

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

Odlukom Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta od 09. novembra 2017. godine određeni smo u komisiju za ocenu naučne zasnovanosti teme doktorske teze Nevene S. Marković, master biohemičara, pod naslovom:

„Sinteza amino derivata steroida rekombinantnim transaminazama i dehidrogenazama“

Na osnovu ove odluke Nastavno-naučnom veću, podnosimo sledeći

IZVEŠTAJ

A. Biografski podaci o kandidatkinji

Nevena Marković rođena je 5. jula 1988. godine u Beogradu, Republika Srbija. Osnovnu školu „Vuk Karadžić“ i gimnaziju „Peta beogradska gimnazija“, prirodno-matematički smer, završila je u Beogradu. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani biohemičar, upisala je 2007. godine. Diplomirala je 2013. godine sa prosečnom ocenom 8,52 i ocenom 10 na diplomskom radu. Master studije biohemije na Hemijskom fakultetu upisala je 2013. godine i završila odbranom master teze 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,8 i ocenom 10 na master radu.

Od 01.03.2015. do danas zaposlena je kao istraživač-pripravnik u Centru za Hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerziteta u Beogradu.

U zimskom semestru akademske 2016/2017. i 2017/2018. godine angažovana je kao saradnik u nastavi na predmetu Biohemija proteina i nukleinskih kiselina, na odseku biohemija, Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

U zimskom semestru od akademske 2015/2016 godine do danas angažovana je kao saradnik u nastavi na predmetu Proteinski inženjering, izborni premet na master studijama, odsek biohemija, Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

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 saopšteni na skupovima međunarodnog značaja štampani u izvodu (M34)

1. Marković N., Jovanović Šanta S., Prodanović R., “Omega-transaminase in synthesis of potential pharmaceutical active ingredients”, *The Annual International Conference of the Romanian Society for Biochemistry & Molecular Biology*, Timisoara 2017, New frontiers in chemistry, Vo. 26, No. 2, **S2_P12** (2017)
2. Marković N., Jovanović Šanta S., Prodanović R., “Synthesis of potential pharmaceutical active ingredients using omega-transaminase”, *7th Conference of Serbian Biochemical society*, Belgrade 2017, *Biochemistry of Control in Life and Technology*, p.159-161 (2017)

C. Obrazloženje teme

1. Naučna oblast

Naučna oblast je biohemija (biohemijski aspekti uticaja aminokiselinske sekvencije enzima na aktivnost i primenu u enzimskim modifikacijama prirodnih proizvoda), za koju je matičan Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu.

2. Predmet rada

Predmet rada je produkcija rekombinantnih transaminaza i dehidrogenaza i njihova upotreba u sintezi amino derivata steroida u cilju dobijanja fiziološki aktivnih jedinjenja, kao i razvoj i optimizacija biokatalitičkog postupka i procesa proizvodnje amino steroida u cilju dobijanja povećanja prinosa reakcije. Pored navedenog, predmet rada se bazira i na pronalasku novih mutiranih varijanti enzima upotrebom proteinskog inženjeringa i metoda za visokoefikasnu pretragu varijanti ovih enzima zasnovanih na fluorimetrijskim metodama detekcije enzimske aktivnosti.

3. Naučni cilj istraživanja

U okviru ove teze formulisano je nekoliko ciljeva:

- a) Produkcija ATA-117 mutirane varijante enzima (*R*)-selektivne omega-transaminaze, homologa enzima poreklom iz *Artrrobacter* sp. i CV2025 omega-transaminaze iz *Chromobacterium violaceum* u *Escherichia coli* BL21. Uporedno određivanje aktivnosti i supstratne specifičnosti transaminaza ka različitim prirodnim proizvodima i steroidnim jedinjenjima.
- b) Sinteza amino derivata steroida, strukturna karakterizacija dobijenih proizvoda i optimizacija procesa proizvodnje u cilju povećanja prinosa reakcije.
- c) Ispitivanje aktivnosti i stabilnosti rekombinantnog enzima u reakcionim sistemima koji sadrže organske rastvarače neophodne za rastvaranje steroidnih supstrata usled njihove ograničene rastvorljivosti u vodi.
- d) Prečišćavanje i imobilizacija transaminaza u cilju povećanja stabilnosti biokatalizatora i mogućnosti njegove višestruke upotrebe.
- e) Kloniranje i ekspresija transaminaza u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* kao i karakterizacija dobijenog rekombinantnog proteina.
- f) Razvoj i optimizacija fluorescentnog enzimskog testa za detekciju aktivnosti transaminaze u cilju pronalaženja metode za visokoefikasnu detekciju aktivnih varijanti enzima eksprimiranih u kvascu *S. cerevisiae* i karakterizaciju supstratne specifičnosti.

- g) Testiranje aktivnosti i supstratne specifičnosti transaminaza eksprimiranih u kvascu *S. cerevisiae* ka različitim prirodnim proizvodima i steroidnim jedinjenjima.
- h) Kloniranje i ekspresija oktopin-dehidrogenaze poreklom iz *Desulfohalobium retbaense* u bakteriji *E. coli* BL21 i karakterizacija dobijenog proteina.
- i) Razvoj i optimizacija spektrofotometrijskog i fluorimetrijskog testa za detekciju aktivnosti i određivanje supstratne specifičnosti oktopin-dehidrogenaze.
- j) Ispitivanje upotrebljivosti oktopin- i hidroksisteorid-dehidrogenaza u procesu sinteze keto, a zatim i amino derivata steroida.
- k) Dobijanje različitih mutiranih varijanti enzima transaminaza i dehidrogenaza metodama proteinskog inženjeringa u cilju povećanja njihove aktivnosti i stabilnosti.
- l) Testiranje mutiranih varijanti transaminaza i dehidrogenaza razvijenim fluorescentnim enzimskim testovima i visokoefikasnim metodama pretraživanja u reakcijama enzimskih modifikacija steroidnih jedinjenja.
- m) Detaljna strukturna i biohemijska karakterizacija dobijenih amino derivata steroida.

4. Metode istraživanja

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

- a) **Biohemijske metode:** hromatografske metode (jonoizmenjivačka hromatografija, afinitetna hromatografija) u cilju izolovanja i prečišćavanja proteina; elektroforetske metode analize proteina (SDS PAGE i nativna PAGE); metode analize enzimske aktivnosti i supstratne specifičnosti reversnofaznom hromatografijom, i merenja enzimske aktivnosti na spektrofotometru i fluorimetru.
- b) **Metode prečišćavanja derivata prirodnih proizvoda i njihove strukturne karakterizacije instrumentalnom analizom:** ekstrakcija dobijenog proizvoda, prečišćavanje hromatografijom na silika-gelu, praćenje procesa sinteze i prečišćavanja tankoslojnom hromatografijom i strukturna karakterizacija dobijenih aminosteroida (NMR, FTIR, MS).

- c) **Metode molekularne biologije:** PCR metoda za umnožavanje gena; restrikciona digestija i ligacija gena u odgovarajući vektor; transformacija bakterija i kvasaca vektorima sa ukloniranim genima.
- d) **Mikrobiološke metode:** gajenje sojeva bakterija i kvasaca na tečnim i čvrstim podlogama; heterologna ekspresija proteina u bakterijama i kvascima.

5. Aktuelnost problematike u svetu

Transaminaze (aminotransferaze) su enzimi koji katalizuju reakciju transaminacije-prevođenja amina u keto analoge i obrnuto, uz učešće piridoksal-5'-fosfat (PLP) kao koenzima. Alanin aminotransferaza i aspartat aminotransferaza (ALT i AST) učestvuju u metaboličkoj deaminaciji aminokiselina. Testovi zasnovani na merenju aktivnosti ALT i AST koriste se kao dijagnostički parametri bolesti jetre i drugih tkiva, u cilju merenja stepena oštećenja hepatocita, miocita ili drugih tipova ćelija. Takođe, transaminaze su značajne u glukoza-alaninskom ciklusu.

ω -Transaminaze (ω TA) (E.C. 2.6.1.X) su piridoksal-5'-fosfat (PLP) zavisni enzimi koji su se pokazali izuzetno efikasnim u sintezi hiralnih amina. Kofaktor PLP predstavlja molekularni nosač u reakciji koju katalizuju ω TA, prenoseći amino grupu izmeđuaminskog donora i akceptora (ketona ili aldehida). S obzirom na to da se PLP u reakciji reciklira, količina PLP-a je neophodna samo u katalitičkoj količini ^[1].

U poslednje vreme, transaminaze se koriste u industrijskim procesima kao biokatalizatori u proizvodnji optički čistih amina ^[2]. Razvijeni su različiti enzimski procesi za produkciju hiralnih amina, ali upotreba transaminaza u ove svrhe ima prednost nad drugim enzimskim i hemijskim metodama jer ovi enzimi prihvataju širok opseg supstrata i nema potrebe za regeneracijom kofaktora ^[3].

Amini igraju izuzetno važnu ulogu u farmaceutskoj, agrohemijskoj i hemijskoj industriji. Koriste se kao gradivne jedinice za sintezu različitih lekova koji sadrže biološki aktivne komponente. Primeri tih lekova su lek za Alchajmerovu bolest, lek za malariju, prostatu i antitumorski antibiotik. S obzirom da su često oba enantiomera optički aktivnih amina potrebna kao gradivne jedinice za sintezu biološki aktivnih komponenti, enzimi koji katalizuju sintezu (*R*)- i (*S*)- enantiomera optički aktivnih amina su od izuzetnog značaja.

Jedan od primera optički aktivnih amina koji se koriste u lečenju dijabetesa tipa 2 je sitagliptin koji je aktivna komponenta leka Januvia. Prilikom sinteze sitagliptina korišćen je mutant ATA-117 ω -aminotransferaze. Enzimi koji su razvijeni za sintezu sitagliptina imaju širok spektar supstrata i povećanu toleranciju pri visokim koncentracijama $i\text{-PrNH}_2$ i organskih rastvarača što omogućava njihovu praktičnu upotrebu ^[2].

Steroidi predstavljaju veliku i strukturno šarenoliku klasu sekundarnih metabolita neophodnih za regulaciju velikog broja bioloških procesa. S obzirom na njihovu ključnu ulogu u metabolizmu, steroidi i njihovi derivati često ispoljavaju biološku aktivnost i stoga imaju veliki potencijal za primenu u farmaceutskoj industriji. Veliki broj lekova koji su trenutno u primeni jesu steroidi i njihovi derivati. Kao jedan od primera sintetički sintetisanih steroida koji se koriste kao intermedijeri u sintezi biološki aktivnih steroidnih derivata su 17-aminosteroidi i njihovi derivati koji su našli primenu u tretmanu kancera dojke ili kao antikoagulansi ^[4].

Reakcije transaminacije kao najveće ograničenje imaju nepovoljnu termodinamičku ravnotežu, pošto je polazni keton obično stabilniji od odgovarajućeg amina koji se dobija kao proizvod reakcije. Ravnoteža može biti pomerena ka proizvodima reakcije upotrebom viška amino donora ili uklanjanjem ko-produkta različitim hemijskim ili enzimskim metodama. Na primer, ukoliko se koristi izopropilamin kao donor amino grupe dobija se aceton kao ko-produkt, koji se može ukloniti iz reakcione smeše uparavanjem pri povišenim temperaturama ili redukcijom do alkohola dejstvom enzima alkohol-dehidrogenaze. Druge enzimске metode za uklanjanje ili recikliranje ko-produkta, i pomeranje ravnoteže reakcije u smeru proizvoda uključuju upotrebu enzima kao što su laktat-dehidrogenaza, aminokiselinska oksidaza, piruvat-dekarboksilaza ili acetolaktat-sintaza u zavisnosti od toga koje jedinjenje se koristi kao donor amino grupe ^[3].

Korišćenjem različitih steroid-dehidrogenaza moguće je hidroksilne grupe prisutne u steroidima kao na primer kod žučnih kiselina prevesti u keto oblike i samim tim proširiti dijapazon ciljanih grupa za transfer amino grupe transaminazama čime se značajno proširuje broj mogućih amino derivata steroidnih jedinjenja ^[5,6]. Upotrebom omega-transaminaza je moguće dobiti samo primarne amine. Međutim, za farmaceutsku i agrohemijsku industriju je od izuzetnog značaja i dobijanje različitih derivata sekundarnih amina, jer ih možemo pronaći u velikom broju sekundarnih metabolita (prirodnih proizvoda). Zbog toga mnoga fiziološki aktivna jedinjenja poseduju jedan ili više hiralnih centara povezanih za azotov atom u obliku

sekundarnih amina, te se u poslednje vreme razvija sve više biokatalitičkih postupaka za njihovu sintezu upotrebom, imin-reduktaza i dehidrogenaza ^[7,8]. Tako se u poslednje vreme opin i oktopin dehidrogenaze tehnikama proteinskog inženjeringa sve više pretvaraju u moćne katalizatore za sintezu hiralnih i fiziološki aktivnih sekundarnih amina za primenu u farmaceutskoj industriji ^[9].

Reference:

1. Simon C. R., Richter N., Busto E., Kroutil W., Recent Developments of Cascade Reactions Involving ω – Transaminase, American Chemical Society, 2013.
2. Savile C. K., Janey J. M., Mundorff E. C., Moore J. C., Tam S., Jarvis W. R., Colbeck J. C., Krebber A., Fleitz F. J., Brands J., Devine P. N., Huisman G. W., Hughes G. J., Biocatalytic Asymmetric Synthesis of Chiral Amines from Ketones Applied to Sitagliptin Manufacture, *Science*, 305–309, 2010.
3. M. Svedendahl. Lipase and ω -Transaminase: Biocatalytic Investigations. Doctoral thesis. (KTH Royal Institute of Technology, School of Biotechnology, Stockholm; 2010).
4. Richter N., Simon C.R., Kroutil W., Wardd M. J. and Hailes C. H., Synthesis of pharmaceutically relevant 17- α -amino steroids using an ω -transaminase, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 6098-6100.
5. Sun B., Kantzow C., Bresch S., Castiglione K., Weuster-Botz D., Multi-Enzymatic One-Pot Reduction of Dehydro Multi-Enzymatic One-Pot Reduction of Dehydrocholic Acid to 12-Keto-Ursodeoxycholic Acid With Whole-Cell Biocatalysts, *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, **110**, 68-77.
6. Braun M., Link H., Liu L., Schmid R.D., Weuster-Botz D., Biocatalytic Process Optimization Based on Mechanistic Modeling of Cholic Acid Oxidation With Cofactor Regeneration, *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, **108**, 1307-1317.
7. Gand M., Muller H., Wardenga R., Hohne M., Characterization of three novel enzymes with imine reductase activity, *Journal of Molecular Catalysis B*: 2014, **110**, 126-132.
8. Mitsukura K., Kuramoto T., Yoshida T., Kimoto N., Yamamoto H., Nagasawa T., A NADPH-dependent (S)-imine reductase (SIR) from *Streptomyces* sp. GF3546 for asymmetric synthesis of optically active amines: purification, characterization, gene cloning, and expression, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, **97**, 8079-8086.
9. Haibin C., Collier S.J., Nazor J., Sukumaran J., Mooer J.C., Hughes G., Janey J., Huisman G., Novick S., Agard N., Alvizo O., Cope G., Yeo W.L., Stephanie N.G., Engineered Imine Reductase and Methods for the Reductive Amination of Ketone and Amine Compounds, US Patent, US20130302859A1, 2013.

6. Očekivani rezultati

U okviru rada na tezi trebalo bi da se razviju različite metode heterologne ekspresije omega-transaminaza u bakteriji *Echerichia coli* i kvascu *Saccharomyces cerevisiae* i njihovo testiranje kao katalizatora za dobijanje amino derivata različitih prirodnih proizvoda i steroida. U okviru navedenog, očekuje se i optimizacija procesa dobijanja amino derivata steroida u cilju povećanja prinosa korišćenjem imobilizacije enzima na različitim nosačima i na površini ćelija. Takođe se očekuje razvoj i optimizacija fluorescentnog enzimskog testa za detekciju aktivnosti i supstratne specifičnosti transaminaze.

Osim toga, očekuje se da se enzim oktopin-dehidrogenaza poreklom iz *Desulfohalobium retbaense* eksprimira u bakteriji *E. coli* BL21 i da se dobijeni protein okarakteriše, kao i da se razviju i optimizuju spektrofotometrijski i fluorimetrijski testovi za detekciju aktivnosti i određivanje supstratne specifičnosti dehidrogenaze. Potrebno je nakon toga ispitati upotrebljivost rekombinantne oktopin- i hidroksteroid-dehidrogenaze u procesu sinteze keto i sekundarnih amino derivata steroida.

Takođe se očekuje dobijanje različitih mutiranih varijanti enzima transaminaza i dehidrogenaza metodama proteinskog inženjeringa i njihovo testiranje razvijenim enzimskim testovima i visokoefikasnim metodama pretraživanja u reakcijama enzimskih modifikacija steroidnih jedinjenja.

Kao konačni rezultat ovih eksperimenata se očekuje sinteza rekombinantnim transaminazama i dehidrogenazama različitih amino derivata steroida koji bi mogli da se upotrebe za dobijanje fiziološki aktivnih jedinjenja sa potencijalnom primenom u farmaceutskoj industriji.

Zaključak

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

„Sinteza amino derivata steroida rekombinantnim transaminazama i dehidrogenazama“.

naučno zasnovana i da kandidat Nevena Marković, 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 Dušan Sladić, redovni profesor, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

3. dr Suzana Jovanović Šanta, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

U Beogradu,

26.12.2017.