

NAUČNO-NASTAVNOM VEĆU
HEMIJSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Predmet: Izveštaj Komisije za pregled i ocenu doktorske disertacije Tanje M. Bulat, diplomiranog biologa

Na redovnoj sednici Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, održanoj 9. februara 2017. godine, određeni smo za članove Komisije za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije Tanje M. Bulat, diplomiranog biologija, pod naslovom:

Engelski jezik:

"Functional Proteomics of *Arion vulgaris* and *Drosophila melanogaster* Organisms by Mass Spectrometry Approach"

Srpski jezik:

"Primena masene spektrometrije u oblasti funkcionalne proteomike na primeru *Arion vulgaris* i *Drosophila melanogaster*"

Nakon pregledane doktorske disertacije, podnosimo Veću sledeći

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja disertacije

Doktorska disertacija Tanje M. Bulat pod navedenim naslovom napisana je na 202 strane formata A4 (prored 1,5), sadrži 38 slika (od toga 1 u Prilogu) i 13 tabela (od toga 3 u Prilogu). Rad obuhvata sledeća poglavlja: 1. Uvod (26 strana), 2. Ciljevi rada (1 strana), 3. Objavljeni radovi (1 strana), 4. Rezultati i diskusija (39 strana), 5. Zaključak (3 strane), 6. Eksperimentalni

deo (18 strana), 8. Literatura (15 strana, 275 citata), 9. Prilog (98 strana). Pored navedenog doktorska disertacija sadži i Zahvalnicu (1 strana), Apstrakt na srpskom i engleskom jeziku (po 2 strane), Listu skraćenica (1 strana), Sadržaj (2 strane), Listu figura (2 strane), Listu tabela (2 strane) i dva objavljena rada u prilogu.

U **Uvodu (Introduction)** prikazan je predmet istraživanja. Predstavljene su različite metode za pripremu uzoraka za analizu proteina masenom spektrometrijom kombinovanom sa tečnom hromatografijom na reverznoj fazi. Posebna pažnja je posvećena postupcima uklanjanja polisaharida iz uzoraka za analizu, kao i na izolovanje i rastvaranje membranskih i transmembranskih proteina. Uvod sadrži i detaljan opis principa digestije proteina enzimima, razdvajanje peptida tečnom hromatografijom na reverznim fazama, kao i metodologiju na kojoj se zasniva analiza proteina masenom spektrometrijom.

Kroz pregled literature istaknuta je važnost analize transkriptoma u različitim biološkim i biohemijskim istraživanjima, sa osvrtom na njihov značaj kod istraživanja na različitim model sistemima. Takođe je istaknut značaj analize transkriptoma u istraživanjima na organizmima čiji genom nije sekvenciran i koji ne spadaju u model sisteme.

Dalje u uvodu opisana je filogenija i morfologija vrste puža *Arion vulgaris* čiji je plašt korišćen za analizu proteinskog profila. Pored fundamentalnog istaknut je i primenjen značaj ove analize, s obzirom na to da ova vrsta pored ekološkog predstavlja i zdravstveni problem. Prema literaturnim navodima puž *Arion vulgaris* je vektor za transfer patogenih bakterija, kao što su *Clostridium botulinum* i *Listeria monocytogenes*.

Na samom kraju uvoda naveden je značaj masene spektrometrije pri detekciji i analizi membranskih i transmembranskih proteina glave model sistema *Drosophila melanogaster*.

U delu **Ciljevi rada (Aims of the study)** definisana su tri glavna cilja kojima se bavi ova doktorska disertacija, dok su u delu **Objavljeni radovi (Published papers)** navedeni radovi koji su proistekli iz ove doktorske disertacije.

Deo teze pod nazivom **Rezultati i diskusija (Results and discussion)** je podeljen na tri glavne celine: i) transkriptom puža *A. vulgaris*, ii) proteom plašta puža *A. vulgaris* i iii) membranski i transmembranski proteini glava vrste *Drosophila melanogaster*. U prvoj celini detaljno su opisani rezultati dobijeni analizom informacione RNK (iRNK). Nadalje je

diskutovana povezanost dobijenih rezultata sa podacima iz literature, sličnosti i razlike sa postojećim bazama podataka. Upotrebom bioinformatičkih softvera analizirane su protein-kodirajuće sekvencije i prikazana je zastupljenost proteina u odnosu na biološke procese, molekulsku funkciju i distribuciju u ćelijskim strukturama. Na samom kraju ovog odeljka prodiskutovani su najzastupljniji proteinski domeni koji su detektovani na osnovu rezultata transkriptoma.

U drugom delu odeljka **Rezultati i diskusija**, prikazana je detaljna analiza rezultata indentifikovanih proteina plašta puža *A. vulgaris* masenom spektrometrijom i rezultata dobijenih analizom transkriptoma. Tabelarno su prikazani detalji (EMBL broj -*European Molecular Biology Laboratory*, UniProt broj, broj jedinstvenih peptida, procenat poklapanja proteinske sekvence itd.) o 48 novih, do sada neopisanih proteina. Zatim se govori o detektovanim proteinima plašta *A. vulgaris* koji mogu da budu odgovorni za uspešne strategije preživljavanja i rasprostranjenost ove vrste. U tu grupu spadaju proteini urođene imunosti, kao što su „pathogen-associated molecular patterns“, efektorski i citokinima-slični proteini. Pored njih, detektovani su i proteini iz grupe MACPF (Membrane Attack Complex/Perforin Family) i toksinu-slični proteini. U okviru gore navedenih proteina, prokomentarisana je njihova domenska struktura i moguća biološka uloga.

Poslednji deo odeljka **Rezultati i diskusija** govori o rezultatima dobijenih analizom peptida (masenom spektrometrijom nakon digestije u rastvoru) iz membranskih frakcija glava vrste *Drosophila melanogaster*. Prikazan je odnos i distribucija detektovanih proteina u odnosu na biološke procese, molekulsku funkciju i ćelijsku strukturu. Na kraju su izdvojeni i posebno komentarisani receptori, transporter i jonski kanali s obzirom da učestvuju u procesima energetskog metabolizma, ćelijske signalizacije i transporta brojnih biomolekula.

U poglavlju **Zaključak (Conclusion)** kandidat je sumirao rezultate dobijene u okviru doktorske disertacije.

U poglavlju **Eksperimentalni deo (Experimental part)** navedene su detaljne informacije o hemikalijama, rastvorima i puferima koji su korišćeni u toku izrade ove disertacije. Takođe su detaljno opisani svi protokoli za razdvajanje i analizu proteina, kao i za izolovanje i prečišćavanje informacione RNA. Finalno, navedeni su softveri koji su korišćeni u bioinformatičkoj analizi podataka.

Navedena **Literatura (References)** obuhvata radove iz oblasti istraživanja (275 citata) i iscrpno pokriva sve delove disertacije.

U **Prilogu (Appendix)** priloženi su radovi koji su proistekli iz ove disertacije. Nakon toga nalaze se dve tabele koje predstavljaju listu proteina identifikovanih masenom spektrometrijom nakon 1D i 2D elektroforeze. Treća tabela predstavlja pregled proteina sličnih lektinima, detektovanih na nivou transkriptoma. Na samom kraju nalazi se slika koje predstavlja uporednu analizu aminokiselinke sekvencije lektina tipa H iz *A. vulgaris*, *Helix pomatia* i *Cepaea hortensis*. Svi rezultati dati u prilogu su diskutovani u delu rezultati i diskusija.

B. Kratak opis postignutih rezultata

Korišćenjem HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, USA) i Trinity softvera (razvijeno od strane Broad Instituta - MIT i Harvard uz saradnju sa Univerzitetom u Jerusalimu) generisana je baza podataka, na osnovu informacione RNK puža *A. vulgaris*, koja sadrži 47451 protein-kodirajuću sekvenciju. O toga 66,3% čine protein-kodirajuće sekvencije barem jednog proteina, dok 33,7% nema značajnih poklapanja sa do sada poznatim proteinskim sekvencijama. 0,4% aminokiselinskih sekvencija predstavlja nepoznate proteine. Ukoliko se podaci uporede sa sekvencijama deponovanim u NCBI bazi podataka (*National Center for Biotechnology Information*), 65% sekvencija transkriptoma puža *A. vulgaris* je zajedničko sa vrstom *Aplysia californica*, 8,7% sa *Crassostea gigas* i 2,5% *Capitella teleta*. Imajući u vidu ove i ostale rezultate preko 80% transkriptoma puža *A. vulgaris* je zajedničko sa pripadnicima vrsta mekušaca. Za prepoznavanje proteinskih domena korišćena je Pfam (*protein families*) baza podataka pomoću koje su 16994 sekvencije identifikovane da sadrže makar jedan domen. Od njih, 471 sekvencija nema homologije sa poznatim proteinima, ukazujući na postojanje do sada neopisanih proteina. Podaci su javno dostupni preko GenBank - BioProject, broj PRJEB7891 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>).

Nakon razdvajanja proteina plašta puža *A. vulgaris* na 2D PA gelu, digestijom pomoću tripsina/himotripsina i analize na masenom spektrometru detektovane su 833 proteinske sekvencije. Od detektovanih 833, za 19 proteinskih sekvencija nije nađena homologija sa

proteinima deponovanim u NCBI bazi. Kombinacijom razdvajanja proteina na 1D PA gelu i analizom na masenom spektrometru visoke rezolucije identifikovano je 2011 proteina, od kojih za 48 nije nađena homologija sa proteinskim sekvencijama deponovanim u NCBI bazi. Ukupno je detektovano 2129 proteina. Veliki broj prisutnih proteina u plaštu *A. vulgaris* ukazuje na dobro razvijen urođeni imuni sistem kod ove vrste puža koja može da objasni njegovu visoku adaptivnu sposobnost i široku rasprostranjenost. Detektovano je 37 proteina koji su slični lektinima, i to familiji C-lektina, galektina, malektina, H-lektina, L-lektina, Ricin-B lektina i kalneksina. Pored toga detektovani su proteini koji su po strukturi slični agatoksinu.

Analiza membranskih proteina iz glava *Drosophila melanogaster* je bazirana na izolovanju membrana i digestiji proteina u rastvoru. Peptidi su razdvojeni u više frakcija tečnom hromatografijom na reverznoj fazi na visokom pH (~10), a zatim je svaka frakcija dodatno razdvojena pomoću tečne hromatografije na reverznoj fazi pri niskom pH (~2) i direktno analizirana na masenom spektrometru tipa Orbitrap. Ovakav metodološki pristup je omogućio detekciju 4812 proteina. Broj identifikovanih peptida čija se sekvencija ponavlja u više proteinskih grupa („*redundant peptides*“) iznosi 114865, dok broj identifikovanih peptida koji su prisutni samo u jednoj grupi proteina („*distinct peptides*“) iznosi 38179. Utvrđeno je da ukupno 1679 proteina sadrže makar jedan transmembranski domen.

C. Uporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature

Proteomika predstavlja oblast istraživanja koji se primarno bavi identifikacijom i kvantifikacijom proteina i ispitivanjem njihove biološke funkcije. U ovoj disertaciji je korišćena metoda masene spektrometrije za ispitivanje proteinskog profila plašta puža *A. vulgaris* koji bi mogao da objasni uspešnost ove vrste koja se ubraja u najinvazivnije u Evropi. Širenje ove vrste puža predstavlja veliki problem u ekonomskom, ekološkom i zdravstvenom smislu. Dokazano je da mogu da budu vektor za patogene bakterije (*Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*), kao i domaćin parazitu (*Angiostrongylus vasorum*) koji izaziva ozbiljne, čak i fatalne bolesti kod pripadnika familije pasa (*Canidae*). Do sada nisu postojali podaci u literaturi o proteinskom profilu plašta ove vrste puža. Rezultati koji su proizašli iz ove teze ukazuju na jako razvijen

urođeni imuni sistem, kao i prisustvo proteina koji su bogati disulfidnim mostovima, koji mogu da ukažu na odbranbene mehanizme *A. vulgaris*.

U drugom dele teze koji se odnosi na model sistem *Drosophila melanogaster*, opisan je metodološki pristup za dobijanje membranskih proteina i njihovu analizu masenom spektrometrijom. *Drosophila melanogaster* se koristi kao model sistem za proučavanje oko 75% humanih bolesti. Zbog biološkog matriksa u kojem se nalaze, detekcija i karakterizacija membranskih i transmembranskih proteina predstavlja izazov u strukturnoj biohemiji. U ovoj tezi razvijen je metodološki pristup za analizu membranskih i transmembranskih proteina glave *Drosophila melanogaster* masenom spektrometrijom. Među detektovanim proteinima se nalazi velik broj receptora, transportera i jonskih kanala. Promena u građi i funkciji ovakvih proteina je povezana sa brojnim oboljenjima kao što su Parkinsonova bolest, poremećaji pažnje, šizofrenija itd. Do sada je detektovano 9124 proteina iz *Drosophila* zahvaljujući kombinovanju rezultata proisteklih iz analize različitih uzorka (različite faze uzrasta vrste *Drosophila*) i primenom različitih strategija frakcionisanja proteina/peptida. Analizom proteoma glava *Drosophila* pomoću 2D PAGE detektovano je svega nekoliko membranskih i transmembranskih proteina nervnog sistema. Metodologija izolovanja i razdvajanja membranskih proteina koja je opisana u ovoj tezi, omogućila je detekciju 1679 proteina sa transmembranskim domenom, koji se sada nalaze u javno dostupnoj bazi podataka (ProteomeXchange Consortium - PRIDE broj PXD001712; DOI 10.6019/PXD001712.) Navedena metodologija obuhvata enzimsku digestiju membranskih proteina tripsinom/himtripsinom u rasvoru pomoću filtera (FASP-Filter Aided Sample Preparation) i analizom na masenom spektrometru visoke rezolucije. Ovakav pristup je omogućio značajno unapređenje baze podataka membranskih proteina vrste *Drosophila melanogaster*, kao i mogućnost njihovog izučavanja na proteinskom nivou.

D. Objavljeni i saopšteni radovi koji čine deo disertacije

Radovi koji su proizašli tokom rada na ovoj disertaciji su publikovani u vrhunskim časopisima međunarodnog značaja (M21):

1. Bulat T, Smidak R, Sialana FJ, Jung G, Rattei T, Bilban M, et al. *Transcriptomic and Proteomic Analysis of Arion vulgaris--Proteins for Probably Successful Survival Strategies?* PLoS One. 2016;11(3):e0150614 (IF 3.54)

2. Aradska J, Bulat T, Sialana FJ, Birner-Gruenberger R, Erich B, Lubec G. *Gel-free mass spectrometry analysis of Drosophila melanogaster heads*. Proteomics. 2015;15(19):3356-60 (IF 4.079)

E. Zaključak

Na osnovu svega izloženog može se zaključiti da je u podnetoj doktorskoj disertaciji pod naslovom:

Engelski jezik:

"Functional Proteomics of *Arion vulgaris* and *Drosophila melanogaster* Organisms by Mass Spectrometry Approach"

Srpski jezik:

"Primena masene spektrometrije u oblasti funkcionalne proteomike na primeru *Arion vulgaris* i *Drosophila melanogaster*"

kandidat, Tanja M. Bulat, uspešno analizirala i okarakterisala proteinski profil plašta puža *Arion vulgaris*. Novootkrivenih 48 proteina govore u prilog originalnosti ovog naučnog rada, kao i da dobijeni rezultati značajno doprinose oblasti proteinske biohemije izučavane vrste *Arion vulgaris*. Takođe, identifikacija membranskih i transmembranskih proteina glave *Drosophila melanogaster* je doprinelo unapređenju do sada postojeće baze podataka o receptorima, transporterima i jonskim kanalima.

Na osnovu svega izloženog Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, da podnetu doktorsku disertaciju Tanje M. Bulat prihvati i odobri njenu odbranu.

Članovi komisije:

Prof. dr Marija Gavrović-Jankulović
redovni profesor Hemijskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Tanja Ćirković-Veličković
redovni profesor Hemijskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Univ. Prof. Dr. Gert Lubec, M.D.
Departman za farmaceutsku hemiju,
Fakultet nauka o životu,
Univerzitet u Beču

Prof. dr Zoran Vujčić,
redovni profesor Hemijskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu