

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
HEMIJSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Odlukom Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta od 06. decembra 2016. godine određeni smo u komisiju za ocenu naučne zasnovanosti teme doktorske teze Marije B. Blažić, master biohemičara, pod naslovom:

„Proteinski inženjering i razvoj visoko efikasnih metoda pretraživanja biblioteke gena celobioza-dehidrogenaze iz *Phanerochaete chrysosporium* za povećanje enzimske aktivnosti i stabilnosti“

Na osnovu ove odluke Nastavno-naučnom veću, podnosimo sledeći

IZVEŠTAJ

A. Biografski podaci o kandidatkinji

Marija Blažić rođena je 14. jula 1987. godine u Prijedoru, Bosna i Hercegovina. Osnovnu školu i srednju medicinsku školu, smer laboratorijski tehničar, završila je u Prijedoru. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani biohemičar, upisala je 2006. godine. Diplomirala je 28. jula 2010. godine sa prosečnom ocenom 8,23 i ocenom 10 na diplomskom radu. Master studije biohemije na Hemijskom fakultetu upisala je 2010. godine i diplomirala 09. septembra 2011. godine sa prosečnom ocenom 9,87 i ocenom 10 na master radu.

Od 01.06.2012. do 31.12.2013. zaposlena je kao istraživač-pripravnik u Centru za Hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju u Beogradu.

Od 01.01.2014. do danas zaposlena je kao istraživač-saradnik u Centru za Hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju u Beogradu.

Dobitnik je stipendije FEBS short term fellowship programa zahvaljujući kojoj je boravila dva meseca na usavršavanju u Fraunhofer institutu (Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology) u Ahenu, Nemačka.

B. Objavljeni naučni radovi i saopštenja

Dosadašnje rezultate istraživanja kandidatkinja je publikovala u sledećim naučnim radovima i saopštenjima.

Radovi objavljeni u vrhunskim časopisima međunarodnog značaja (M21)

1. Prodanović, O., Spasojević, D., Prokopijević, M., Radotić, K., Marković, N., Blažić, M., & Prodanović, R. (2015). Tyramine modified alginates via periodate oxidation for peroxidase induced hydrogel formation and immobilization. *Reactive and Functional Polymers* **93**, 77-83.

Radovi objavljeni u istaknutim časopisima međunarodnog značaja (M22)

1. Kovacevic, G., Blazic, M., Draganic, B., Ostafe, R., Gavrovic-Jankulovic, M., Fischer, R. & Prodanovic, R. (2014). Cloning, heterologous expression, purification and characterization of M12 mutant of *Aspergillus niger* glucose oxidase in yeast *Pichia pastoris* KM71H. *Molecular Biotechnology* **56**, 305-11.

Radovi objavljeni u časopisima međunarodnog značaja (M23)

1. Blazic, M., Kovacevic, G., Prodanovic, O., Ostafe, R., Gavrovic-Jankulovic, M., Fischer, R. & Prodanovic, R. (2013). Yeast surface display for the expression, purification and characterization of wild-type and B11 mutant glucose oxidases. *Protein Expression and Purification* **89**, 175-180.

Radovi objavljeni u časopisima nacionalnog značaja (M52)

1. Prodanović, R.M., Gavrović-Jankulović, M.Đ., Kovačević, G.N., Blažić, M.B., Prodanović, O.L. & Raluca, O.V. (2011). "Nanobiokatalizatori za biogorivne ćelije i biosenzorne sisteme", *Vojnotehnički glasnik*, vol. 59, no. 4, pp. 79-92.

Radovi saopštteni na skupovima međunarodnog značaja štampani u izvodu (M34)

1. Blažić M., Kovačević G., Ostafe R., Fischer R., Ostafe V., Prodanović R., “Heterologous expression of cellobiose-dehydrogenase from *P. chrysosporium* in *S.cerevisiae* for cellulose conversion to biofuels”, *5th International congress for cell biology*, Timisoara 2013, Bulletin of Romanian Society for Cell Biology No. 41 **p.68** (2013)
2. Blažić M., Prodanović R., ”Expression of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* in yeast *Saccharomyces cerevisiae* for directed evolution”, *40th FEBS congress*, Berlin 2015, FEBS journal 282, P10-033, **p. 119**
3. Kovačević G., Blažić M., Ostafe R., Fischer R., Ostafe V., Prodanović R., “Directed evolution of glucose-oxidase and heterologous expression in yeast”, *5th International congress for cell biology*, Timisoara 2013, Bulletin of Romanian Society for Cell Biology No. 41 **p.69** (2013)

Radovi saopštteni na skupovima nacionalnog značaja štampani u celini (M63)

1. Blažić M., Kovačević G., Zelenović N., Ostafe R., Gavrović-Jankulović M., Fischer R., Prodanović R., “Yeast surface display expression and purification of chimera glucose oxidase construct with Aga2 protein”, *50th Meeting of the Serbian Chemical Society*, Belgrade 2012, Book of Abstracts **p.119**, BT O1 (2012)
2. Kovačević G., Blažić M., Draganić B., Ostafe R., Gavrović-Jankulović M., Fischer R., Prodanović R., “Cloning, heterologous expression and characterization of glucose oxidase mutants from *Aspergillus niger* in yeast *Pichia pastoris*”, *50th Meeting of the Serbian Chemical Society*, Belgrade 2012, Book of Abstracts **p.120**, BT O2 (2012)

Radovi saopštteni na skupovima nacionalnog značaja štampani u izvodu (M64)

1. Blažić M., Prodanović R., “Molecular cloning of the cellobiose dehydrogenase gene from *Phanerochaete chrysosporium* and expression in yeast *Saccharomyces*

cerevisiae`, 2nd Conference of the Young Chemists of Serbia, Niš 2014, Book of Abstracts p.126, BB P01 (2014).

C. Obrazloženje teme

1. Naučna oblast

Naučna oblast je biohemija (biohemijski aspekti uticaja aminokiselinske sekvence enzima na aktivnost), za koju je matičan Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu.

2. Predmet rada

Predmet rada je dobijanje mutanata celobioza-dehidrogenaze iz *Phanerochaete chrysosporium* povećane aktivnosti u odnosu na prirodni oblik enzima u cilju upotrebe u biosenzorima i biogorivnim ćelijama, kao i razvoj i optimizacija nove metode visoko efikasne pretrage biblioteke mutiranih varijanti gena celobioza-dehidrogenaze zasnovane na fluorimetrijskim metodama detekcije enzimske aktivnosti i eksportovanju enzima celobioza-dehidrogenaze na površinu ćelija kvasca u cilju brzog i efikasnog pronalaženja mutanta sa povećanom aktivnosti.

3. Naučni cilj istraživanja

U okviru ove teze formulisano je nekoliko ciljeva:

- a) Kloniranje i ekspresija celobioza-dehidrogenaze iz *Phanerochaete chrysosporium* u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* Invsc1 i karakterizacija rekombinantnog proteina.
- b) Pravljenje biblioteke mutiranih varijanti gena celobioza-dehidrogenaze metodom slučajnih mutacija i njena ekspresija u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* Invsc1 u vidu vanćelijskog enzima.
- c) Testiranje upotrebljivosti sistema ekspresije oksidoreduktaznih enzima u vidu himere sa Aga2 proteinom eksportovane na površinu ćelija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 za dirigovanu evoluciju enzima, na primeru prirodnog oblika i jednog mutanta glukoza-oksidge.

- d) Kloniranje i ekspresija celobioza-dehidrogenaze u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 u vidu himere sa Aga2 proteinom eksportovane na površinu ćelija kvasca kao i karakterizacija dobijenog himernog proteina.
- e) Pravljenje biblioteke mutiranih varijanti gena celobioza-dehidrogenaze metodom slučajnih mutacija i njena ekspresija u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 u vidu himere sa Aga2 proteinom eksportovane na površinu ćelija kvasca.
- f) Razvoj i optimizacija novog fluorescentnog enzimskog eseja za celobioza-dehidrogenazu.
- g) Razvoj i optimizacija metode za visoko efikasno pretraživanje biblioteke mutiranih varijanti gena celobioza-dehidrogenaze eksprimiranih u *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 zasnovane na razvijenom fluorescentnom enzimskom eseju.
- h) Pretraživanje dobijenih biblioteka mutiranih varijanti gena celobioza-dehidrogenaze eksprimiranih u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* u vidu vanćelijskog enzima i u vidu himere sa Aga2 proteinom eksportovane na površinu ćelija kvasca ka povećanoj aktivnosti u odnosu na prirodni oblik enzima.
- i) Kloniranje i ekspresija nehimernog, prirodnog oblika enzima i odabranih mutanata celobioza-dehidrogenaze u kvascu *Pichia pastoris*, njihovo prečišćavanje i detaljna karakterizacija kinetičkih parametara aktivnosti i stabilnosti.

4. Metoda ili metode istaživanja

U okviru izrade doktorske teze biće korišćene sledeće eksperimentalne tehnike, s' obzirom na zahteve iskazane u ciljevima:

- a) **Biohemijske metode:** hromatografske metode (jonoizmenjivačka hromatografija, gel filtracija) i ultrafiltracija u cilju izolovanja i prečišćavanja proteina; elektroforetske metode analize proteina (SDS PAGE i nativna PAGE); metode merenja enzimske aktivnosti na spektrofotometru i fluorimetru u kivetama i mikrotitar pločama.
- b) **Metode molekularne biologije:** PCR metode za umnožavanje gena i pravljenje biblioteka mutiranih varijanti gena; restrikciona digestija i ligacija gena u odgovarajuće vektore; transformacija bakterija i kvasaca vektorima sa ukloniranim genima.

- c) **Mikrobiološke metode:** gajenje sojeva bakterija i kvasaca na tečnim i čvrstim podlogama; heterologna ekspresija proteina u kvascima.

5. Aktuelnost problematike u svetu

Celobioza-dehidrogenaza (CDH) je vanćelijski enzim koji se javlja kod mnogih gljiva bele truleži, uključujući i dobro proučenu *Phanerochaete chrysosporium*. Celobioza-dehidrogenaza je monomerni enzim sa dva posebna domena, jedan koji sadrži FAD i drugi hem (citohrom b tip) domen koji su povezani sa kratkim vezujućim regionom. Enzim redukuje širok spektar elektron akceptora kao što su krajevi celobioze i celo-oligosaharida, produkata biorazgradnje celuloze, do njihovih odgovarajućih 1,5-laktona, koji se potom spontano hidrolizuju do karboksilnih kiselina u vodenim rastvorima. Smatra se da zajedno sa celulazama i lignin peroksidazama CDH igra važnu ulogu u biološkoj razgradnji nerastvorne celuloze od strane gljiva bele truleži. CDH takođe može da prenese elektrone osim na solubilne elektron akceptore i na elektrodu i da se iskoristi za pravljenje amperometrijskih biosenzora za merenje koncentracije celobioze i naročito detekciju laktoze u hrani. Da bi se poboljšala upotrebljivost CDH za razgradnju celuloze, proizvodnju celobionske i laktobionske kiseline kao i za merenje koncentracije disaharida neophodno je povećati njenu aktivnost i eventualno stabilnost. Da bi to postigli mi smo koristili metode proteinskog inženjeringa i visoko efikasne pretrage biokatalizatora.

Proteinski inženjering najčešće podrazumeva promenu sekvence gena koji kodira određenu amino-kiselinsku sekvencu proteina u cilju promene proteinske aktivnosti i stabilnosti. Upotrebom odgovarajućih ekspresionih sistema (*in vitro* translacije) i proširenog genetskog koda moguće je i bez promene sekvence gena uvesti u proteinsku amino-kiselinsku sekvencu i amino-kiseline koje se ne javljaju u prirodi. Proteinski inženjering sadrži dva pristupa: dirigovana evolucija i racionalni dizajn. Metoda dirigovane evolucije ne zahteva prethodno poznavanje proteinske strukture i podrazumeva iterativne korake kreiranja biblioteke mutiranih varijanti gena metodom slučajnih mutacija i pretrage (skrininga) kreirane biblioteke za varijantama enzima koji imaju povećanu aktivnost i stabilnost.

U ovom pristupu proteinskog inženjeringa najsporiji korak predstavlja sama metoda pretrage tj. skrininga biblioteke mutiranih varijanti gena ka varijantama enzima sa poboljšanim karakteristikama. Stoga je razvoj visoko efikasnih metoda pretrage ("*High-throughput screening systems*") biblioteka gena od ključnog značaja za uspeh metoda proteinskog inženjeringa u razvoju varijanata enzima sa poboljšanim karakteristikama. Kako bi se

obezbedila mogućnost izvođenja i praćenja velikog broja enzimskih reakcija u kratkom vremenskom periodu, ove metode moraju biti zasnovane na detekciji proizvoda reakcije fluorimetrijom usled potrebe za velikom osetljivošću, dok se same reakcije moraju izvoditi u malim reakcionim zapreminama (bunarčići mikrotitar ploča ili mikrokapljice vode u emulzijama vode u ulju).

I pored velikih mogućnosti, primena ovakvih metoda pretraživanja za razvoj biotehnoški važnih varijanata enzima je ograničena zbog brojnih problema kao što su nedostatak odgovarajućih fluorescentnih enzimskih eseja i odgovarajućih ekspresionih sistema. Zato je razvoj novih fluorescentnih enzimskih eseja i njihova adaptacija za pretragu biblioteke mutiranih varijanti gena u mikrotitar pločama od velike važnosti za uspešnost eksperimenata u proteinskom inženjeringu. Zbog svega toga su i dalje veoma aktuelna istraživanja u ovoj oblasti koja imaju za cilj poboljšanje selektivnosti i osetljivosti metode pretrage biblioteke mutiranih varijanti gena kako bi se povećala uspešnost pronalaženja najaktivnijih mutanta enzima u populaciji.

6. Očekivani rezultati

U okviru rada na tezi trebalo bi da se razviju nove metode heterologne ekspresije CDH iz *Phanerochaete chrysosporium* u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* u vidu vanćelijskog enzima i u vidu himere sa AGA2 proteinom eksportovane na površinu ćelija kvasca. Nakon razvoja ekspresionih metoda očekuje se i dobijanje biblioteke mutiranih varijanti gena CDH u ovim ekspresionim sistemima metodama nasumične mutacije gena.

Takođe se očekuje i razvoj novog fluorescentnog enzimskog eseja za CDH i njegova primena u visoko efikasnoj pretrazi biblioteke mutiranih varijanti gena CDH u cilju pronalaženja mutanata enzima sa povećanom aktivnošću u odnosu na prirodan oblik enzima.

Prirodni oblik enzima i mutanti CDH će biti klonirani i eksprimirani u kvascu *Pichia pastoris* u vidu nehimernog oblika enzima kako bi se dobila veća količina enzima neophodna za prečišćavanje i detaljnu kinetičku karakterizaciju.

Kao finalni rezultat ovih eksperimenata se očekuje pronalaženje, dobijanje i detaljna karakterizacija mutanata celobioza-dehidrogenaze koji su aktivniji u odnosu na prirodni oblik enzima, te samim tim i pogodniji za upotrebu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji u biosenzorima i biogorivnim ćelijama.

Zaključak

Na osnovu svega napred iznetog, Komisija je mišljenja da je predložena tema doktorske teze pod izmenjenim sledećim naslovom:

„Proteinski inženjering i razvoj visoko efikasnih metoda za pretraživanje biblioteke gena celobioza-dehidrogenaze iz *Phanerochaete chrysosporium* u cilju povećanja enzimske aktivnosti“.

naučno zasnovana i da kandidat Marija Blažić, master biohemičar, ispunjava sve uslove za početak izrade doktorske teze za sticanje akademskog zvanja DOKTOR BIOHEMIJSKIH NAUKA. Zato preporučujemo Nastavno-naučnom veću Hemijskog fakulteta u Beogradu da odobri kandidatu izradu doktorske teze pod navedenim naslovom. Za mentora predlažemo dr Radivoja Prodanović, vanrednog profesora Hemijskog fakulteta.

Članovi Komisije:

1. dr Radivoje Prodanović, vanredni profesor, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu (mentor)

2. dr Marija Gavrović Jankulović, redovni profesor, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

3. dr Ksenija Radotić Hadži-Manić, naučni savetnik Instituta za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu

U Beogradu,

18.04.2017.