija (41 strana), Zaključak (4 strane), Literatura (23 strane i 369 literaturnih podataka). Rad je ilustrovan sa 24 slike i 11 tabela. Rad sadrži dva priloga u kojima su dati kompletni

eksperimentalni podaci. Pored navedenog rad sadrži i sadržaj, posvetu, zahvalnicu i biografiju kandidata sa listom radova i saopštenja.

U **Uvodu** kandidat navodi značaj metoda masene spektrometrije i bioinformatike u analizi proteina, kao i značaj identifikacije proteina u umetničkim delima. Kao naučni cilj istraživanja postavlja se razvijanje analitičkog postupka za identifikaciju proteinskih veziva u slikama, analizom peptida, dobijenih hidrolizom tripsinom, metodama masene spektrometrije. Posebna pažnja posvećena je primeni MALDI-TOF masene spektrometrije uz podršku MALDI-TOF/TOF (LIFT metoda) kao i ESI tandem masene spektrometrije na LTQ-Orbitrap instrumentu za određivanja masa peptida uz veliku preciznost. Naglašeno je da su ove dve tehnike masene spektrometrije tokom izrade doktorske disertacije po prvi put primenjene za analizu uzoraka kulturnog nasleđa. Takođe, kao jedan od važnih segmenata ove disertacije istaknuta je primena savremenih bioinformatičkih alata za identifikaciju peptida i proteina u uzorcima umetničkih dela na osnovu snimljenih PMF spektara (otisak prsta masa peptida) i tandem masenih spektara.

U okviru poglavlja **Opšti deo** kandidat navodi vrste proteina koji se mogu naći u uzorcima kulturnog nasleđa i njihovo poreklo, pri čemu ukazuje i na njihove najvažnije fizičke i hemijske osobine. Opisane su promene do kojih dolazi tokom starenja veziva u ovoj vrsti uzoraka, kao što su denaturacija, promena rastvorljivosti, interakcije sa drugim komponentama bojenog sloja i mikrobiološka degradacija. Navedeni su glavni problemi koji se javljaju prilikom identifikacije proteinskih veziva u umetničkim predmetima. Identifikacija proteina prisutnih u nekom umetničkom delu naglašena je kao veoma bitna, jer omogućava uvid u tehniku rada umetnika i dizajniranje adekvatnog postupka konzervacije dela. Dat je pregled literature koja se odnosi na primenu različitih analitičkih tehnika u identifikaciji proteinskih veziva u uzorcima kulturnih dobara. Poseban akcenat stavljen je na analizu proteina metodama masene spektrometrije i objašnjeni su opšti principi i pojmovi na kojima se zasniva proteomika. Takođe su opisana dva pristupa identifikaciji proteina, na osnovu mapiranja masa peptida i tandem masene spektrometrije, kao i bioinformatički alati koji se koriste. Opisane su tehnike masene spektrometrije korišćene prilikom eksperimentalnog rada, MALDI-TOF/TOF i LC-ESI-MS/MS na LTQ-Orbitrap analizatoru uz objašnjenje MALDI i ESI tehnika jonizacije peptida. Na kraju je dat pregled literature koja opisuje primenu proteomike u identifikaciji proteinskih veziva prisutnih u umetničkim i arheološkim predmetima sa posebnim osvrtom na primenu PMF i tandem masene spektrometrije.

U **Eksperimentalnom delu** kandidat navodi postupke pripreme i analize različitih uzoraka proteinskih veziva. Dat je i opis uzoraka ikona analiziranih u ovom radu sa kratkim osvrtom na umetničko-istorijski značaj i poreklo. Detaljno su navedeni parametri podešavanja MALDI-TOF/TOF i LC-ESI-LTQ-Orbitrap instrumenata tokom snimanja spektara, kao i bioinformatički alati i parametri primenjeni tokom obrade spektara i pretrage baza podataka.

U poglavlju **Rezultati i diskusija** prikazani su rezultati do kojih je kandidat došao na osnovu snimljenih MALDI-TOF/TOF i LC-ESI-MS/MS spektara. Rezultati su diskutovani uz poređenje sa postojećom naučnom literaturom koja se bavi sličnom problematikom. Ispitivanjem referentnih materijala prikupljene su iscrpne informacije o proteinima u pojedinim vrstama veziva koji se mogu očekivati u uzorcima umetničkih dela, sekvencama njihovih peptida, peptidnim markerima i najčešćim posttranslacionim modifikacijama. Uticaj pigmenata i pojednostavljenog postupka pripreme uzoraka na identifikaciju proteinskih veziva procenjen je na osnovu analize model uzoraka koji su pripremljeni od proučavanih referentnih proteinskih veziva i pigmenata cink-oksida i gvožđe(III)-oksida. Uspešnost identifikacije proteina u model uzorcima ocenjena je na osnovu postignutih MOWSE skorova i broja identifikovanih peptida u pojedinačnim proteinima. Rezultati dobijeni pomoću MALDI-TOF MS, ukazuju da je uspešnost identifikacije proteina pomoću tandem masene spektroskopije znatno bolja u odnosu na PMF pristup. Primena pojednostavljenog tretman pripreme uzoraka, radi sprečavanja gubitka analita, nema uticaja na krajnji ishod analize. Uticaj pigmenata na identifikaciju proteina je različit. Kod nekih proteina prisustvo pigmenata nema uticaja, dok je kod drugih primetno smanjenje broja identifikovanih peptida. Analizom uzoraka sa ikona srpskih umetnika XIX veka kombinovanim pristupom, primenom istog postupka pripreme kao kod model uzoraka, utvrđeno je prisustvo kolagena u svim uzorcima. Na osnovu dobijenih rezultata izveden je zaključak da je PMF pristup manje uspešan ukoliko se primeni na uzorcima u kojima su proteini veoma degradirani ili se nalaze u kompleksnim smešama, jer identifikacija proteina može izostati ili biti pogrešna. U velikom broju identifikovanih peptida utvrđeno je prisustvo posttranslacionih modifikacija.

U drugom delu ovog poglavlja dati su rezultati analize proteinskih veziva primenom LC-ESI-Orbitrap masenog spektrometra visoke rezolucije kojim su m/z vrednosti merene sa preciznošću od ± 2 ppm. Analizom referentnih materijala identifikovan je znatno veći broj peptida i proteina, uz više MOWSE skorove, u odnosu na rezultate dobijene pomoću MALDI-TOF MS. Na osnovu rezultata dobijenih za model uzorke zaključeno je da ispitivani pigmenti imaju negativan uticaj na skorove većine proteina u model uzorcima, ali da je identifikacija

proteina ipak moguća. Analizom istih uzoraka ikona kao u prvom delu, potvrđeno je prisustvo kolagena u svim uzorcima, najverovatnije iz slikarske podloge, ali je u dva uzorka dokazano i prisustvo proteina žumanceta, vitelogenina-2 i apovitelena-1, na osnovu čega je zaključeno da je tehnika slikanja jajčana tempera.

U poslednjem delu ovog poglavlja dato je poređenje rezultata dobijenih primenom dve tehnike masene spektrometrije i ukazano je na komplementarnost dva seta podataka usled različitog načina jonizacije, kriterijuma snimanja podataka i procesa fragmentacije tokom ESI-MS/MS i MALDI-MS/MS eksperimenata.

U **Zaključku** je ukratko dat prikaz dobijenih rezultata. Zaključeno je da su se oba pristupa pokazala uspešnim u identifikaciji proteina u umetničkim delima i naglašene su prednosti i mane obe metode. Navedena je mogućnost primene razvijene metodologije na različitim uzorcima kulturnog nasleđa, kao i mogućnosti za njeno dalje unapređenje.

U **Prilogu** su dati kompletni eksperimentalni podaci dobijeni u okviru istraživanja opisanih u poglavlju Rezultati.

B. Kratak opis postignutih rezultata

U okviru ove doktorske disertacije razvijena je metodologija za analizu proteina u uzorcima kulturnog nasleđa, zasnovana na primeni masene spektrometrije i bioinformatike. Predloženi postupak je jednostavan i ne zahteva celovitost molekula proteina radi pouzdane identifikacije. Hidrolizom tripsinom može se ekstrahovati samo nekoliko peptida iz materijala, a njihova identifikacija na osnovu tandem masenih spektara dovoljna je za nedvosmisleni identifikaciju proteina od kojih potiču. Međutim, kompleksnost ove vrste uzoraka ozbiljno ugrožava dobijanje jasnih rezultata primenom MALDI-TOF MS i PMF pristupa, pa se tandem masena spektrometrija pokazala nezaobilaznom prilikom analize degradiranih i kompleksnih uzoraka umetničkih dela. U svim analiziranim uzorcima bojenog sloja pravoslavnih ikona, kombinacijom PMF pristupa i TOF/PSD eksperimenata, uprkos niskim koncentracijama proteinskih materijala, degradaciji proteina i prisustvu pigmenata, uspešno su identifikovana veziva na bazi kolagena, na osnovu nekoliko peptida iz različitih lanaca kolagena. Na osnovu toga, izveden je zaključak da uzorci sadrže tutkalo, najverovatnije u sloju podloge, ali precizno poreklo kolagena nije moglo biti određeno. Kao glavni uzroci koji sprečavaju određivanje biološkog porekla kolagena navedeni su nedovoljna sekvenciranost životinjskih kolagena i ekstenzivna homologija koja postoji među kolagenima sisara.

Rezultati istraživanja predstavljeni u prvom delu ove disertacije demonstrirali su mogućnost identifikacije proteina prisutnih u umetničkim delima primenom metoda proteomike i MALDI-TOF/TOF masene spektrometrije. Na osnovu TOF/TOF eksperimenata uočena je razlika između rezultata dobijenih PMF pristupom i tandem masenom spektrometrijom. Pokazano je da se uz pomoć specifične fragmentacije peptida, na osnovu samo nekoliko sekvenci degradiranog proteinskog veziva, može uspešno identifikovati protein, što nije moguće PMF pristupom koji zahteva znatno veći broj peptida.

U drugom delu ove doktorske disertacije za analizu proteina u uzorcima kulturnog nasleđa primenjen je ESI-LTQ-Orbitrap XL, maseni spektrometar visoke rezolucije. Analizom istog seta istorijskih uzoraka, zajedno sa referentnim materijalima i model uzorcima dobijene su detaljnije informacije o proteinima prisutnim u uzorcima. U poređenju sa rezultatima MALDI-TOF masene spektrometrije, identifikovan je znatno veći broj proteina, sa višim skorovima proteina i pojedinačnih jona i uz bolju pokrivenost sekvenci proteina. U uzorcima ikona, potvrđeno je prisustvo kolagenskih materijala, uz mnogo više informacija. Rezultati su ukazali na goveđi kolagen kao vezivo u sloju podloge. Najvažniji rezultat svakako je detekcija dva proteina žumanceta, vitelogenina-2 i apovitelenina-1, u bojenom sloju dva uzorka ikona primenom tečno-masene hromatografije i LTQ-Orbitrap analizatora. To ukazuje na jajčanu temperu kao tehniku slikanja. Pokazano je da hromatografsko razdvajanje peptida pre ulaska u maseni spektrometar i određivanje mase prekursor jona sa preciznošću od ± 2 ppm olakšavaju identifikaciju degradiranih proteina prisutnih u veoma niskim koncentracijama.

Značajan segment ove disertacije svakako je i poređenje rezultata dobijenih primenom dve različite tehnike masene spektrometrije na istim setovima uzoraka. Primenom obe tehnike identifikovan je ukupno veći broj proteina i peptida u odnosu na svaku od tehnika pojedinačno.

C. Uporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature

Proteini su prisutni u različitim uzorcima kulturnog nasleđa, od slika i polihromnih skulptura, preko arheoloških i paleontoloških nalaza do antičkih i srednjovekovnih maltera. Veliki broj radova bavi se analizom organskih jedinjenja u uzorcima kulturnog nasleđa spektroskopskim metodama, ali rezultati ovih analiza nisu dovoljno specifični da bi omogućili identifikaciju pojedinačnih proteina. Analizom aminokiselina često nije moguće sa sigurnošću utvrditi vrstu proteinskog veziva. Masena spektrometrija postala je vodeća analitička tehnika

za analizu umetničkih dela, zahvaljujući kombinaciji visoke preciznosti, osetljivosti i specifičnosti. Od 2000. godine sve je više radova koji se oslanjaju na primenu masene spektrometrije i metoda proteomike u identifikaciji proteina u ovim uzorcima. U ovoj disertaciji protokoli koji se primenjuju za analizu bioloških uzoraka prilagođeni su i optimizovani za novu primenu, kako bi se uzela u obzir mala količina proteina u uzorcima kulturnog nasleđa, njihova kompleksnost i stepen degradiranosti. U literaturi se može naći izvestan broj radova koji se bave identifikacijom proteinskih veziva u različitim tipovima uzoraka kulturnog nasleđa primenom PMF pristupa i MALDI-TOF masene spektrometrije. Unapređenja pristupa uključuju formiranje baze PMF spektara proteinskih veziva i primenu hemometrijskih metoda za analizu podataka dobijenih PMF analizama. Neki od radova fokusirani su na razumevanje procesa degradacije proteina i njihovih interakcija sa pigmentima. Razrađeni su i postupci za istovremeno određivanje proteina i lipida u istom uzorku umetničkog dela. PMF pristup je primenjivan i kao komplementarna metodologija drugim tehnikama, poput optičke mikroskopije, SEM-EDX, mikro-Raman spektroskopije, GC-MS, ELISA i bojenja poprečnog preseka.

Tandem masena spektrometrija se u objavljenim istraživanjima nametnula kao alternativa PMF pristupu, jer pruža uvid u strukturne informacije i omogućava precizno određivanje sekvence aminokiselina u peptidima, kao i njihovih modifikacija. Na ovaj način moguće je identifikovati protein na osnovu sekvenci nekoliko peptida. Tandem masena spektrometrija u ovoj oblasti gotovo uvek se primenjuje u kombinaciji sa HPLC ili nanoLC hromatografijom. U literaturi postoji i veći broj radova u kojima je proteomika adaptirana za proučavanje proteina u fosilima i različitim arheološkim uzorcima, a primenjeni su i *top-down* eksperimenti.

Ne postoje navodi iz literature da je MALDI-TOF/TOF masena spektrometrija do sada primenjivana za analizu proteinskih veziva u umetničkim delima, već primena tandem masene spektrometrije u analizi proteina podrazumeva primenu tačne hromatografije kuplovane sa jednim ili više masenih analizatora. U literaturi takođe nema podataka o primeni tačne hromatografije u kombinaciji sa LTQ-Orbitrap visoko rezolutivnim analizatorom masa za analizu proteinskih veziva u uzorcima kulturnog nasleđa.

D. Objavljeni radovi koji čine deo disertacije

Radovi objavljeni u vrhunskim časopisima međunarodnog značaja (M 21)

Tatjana Tripković, Claude Charvy, Sandra Alves, Aleksandar Lolić, Rada Baošić, Snežana Nikolić-Mandić, Jean-Claude Tabet, *Identification of protein binders in artworks by MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry*, *Talanta* **113** (2013) 49-61, DOI: 10.1016/j.talanta.2013.03.071

Radovi objavljeni u vodećim časopisima međunarodnog značaja (M 23)

Tatjana Tripković, Claude Charvy, Sandra Alves, Aleksandar Lolić, Rada Baošić, Snežana Nikolić-Mandić, Jean-Claude Tabet, *ESI-LTQ-Orbitrap in analysis of old tempera paintings: Application to 19th century Orthodox icons*, *European Journal of Mass Spectrometry* **21(4)** (2015). 679 – 692, DOI: 10.1255/ejms.1346

Saopštenja na naučnim skupovima međunarodnog značaja (M34)

Tatjana Tripković, Claude Charvy, Sandra Alves, Aleksandar Lolić, Rada Baošić, Snežana Nikolić-Mandić, *Identification of protein binders in artist's paintings by matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*, EUROanalysis 16, Belgrade, September 11-15 2011, Book of Abstracts, Session B, AH14

E. Zaključak

Na osnovu detaljnog pregleda doktorske disertacije Tatjane Tripković pod naslovom „Analiza proteinskih veziva u umetničkim delima metodama masene spektrometrije“ Komisija je zaključila da je ova disertacija rezultat samostalnog rada kandidata i da je kandidat uspešno odgovorio na sve postavljene zadatke i ciljeve.

Rezultati istraživanja proistekli iz ove disertacije objavljeni su u okviru dva naučna rada štampana u međunarodnim naučnim časopisima (jedan kategorije M21 i jedan kategorije M23) i jednog saopštenja štampanog u izvodu na skupu međunarodnog značaja (M34).

Komisija smatra da rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju značajan naučni doprinos u oblasti analitičke hemije i otvaraju nove mogućnosti za unapređenje razvijene metodologije i praktičnu primenu na drugim tipovima uzoraka kulturnog nasleđa.

Na osnovu svega izloženog Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, da podnetu doktorsku disertaciju doktoranda Tatjane Tripković, diplomiranog hemičara-mastera, pod naslovom „Analiza proteinskih veziva u umetničkim delima metodama masene spektrometrije ” prihvati i odobri njenu odbranu.

U Beogradu, 13. februara 2017. godine

Komisija:

dr Snežana Nikolić-Mandić, redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Rada Baošić, vanredni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Ivanka Karadžić, redovni profesor
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Danijela Apostolović, naučni saradnik
Department of Medicine Solna, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

Prilog

Biografija kandidata

Tatjana Tripković je rođena 20. jula 1974. godine u Kraljevu, Republika Srbija, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 1993. godine. Diplomirala je 1999. godine sa prosečnom ocenom 7,80 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Poslediplomske studije na Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu upisala je 2008. godine. Master tezu pod naslovom “Određivanje sadržaja metala u pigmentima elektrotermalnom tehnikom atomske apsorpcije” odbranila je 14. septembra 2010.godine i tako stekla zvanje mastera hemijskih nauka sa ukupnom prosečnom ocenom 8,06.

Od aprila 2005. godine je zaposlena u Republičkom zavodu za zaštitu spomenika kulture – Beograd, prvo kao stručni saradnik, a od maja 2014. godine u zvanju savetnika. Pre toga, radila je u Specijalističkom veterinarskom institutu u Kraljevu i MOL, d.o.o. u Beogradu.

Provela je letnji semestar školske 2010/2011. godine u Laboratoriji za strukturnu organsku hemiju i biohemiju Univerziteta Pjer i Marija Kiri u Parizu (Laboratoire de Chimie Biologique Organique et Structurale, Institut Parisien de Chimie Moléculaire UPMC Paris Universitas; UMR-CNRS 7201) gde se bavila primenom masene spektrometrije u analizi proteinskih veziva u umetničkim delima.

Pohađala je, između ostalog, Četvrtu Internacionalnu školu masene spektrometrije na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu, od 25-29. januara 2010. godine. kao i Petu Internacionalnu školu masene spektrometrije koja je održana od 5-9. jula 2010. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu.

Tatjana Tripković je koautor 6 naučnih radova objavljenih u međunarodnim časopisima i 3 naučna saopštenja na međunarodnim konferencijama štampanim u izvodu.

Bibliografija kandidata

Radovi u časopisima međunarodnog značaja:

1. **Tatjana Tripković**, Claude Charvy, Sandra Alves, Aleksandar Lolić, Rada Baošić, Snežana Nikolić-Mandić, Jean-Claude Tabet, ESI-LTQ-Orbitrap in analysis of old tempera paintings: Application to 19th century Orthodox icons, *European Journal of Mass Spectrometry*, **21(4)** (2015). 679 – 692, DOI: 10.1255/ejms.1346 (M23)
2. Vesna Dragutinović, Svetislav Tatić, Snežana Nikolić-Mandić, **Tatjana Tripković**, Duško Dunderović, Ivan Paunović, Copper as Ancillary Diagnostic Tool in Preoperative Evaluation of Possible Papillary Thyroid Carcinoma in Patients with Benign Thyroid Disease, *Biological Trace Element Research* **160(3)** (2014) 311-15; DOI: 10.1007/s12011-014-0071-z (M23)
3. **Tatjana Tripković**, Claude Charvy, Sandra Alves, Aleksandar Lolić, Rada Baošić, Snežana Nikolić-Mandić, Jean-Claude Tabet, Identification of protein binders in artworks by MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry, *Talanta* **113** (2013) 49-61, DOI: 10.1016/j.talanta.2013.03.071 (M21)
4. Najat Aburas, Aleksandar Lolić, Nikola Stevanović, **Tatjana Tripković**, Snežana Nikolić-Mandić, Rada Baošić, Electrochemical behavior and antioxidant activity of tetradentate Schiff bases and their copper(II) complexes, *Journal of the Iranian Chemical Society*, **9(6)** (2012) 859-64, DOI: 10.1007/s13738-012-0102-7 (M22)
5. Aleksandar Lolić, **Tatjana Tripković**, Rada Baošić, Snežana Nikolić-Mandić, Bojana Stanimirović, Development of a flow injection method with amperometric detection for the indirect determination of copper in drinking water samples, *Journal of the Serbian Chemical Society* **77(11)** (2012) 1641-47, DOI: 10.2298/JSC120616090L (M23)
6. Rada Baošić, Ana Radojević, **Tatjana Tripković**, Najat Aburas, Živoslav Tešić, RP-TLC Quantitative Retention-Property Relationships Studies of Some Schiff Base Ligands and Their Complexes, *Chromatographia* **72** (2010) 545-49, DOI:10.1365/s10337-010-1664-0 (M23)

Saopštenja:

1. **Tatjana Tripković**, Snežana Nikolić-Mandić, Predrag Polić, Aleksandar Lolić, Determination of the heavy metals (Zn, Pb and Cd) in soil, plant material and river water samples by FAAS, 2nd International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries, Halkidiki, Greece, June 6-9 2000, Abstracts, Vol. I, PO072 (M34)
2. **Tatjana Tripković**, Claude Charvy, Sandra Alves, Aleksandar Lolić, Rada Baošić, Snežana Nikolić-Mandić, Identification of protein binders in artist's paints by matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, EUROanalysis 16, Belgrade, September 11-15 2011, Book of Abstracts, Session B, AH14 (M34)
3. Aleksandar Vatazević, **Tatjana Tripković**, Aleksandar Lolić, Snežana Nikolić-Mandić, Minja Savić, Chemical analysis of mortars from the archaeological site Felix Romuliana in Eastern Serbia, 8th Aegean Analytical Chemistry Days, Izmir, Turkey, 16-20 September 2012, P3-09 (M34)