

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ**

Предмет: Извештај о оцени научне заснованости и оправданости предложене теме за израду докторске дисертације дипл. мол. биол. физ. Луке Драгачевића

На редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду – Хемијског факултета, одржаној 11. јула 2019. године, одређени смо у Комисију за подношење извештаја о оцени научне заснованости и оправданости предложене теме за израду докторске дисертације дипломираног молекуларног биолога и физиолога **Луке Драгачевића**, под насловом:

**„Профилисање гликозилације протеина, мембранских и капсуларних структура
микроорганизама употребом биљних лектина“**

На основу поднете документације и увида у досадашњи рад **Луке Драгачевића**, Комисија подноси Наставно-научном већу Хемијског факултета, следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Биографски подаци о кандидату

Лука Драгачевић рођен је 8. септембра 1986. године у Београду, Република Србија. Завршио је природно–математички смер гимназије „Свети Сава“ у Београду. Основне академске студије, смер „Молекуларна биологија и физиологија“ на Универзитету у Београду – Биолошки факултет уписао је 2005. године, а дипломирао 2012. године са оценом 10 на дипломском раду „Генетички диверзитет маховине *Atrichum undulatum* у Европи“. Докторске студије, студијски програм „Биохемија“ на Универзитету у Београду – Хемијски факултет уписао је школске 2014. године. Кандидат је положио све планом и програмом предвиђене испите са просечном оценом 10,00 (десет и 100/100). Специјалистичке академске студије, студијски програм „Биолошки лекови“ на Фармацеутском факултету, Универзитета у Београду уписао је 2017. године, а дипломирао 2018., са оценом 10 и специјалистичким радом „Валидација процеса сплитовања сезонске инактивисане вакцине против грипа“.

Од августа 2012. године Лука Драгачевић запослен је у Институту за вирусологију, вакцине и серуме „Торлак“, где ради као сарадник у Одсеку за производњу вакцине против тетануса и где учествује у свим фазама производње и производне контроле. Од 2013. ради као сарадник у Одсеку за производњу вакцине против грипа. Почиње да ради на преносу технологије комплетног процеса производње сезонске, сплитоване и инактивисане вакцине против грипа и на увођењу процеса сплитовања вирусних честица вируса грипа и процеса инактивације вируса грипа бета-пропиолактоном. У периоду од 2015. до 2019. године, именован је за члана тима Института „Торлак“ у оквиру пројекта Светске Здравствене Организације *“Global Action Plan for Influenza”*, где учествује у производњи серија вакцине против грипа које ће се користити за предклиничка и клиничка испитивања, као и у свим пратећим процесима везанима за клиничка испитивања фазе 1 и фазе 3. Постављен је на место шефа Одсека за производњу вакцине против грипа 2017. године, на ком ради до 2019. године, на валидацији процеса производње сезонске вакцине против грипа, као и на дефинисању процеса производње пандемијске вакцине против грипа. У марту 2019. године почиње да ради на месту сарадника у Одсеку за научно-истраживачки рад Института „Торлак“, где се бави имунохемијским испитивањима, испитивањем интеракције микроорганизама са имунским системом са фокусом на испитивање површинске гликозилације микроорганизама уз помоћ биљних лектина.

Б. Објављени научни радови и саопштења

Лука Драгачевић до сада има 2 научна рада у међународним часописима, један у истакнутом међународном часопису (M22) и други у међународном часопису (M23). Кандидат такође има три саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M34).

Списак радова и саопштења наведен је у **Прилогу** извештаја.

В. Образложење теме

1. Научна област: Биохемија

2. Предмет рада

Микроорганизми на својој површини експримирају различите врсте полисахарида. Током еволуције они су стекли способност модификације постојећих и стварања нових група полисахарида што представља један од основних начина успостављања интеракција између микроорганизама и домаћина.

У оквиру ове докторске дисертације испитиваће се полисахаридне структуре на површини различитих микроорганизама, а преко којих они остварују директан контакт са рецепторним структурама на ћелијама домаћина и/или са варијабилним регионима антитета.

Циљ истраживања је да се коришћењем различитих биљних лектина, дефинисане специфичности, одреди природа површински доступних полисахаридних структура, као и афинитет везивања ових лектина за различите врсте микроорганизама. Методологија истраживања би обухватила култивисање различитих врста микроорганизама и коришћење биохемијских и имунохемијских метода за одређивање специфичности везивања и афинитета везивања лектина за површинске олигосахаридне структуре.

Након успостављања наведене методологије и добијања позитивних резултата везивања биљних лектина за површину микроорганизама, биће испитиван и утицај различитих температура чувања и утицај различитих фаза раста микроорганизама на експресију и структуру њихових површинских полисахарида.

3. Научни циљ истраживања

Површина микроорганизама је покривена угљеним хидратима, који су или везани за гликопротеине спољашњег омотача/ ћелијског зида или се налазе у саставу капсуларних полисахарида и/или липополисахарида. Ове површинске полисахаридне структуре могу да имају кључну улогу у интеракцијама микроорганизама са домаћином, а тип гликозилације утиче на способност микроорганизама да ступи у интеракцију са ћелијама домаћина и да оствари или симбиозу са домаћином или да реализује свој патогени потенцијал.

Типизацију и идентификацију површински доступних бактеријских полисахарида могуће је извршити уз помоћ лектина - протеина/гликопротеина који специфично везују угљене хидрате без испољавања ензимске активности у везивном месту. Карактеристика лектина је да поседују афинитет везивања за одређену групу/групе угљених хидрата. Степен интеракције молекула лектина са различитим микроорганизмима одређује број и површинска изложеност угљених хидрата спољашњег омотача. Лектини често имају способност аглутинације прокариотских и еукариотских ћелија. Инхибицију овакве аглутинације могуће је извршити моносахаридима или полисахаридима.

Научни циљ планираних истраживања у оквиру ове докторске дисертације подразумева одређивање специфичности и афинитета везивања биљних лектина за одабране врсте микроорганизама и дефинисање *Ензим-везаног лектин апсорпционог теста* - ELLSA (енглески: Enzyme-linked lectin sorbent assay) као методе за брзу анализу новоизолованих бактеријских сојева профилисањем полисахаридног састава који се налази на површини омотача.

Овај приступ с једне стране може имати значајну улогу у профилисању архитектуре површинских полисахарида микроорганизама и дефинисању природе интеракције између гликана микроорганизама и ендогених лектинских рецепторских структура његовог домаћина, што пружа увид у механизме модификације полисахаридног омотача у процесу избегавања имунског система домаћина и узајамних односа микроорганизама као што је нпр. конкуренција.

Такође, увођење ELLSA имало би велики практични значај јер би овом методом било могуће извршити релативно брзу претрагу специфичности новоизолованих лектина или генетски модификованих лектина, тј. дефинисати њихову специфичност на основу реактивности са микроорганизама познате површинске гликозилације, као и поређење њихове реактивности са реактивностима лектина познате специфичности према угљеним хидратима на површини микроорганизама.

Успостављање наведене ELLSA методе би могло да допринесе и процесу детекције и идентификације микроорганизама на месту инфекције.

4. Методе истраживања

Профилисање гликозилације урадиће се на различитим микроорганизмима користећи следеће биљне лектине:

- *Maackia amurensis* agglutinin – MAA,
- Soy bean agglutinin - SBA,
- *Lens culinaris* lectin - LCA,
- Wheat germ agglutinin - WGA,
- *Ulex europaeus* agglutin - UEA,
- *Ricinus communis* agglutinin - RCA₁₂₀,
- *Sambucus nigra* agglutinin I - SNA I,
- Concanavalin A - ConA,
- рекомбинантни *Musa acuminata* (банана) лектин - BL.

Кандидат ће за припрему биолошког материјала узгајати микроорганизме од интереса (који ће обухватати патогене микроорганизме, опортунистичке патогене и пробиотске микроорганизме) у одговарајућим медијумима, као што су: MRS broth, BHI broth, Nutritious broth, Sabouraud dextrose broth и др.

У свом раду докторанд ће користити или комерцијално доступне биљне лектине или ће лектине изоловати из природних извора, по дефинисаним протоколима, или модификацијом постојећих протокола.

Лектини ће за потребе детекције бити обележавани биотином. С обзиром на захтеве исказане у циљевима, у току израде ове докторске дисертације за одређивање концентрације, праћење чистоће лектина и успешности обележавања биће коришћене следеће аналитичке технике:

- Dot Blot и Western blot – за одређивање ефикасности биотинизације,
- Полиакриламидна гел електрофореза – за анализу чистоће биотинисаних лектина,
- Лоријева метода – за одређивање концентрације лектина у раствору након биотинизације.

Методологија идентификације специфичних интеракција биљних лектина са угљеним хидратима на површини микроорганизама засниваће се на новоуспостављеном ELLSA тесту. Овај тест ће представљати модификацију претходно валидираног теста, а обухватаће:

- Одређивање броја микроорганизама спектрофотометријом;
- Облагање микротитар плоча дефинисаним бројем микроорганизима;
- Серијску титрацију биотинисаних лектина и њихово везивање за микроорганизме;
- Детекцију везивања биотинилизованих лектина помоћу стрептавидином коњуговане алкалне фосфатазе и 4-нитрофенил фосфата као супстрата алкалне фосфатазе,

након чега ће се интензитет везивања биотинисаних лектина за микроорганизме проценити на основу интензитета апсорбације обојене реакције.

Детекција интеракција ће бити праћена и методама проточне цитометрије, биосензорима базираним на QCM технологији (quartz crystal microbalance - QCM) и флуоресцентном микроскопијом.

У циљу визуелизације интеракција, лектини који буду имали највећи афинитет према одређеним микроорганизмима биће коњуговани флуоресцеином како би се интеракција детектовала флуоресцентним методама.

5. Актуелност проблематике

Гликозилација је најзаступљенија посттранслациона модификација, идентификована је у свим живим организмима и утиче на бројне ћелијске процесе, укључујући сигналну трансдукцију, паковање протеина и имунски одговор домаћина. Поред наведеног, гликозилација утиче и на интеракцију између ћелија и микроорганизама, и самим тим представља кључни фактор вируленције многих микроорганизама (1). Угљени хидрати у форми капсуларних полисахарида и/или липополисахарида су најзаступљенија компонента на површини микроорганизама (2).

Познато је да су ове полисахаридне структуре на површини микроорганизама од кључног значаја приликом препознавања од стране имунског система домаћина, па се тако вакцинација против неких патогених бактерија заснива управо на вакцинацији слободним полисахаридним

компонентама или полисахаридним компонентама ковалентно везаним за протеинске носаче. Значај површинских угљених хидрата микроорганизама као битних имунолошких детерминанти познат је још од 1920. године, али су њихова истраживања донекле напуштена због открића и започињања широке примене антибиотика четрдесетих година XX века (2). Све учесталија појава резистенције микрорганизма на велики број антибиотика је поново усмерила пажњу истраживача на угљенохидратне антигенске детерминате микроорганизама са циљем проналажења антигена неопходних за покретање ефикасног имунског одговора домаћина.

Карактеристике лектина, као што су везивање угљених хидрата, аглутинација и преципитација ћелија чине их изузетно корисним у процесу профилисања полисахарида (дефинисања врсте и количине олигосахарида) на површини микроорганизама (3). Поред наведених, једна од додатних карактеристика лектина која помаже у дефинисању новоизолованих лектина јесте инхибирање везивања лектина за своје лиганде везане за чврсту фазу у растворима моно и/или олиго/полисахарида (4).

С обзиром на битну улогу гликана у биологији, добијање примарне секвенце пречишћених гликана неког протеина или неке супрамолекулске структуре је изузетно битан, али и често компликован процес. У новије време испитивања гликозилације протеина обухватају важно поглавље у области протеомике, а за циљ имају увођење биомаркера на бази антитела и/или лектина који везују гликан (5). Повећано интересовање за испитивање гликана је проишло из чињенице да анализом промена на нивоу експресије протеина, без обраћања довољно пажње на ефекте посттранслационих модификација, и то примарно гликозилације, не могу бити објашњени извесни биолошки феномени. Гликозилација бактеријских протеина је била нарочито слабо анализирана, између осталог и зато што протеини добијени рекомбинантном технологијом у бактеријама најчешће нису били гликозиловани. Како је гликозилација бактеријских протеина ипак присутна и може имати утицаја на имуногеност ових протеина, закључује се да је треба анализирати, као и међусобни однос површинске гликозилације микроорганизама и гликозилације цитоплазматских протеина микроорганизама (6).

Разноврсност гликана присутних у комплексним вишећелијским организмима је тешко прецизно одредити, али предпоставља се да „гликом“ једног организма чини 10^3 - 10^4 гликанских врста. Како је немогуће припремити антитела која су довољно специфична и високог афинитета да детектују све гликане, приступило се истраживању улоге лектина у дефинисању гликана неког организма. Постоји велики број лектина који имају широки спектар специфичног везивања за N-гликане (и високо манозног типа и комплексног типа са или без сијалинске киселине), O-гликане, и гликане гликолипидног типа. У поређењу са антителима, лектини показују слабији афинитет везивања, што је супротно пожељним карактеристикама биоаналитичких молекула (већа

специфичност и већи афинитет везивања). Међутим, управо релативно нижи афинитет и мања специфичност лектина се сматра корисном за профилисање гликана пошто се тако повећава број структура које могу да буду детектоване, а мањи афинитет у овом случају бива компензован повећаним авидитетом (јер се углавном ради о репетитивним структурама). Многи лектини показују унакрсну рективност са структурно сличним гликанима због чега се очекује да ће скуп лектина „покрити“ већи број структура него скуп антитела. Конвенционалне методе које се користе за анализу гликанских структура углавном се заснивају на HPLC-у (енглески: High-performance liquid chromatography), капиларној електрофорези, масеној спектрометрији, NMR-у (енглески: Nuclear magnetic resonance), танкослојној хроматографији и хемијској анализи. Технике ензимске и хемијске фрагментације су често неопходне, ради одвајања гликана од протеина за које су везани или од других високомолекулских структура, а ради олакшавања детекције често је неопходно и обележавање (7).

Битна предност употребе лектина у типизацији гликана је то што они препознају угљенохидратне низове у природној конформацији, тако да на основу интеракције са лектинима релативно лако можемо да дефинишемо гликане путем којих микроорганизми остварују интеракцију и улазак у циљне ћелије и ткива, и/или бивају препознати од стране ћелија имунског система домаћина.

У последње две деценије, развио се велики број гликанских тестова који се користе у процесу декодирања гликома. Развој гликанских микроесеја и њихова примена пружају детаљнији увид у улогу биљних, сисарских и микробних глико-везујућих протеина (8). Принцип гликанских микроесеја се базира на принципу препознавања полисахаридних структура лектинима, исто као и ELLSA метода, али са знатно већим бројем лектина. Данас се лектини користе: 1) за детекцију и изолацију гликопротеина, 2) за дефиницију структуре гликана на протеинима, 3) за профилисање угљених хидрата на површинама ћелија и органела, 4) за идентификацију ћелија, 5) за издвајање специфичних популација ћелија, 6) у хистохемији и цитохемији, 7) при мапирању неуро глико функција, 8) у дијагностичке сврхе (10).

С обзиром да у литератури не постоје подаци да је урађена компаративна анализа специфичности интеракције различитих биљних лектина са различитим микроорганизмима коришћењем ELLSA методе са имобилизованим микроорганизмима, предмет ове докторске дисертације је успостављање брзог начина детекције - *скрининга*, којим је могуће симултано тестирати реактивност већег броја микроорганизма са одређеним бројем лектина познате специфичности, а поређем интеракција и профилисати архитектуру полисахаридне структуре на површини микроорганизма.

6. Очекивани резултати

У оквиру предложених истраживања, у овој докторској дисертацији биће испитана специфичност и афинитет везивања различитих биљних лектина за мембранске и капсуларне структуре различитих микроорганизама.

Резултат ове докторске дисертације ће дати оригиналан научни допринос профилисању гликозилације површинских структура микроорганизама, која може бити од значаја за разумевање међусобних односа микроорганизама. Поред тога, добијени резултати требало би да пруже увид у начин интеракције микроорганизама са домаћином. Такође, очекује се да би резултати овог испитивања могли да доведу до развијања методе за претрагу новоизолованих бактеријских клонова за тражене селективне особине у смислу површинског састава полисахарида.

Добијени резултати биће од значаја и за анализу нових природних и рекомбинантних лектина непознате специфичности. Дефинисање њихове специфичности на основу поређења њихове реактивности и рективности већег броја лектина познате специфичности у ELLSA тесту је једноставније и временски и економски мање захтевно од примене конвенционалних метода за анализу гликана или примене лектинског микроесеја.

Добијени резултати ће бити објављени у врхунским научним часописима који су од значаја за ову научну област.

7. Литература

1. Nothaft H., Szymanski M.C. (2013). Bacterial Protein N-Glycosylation: New Perspectives and Applications. *Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.R112.417857
2. Weintraub A. (2003). Immunology of bacterial polysaccharide antigens. *Carbohydrate Research*. doi: 10.1016/j.carres.2003.07.008
3. Goldstein I.J., Hughes R.C., Monsigny M., Osawa T., Sharon N. (1980). What should be called lectin? *Nature*. doi: 10.1038/285066b0
4. Wu A.M., Sugii S., Herp A. (1988). A guide for carbohydrate specificities of lectins. *Adv.Exp. Med. Biol.* doi: 10.1007/978146131663337
5. Wu A.M., Lisowska E., Duk M., Yang Z. (2009). Lectins as tools in glycoconjugate research. *Glycoconjugate*. doi: 10.1007/s10719-008-9119-7
6. Vigerust D.J., Shepherd V.L. (2007). Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends Microbiol.* doi: 10.1016/j.tim.2007.03.003
7. Hirabayashi J. (2008). Concept, strategy and realization of lectin-based glycan profiling. *Journal Biochemistry*. doi: 10.1093/jb/mvn043
8. Wu C.Y., Liang P.H., Wong C.H. (2009). New development of glycan arrays. *Org.Biomol. Chem.* doi: 10.1039/b902510n
9. Gabius H.J., Andre S., Jimenez-Barbero J., Romero A., Solis D. (2011). From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. *Trends Biochem. Sci.* doi: 10.1016/j.tibs.2011.01.005

Г. Закључак

На основу свих елемената изложених у овом Извештају, Комисија је мишљења да је предложена тема докторске дисертације научно заснована и веома актуелна у свету и да ће добијени резултати дати значајан допринос у испитивању гликолизације полисахаридних структура на површини различитих микроорганизама, мерењем специфичности и афинитета интеракција са биљним лектинама.

У складу са законом о стицању академских степена и Статутом Хемијског факултета, сматрамо да кандидат Лука Драгачевић, студент докторских студија Биохемије, испуњава све потребне услове за одобравање израде докторске дисертације. Стога, предлажемо Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Хемијског факултета да Луки В. Драгачевићу, дипломираном молекуларном биологу и физиологу, одобри израду докторске дисертације под насловом:

„Профилисање гликозилације протеина, мембранских и капсуларних структура микроорганизама
употребом биљних лектина“

За менторе предлажемо др Наталију Половић, ванредног професора, Хемијског факултета, Универзитета у Београду и др Рајну Минић, вишег научног сарадника, Института за вирусологију, вакцине и серуме „Торлак“.

У Београду, 29.08.2019.

Комисија:

др Наталија Половић, ванредни професор,
Хемијски факултет Универзитета у Београду

др Рајна Минић, виши научни сарадник,
Институт за вирусологију, вакцине и серуме „Торлак“

др Марија Гавровић-Јанкуловић, редовни професор,
Хемијски факултет Универзитета у Београду

др Весна Илић, научни саветник,
Институт за медицинска истраживања Универзитета у Београду

др Милица Поповић, доцент,
Хемијски факултет Универзитета у Београду

Прилог: Библиографија кандидата категорисана према критеријумима Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије

Рад објављен у истакнутом међународном часопису M22:

1. Sabovljevic M, Vujcic M, Sinzar-Sekulic J, Segarra-Moragues JG, Bapp B, Skoric M, **Dragacević L**, Sabovljevic A. 2012. Reviving, in vitro differentiation, development and micropropagation of the rare and endangered moss *Bruchiavogesiacca* (Bruchiaceae). *HortScience* 47(9): 1347–1350.

Рад објављен у међународном часопису M23:

1. Pavlović B, Cvijetić N, **Dragačević L**, Ivković B, Vujić Z, Kuntić V. 2016. Direct UV Spectrophotometry and HPLC Determination of Triton X-100 in Split Virus Influenza Vaccine. *J AOAC Int.* 99(2):396-400.

Саопштења на научним скуповима међународног значаја штампана у изводу (M34):

1. Pavlović B, Cvijetić N, **Dragačević L**, Ivković B, Vujić Z, Kuntić V.J. 2014 HPLC method for determination of Triton X-100 in split influenza vaccine. VI International Pharmaceutical Conference, "Current Approach to Drug Design and Development/ New Challenges in Drug Analysis". Belgrade, Serbia, October 15-19, 2014.
2. Sabovljević M, **Dragačević L**, Vujičić M, Sabovljević A. 2012. Bryophyte diversity of the Balkans: an insight from molecular and biochemical markers. International Symposium on Evolution of Balkan Biodiversity. Zagreb, Croatia, June 28-30, 2012. Book of Abstracts p. 67.
3. Sabovljević M, **Dragacević L**, Živković S, Šinzar-Sekulić J, Vujičić M, Sabovljević A. 2012. 3rd Moscow International Conference Molecular Phylogenetics, MolPhy-3, Moscow, Russia, July 31 – August 4, 2012. Book of Abstracts p. 107.