

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

Odlukom Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta od 14. decembra 2017. godine određeni smo u komisiju za ocenu naučne zasnovanosti teme doktorske teze Nevene D. Zelenović, master biohemičara, pod naslovom:

„Proteinski inženjering hemicelulaze i celulaze iz gljive *Trichoderma reesei* u cilju dobijanja povećane aktivnosti i stabilnosti“

Na osnovu ove odluke Nastavno-naučnom veću, podnosimo sledeći

IZVEŠTAJ

A. Biografski podaci o kandidatkinji

Nevena (Dejan) Zelenović rođena je 21.02.1987. godine u Kragujevcu, Republika Srbija. Završila je osnovnu školu „Jovan Jovanović Zmaj“ i opšti smer gimnazije u Srednjoj školi „Svilajnac“ u Svilajncu. Hemijski fakultet, Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani biohemičar, upisala je 2006. godine. Diplomirala je 2011. godine na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na smeru Biohemija sa prosečnom ocenom 8,47 i ocenom 10 na diplomskom radu. Master akademske studije Biohemije upisala je 2011. godine na Hemijskom fakultetu i završila odbranom master teze 2012. godine sa prosečnom ocenom 9,60 i ocenom 10 na master radu. Iste godine upisuje doktorske akademske studije na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu.

Od 01.10.2013. do danas zaposlena je kao istraživač-pripravnik u Centru za elektrohemiju Instituta za Hemiju, tehnologiju i metalurgiju u Beogradu. Izabrana je u zvanje istraživač saradnik aprila 2015. godine. Član je Biohemijskog društva Srbije od 2017. godine.

B. Objavljeni naučni radovi i saopštenja

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

Radovi objavljeni u naučnim časopisima međunarodnog značaja (M20)

1. Tadić Vojin M., Balaž Ana Marija J., Petrić Marija P., Milošević Snežana M., **Zelenović Nevena D.**, Raspor Martin Z., Tadić Jovan M., Prodanović Radivoje M., "Cloning of the gene for a carbohydrate oxidase from *Lactuca sativa* in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*", *Hemijska Industrija*, 69 (6): 689-701 (2015). **M₂₃=3**

Saopštenja sa skupova međunarodnog značaja (M30)

1. **Nevena Zelenović**, Raluca Ostafe, Rainer Fischer, Radivoje Prodanović. Cellobiose dehydrogenase based screening system for directed evolution of cellulase from *Trichoderma reesei*. The Annual International Conference of the Romanian Society for Biochemistry & Molecular Biology. Timisoara, Romania. 8-9. jun 2017.
M₃₄=0,5
2. **Nevena Zelenović**, Raluca Ostafe, Rainer Fischer, Radivoje Prodanović. Directed evolution of cellulase from *Trichoderma reesei* for higher activity and development of microtiter plate assay based on cellobiose dehydrogenase. In: Proceedings of Serbian Biochemical Society. Seventh Conference. 10. November 2017. Belgrade, Serbia. pp 225-6.
M₃₄=0,5

Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja (M60)

1. Marija Blazic, Gordana Kovacevic, **Nevena Zelenovic**, Raluca Ostafe, Marija Gavrovic-Jankulovic, Rainer Fischer, Radivoje Prodanovic. Yeast surface display expression and purification of chimera glucose oxidase construct with Aga2 protein. Golden Jubilee Meeting of the Serbian Chemical Society. Belgrade, June, 2012.
M₆₃=0,5
2. Stančić A, Janković A, **Zelenović N**, Otašević V, Vučetić M, Buzadžić B, Korać A, Markelić M, Veličković K, Golić I, Korać B. Uloga glutationa u regulaciji molekulske osnove remodeliranja skeletnih mišića na hladnoći. Prvi kongres - Mitohondrije i slobodni radikali u biomedicini - perspektive. 24. septembar 2011, Beograd, Srbija, P 3, pp. 43, 2011.

M₆₄=0,2

C. Obrazloženje teme

1. Naučna oblast

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

2. Predmet rada

Predmet rada je dobijanje mutiranih varijanti enzima hemicelulaze i celulaze iz *Trichoderma reesei* u cilju povećanja aktivnosti i stabilnosti u odnosu na prirodne oblike enzima za upotrebu u različitim granama industrije kao što su tekstilna, industrija detergenata i biogoriva. Predmet rada se bazira i na razvoju i optimizaciji nove metode visokoefikasne pretrage biblioteke gena celulaze i hemicelulaze zasnovane na spektrofotometrijskim i fluorimetrijskim metodama i optimizaciji kuplovanog enzimskog testa sa celobiozo-dehidrogenazom i heksoza-oksidadom koji bi omogućio bržu pretragu biblioteka gena.

3. Naučni cilj istraživanja

U okviru ove teze formulisano je nekoliko ciljeva:

- a) Ekspresija hemicelulaze i celulaze iz *Trichoderma reesei* u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* InvSc1 u vidu vanćelijskog proteina i karakterizacija rekombinantnog proteina.
- b) Pravljenje biblioteka gena hemicelulaze i biblioteka gena celulaze metodom saturacione mutageneze i njihova ekspresija u vidu vanćelijskog proteina u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* InvSc1.
- c) Razvoj i optimizacija fluorescentnog enzimskog testa za hemicelulazu.
- d) Razvoj i optimizacija novog kuplovanog enzimskog testa sa celobiozo-dehidrogenazom za određivanje celulazne aktivnosti u mikrotitar pločama.

- e) Kloniranje i ekspresija celulaze i hemicelulaze u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 u vidu himere sa Aga2 proteinom prikazane na površini ćelija kvasca kao i karakterizacija dobijenog himernog proteina.
- f) Pravljenje biblioteka gena celulaze i hemicelulaze metodom polu-racionalnog dizajna u kvasca *Saccharomyces cerevisiae* EBY100.
- g) Razvoj i optimizacija metode za visokoefikasno pretraživanje biblioteke gena celulaze i hemicelulaze eksprimirane u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 zasnovane na fluorescentom enzimskom testu.
- h) Pretraživanje biblioteka gena celulaze i hemicelulaze eksprimiranih u kvascu *S.cerevisiae* u vidu vanćelijskog proteina i proteina prikazanog na površini ćelija kvasca ka povećanoj aktivnosti.
- i) Kloniranje, ekspresija i prečišćavanje odabranih mutanata nehimernog oblika celulaze i hemicelulaze u kvascu *Pichia pastoris* i detaljna karakterizacija kinetičkih parametara enzimske 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 hromatografija) u cilju izolovanja i prečišćavanja proteina; elektroforetske metode analize proteina (SDS PAGE i nativna PAGE); metode merenja enzimske aktivnosti na spektrofotometru i fluorimetru i u mikrotitar pločama.
- b) **Metode molekularne biologije:** PCR metoda za umnožavanje gena i pravljenje biblioteka gena; restrikciona digestija i ligacija gena u odgovarajući vektor; 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

Savremeno društvo se oslanja na korišćenje nafte, uglja i gasa za dobijanje energije i petrohemijskih. Međutim, kako zbog smanjenja zaliha nafte i gasa, tako i zbog efekta

staklene bašte, došlo se do saznanja da društvo mora da se posveti obnovljivim izvorima za proizvodnju energije i hemikalija, stoga postoji veliki interes u korišćenju biljne lignoceluloze za dobijanje biogoriva. Lignoceluloza se sastoji od tri glavne komponente: celuloze, hemiceluloze i lignina. Celuloza i hemiceluloza stoga predstavljaju najzastupljenije biopolimere u prirodi. Za degradaciju ovih prirodnih polimera do gradivnih jedinica, D-glukoze i D-ksiloze, odgovorne su grupe hidrolitičkih enzima: celulaze i hemicelulaze. Ovi enzimi predstavljaju proizvode gljiva i bakterija, od kojih su najproučavaniji iz roda *Aspergillus*, *Trichoderma* i *Bacillus* ^[1,2,3].

Hemicelulaze i celulaze pripadaju O-glikozidnim hidrolazama (EC 3.2.1.-) široko rasprostranjenoj grupi enzima koje hidrolizuju glikozidnu vezu. U hemicelulaze spadaju ksilanaze (EC 3.2.1.8), ksilozidaze (EC 3.2.1.37), mananaze (EC 3.2.1.78) i manozidaze (EC 3.2.1.25) ^[4]. Dok se celulozitički sistem deli na tri klase: celobiohidrolaze (CBH; EC 3.2.1.91), endoglukanaze (EG; EC 3.2.1.4) i β -glukozidaze (BGL; EC 3.2.1.21). Celulaze se sastoje od dve strukturno i funkcionalno odvojene jedinice, domena. Svi tipovi celulaza poseduju katalitički i supstrat vezujući domen koji je sličan domenima drugih enzima koji učestvuju u hidrolizi supstrata nerastvornih u vodi. Hemicelulaze imaju katalitički modul, ugljenohidratni modul koji omogućava vezivanje nerastvornog supstrata, kao i modul koji posreduje u uspostavljanju reakcija između katalitičkog modula sa jedne strane i površine mikrobne ćelije sa druge strane ^[4].

Ovi enzimi pripadaju klasi glikoproteina sa O- ili N-glikozilacijom, u zavisnosti od toga u kojoj vrsti se sintetišu. Poznato je da hemicelulaze i celulaze proizvedene u *T. reesei* nisu stabilne na visokim pH vrednostima, kao i visokim temperaturama. Rekombinantno dobijeni enzimi podležu glikozilaciji koja doprinosi katalitičkoj efikasnosti, pH- i temperaturnoj stabilnosti enzima i boljem vezujućem afinitetu ^[5,6].

Ovi enzimi su našli primenu u različitim granama industrije, uključujući prehrambenu, papirnu, tekstilnu, industriju detergenata i biogoriva. Mnogi industrijski procesi bi bili poboljšani ukoliko bi se poboljšale i osobine ovih glikozidnih hidrolaza, kao što su veća aktivnost pri fiziološkim uslovima, termo- i pH-stabilnost. Ovo se postiže proteinskim inženjeringom, ali je ograničavajući korak proces pretrage biblioteke gena ka varijantama enzima sa poboljšanim karakteristikama ^[7].

Proteinski inženjering je oblast koja se bavi dizajnom novih enzima koji će imati nove ili izmenjene osobine. Na ovaj način je moguće unaprediti osobine proteina. Racionalni dizajn,

dirigovana evolucija i polu-racionalni dizajn su tri pristupa u proteinskom inženjeru. Racionalni dizajn je najranije uvedeni pristup u proteinskom inženjeru koji zahteva detaljno poznavanje strukture proteina. Proces racionalnog dizajna uključuje izbor pogodnog enzima, identifikaciju aminokiseline koja je pogodna za aminokiselinsku promenu i karakterizacija mutanta. U mnogim slučajevima su podaci o proteinu limitirajući faktor, te se tada pribegava metodama dirigovane evolucije. U ovom pristupu su u širokoj upotrebi tehnike potpuno nasumične mutageneze poput reakcije lančane polimerizacije koja je sklona greškama (*engl.* error-prone PCR) ^[8].

U ovom pristupu proteinskog inženjeringa najsporiji korak predstavlja sama metoda pretrage tj. skrininga biblioteke gena ka varijantama enzima sa poboljšanim karakteristikama. Zato se razvijaju osetljivi enzimski eseji koji se mogu izvoditi u malim reakcionim zapreminama kao što su bunarčići u mikrotitar pločama i mikrokapljice na mikrofluidnim čipovima kako bi se u kratkom vremenskom intervalu obezbedila mogućnost merenja velikog broja uzoraka ^[9]. Zato je razvoj novih enzimskih eseja i njihova adaptacija za pretragu biblioteke gena u mikrotitar pločama i mikrokapljicama emulzija vode u ulju od velike važnosti za uspešnost eksperimenata u proteinskom inženjeru ^[10]. Zbog svega toga su i dalje veoma aktuelna istraživanja u ovoj oblasti koja imaju za cilj poboljšanje selektivnosti i osetljivosti metode pretrage biblioteke gena ka najaktivnijim varijantama enzima u populaciji kako bi se povećala uspešnost pronalaženja mutanta enzima sa povećanom aktivnošću.

1. Shallom D. i Shoham Y. Microbial hemicellulases. *Curr. Opin. Microbiol.* 6 (3):219–28, 2003.
2. Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 29(1):3–23, 2009.
3. Kubicek C.P., Mikus M.; Schuster A.; Schmoll M. i Seiboth B. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnol Biofuels.* 2: 19, 2009.
4. McCarter J.D., i Withers G.S. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4 (6): 885-92, 1994.
5. Qin Y., i Qu Y. Asn124 of Cel5A from *Hypocrea jecorina* not only provides the N-glycosylation site but is also essential in maintaining enzymatic activity. *BMB rep.* 47(5): 256-61, 2014.
6. Lee T.M., Farrow M.F., Arnold F.H. i Mayo S.L. A structural study of *Hypocrea jecorina* Cel5A. *Protein Sci.* 20 (11): 1935-40, 2011.
7. Schülein, M. Protein engineering of cellulases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1543(2):239-52, 2000.
8. Lutz S. Beyond directed evolution - semi-rational protein engineering and design. *Curr Opin Biotechnol.* 21(6): 734–743, 2010.
9. Johnsen H.R. i Krause K. Cellulase activity screening using pure carboxymethylcellulose: application to soluble cellulolytic samples and to plant tissue prints. *Int. J. Mol. Sci.* 15(1): 830-38, 2014.

10. Ostafe R., Prodanovic R, Lloyd Ung W, Weitz DA, Fischer R. A high-throughput cellulase screening system based on droplet microfluidics. *Biomicrofluidics*. 8(4): 041102, 2014

6. Očekivani rezultati

U okviru rada na tezi trebalo bi da se razviju nove metode heterologne ekspresije celulaze i hemicelulaze kao što je ekspresija enzima u vidu vanćelijskog proteina i himernog proteina prikazanog na površini ćelija kvasca. Nakon razvoja ekspresione metode očekuje se i dobijanje biblioteke gena celulaze i hemicelulaze polu-racionalnim dizajnom metodama saturacione mutageneze i mutageneze sa slučajnim greškama.

Takođe se očekuje i razvoj spektrofotometrijskog i fluorescentnog enzimskog testa za celulazu i hemicelulazu i njegova primena u visokoefikasnoj pretrazi biblioteka gena ka mutantima sa povećanom enzimskom aktivnošću. Razvijeni enzimski testovi će se primeniti u visokoefikasnoj pretrazi biblioteka gena ka mutantima sa povećanom enzimskom aktivnošću. Kao finalni rezultat ovih eksperimenata se očekuje dobijanje mutanata celulaze i hemicelulaze i celulaze koji su aktivniji i stabilniji u odnosu na prirodni oblik enzima, te samim tim i pogodniji za upotrebu u tekstilnoj, industriji detergenata i biosenzora.

Zaključak

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

„Proteinski inženjering celulaze i hemicelulaze iz gljive *Trichoderma reesei* u cilju povećanja enzimske aktivnosti i stabilnosti“

naučno zasnovana i da kandidat Nevena Zelenović, 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 Zoran Vujčić, redovni profesor, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

3. dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

U Beogradu,

28.12.2017.