

**НАСТАВНО – НАУЧНОМ ВЕЋУ
ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

ПРЕДМЕТ: Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације Ана Марије Балаж, мастер биохемичара

На редовној седници Наставно – научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду, одржаној 09.11.2017. године, одређени смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидаткиње Ана Марије Балаж, мастер биохемичара, истраживача сарадника Института за Хемију, Технологију и Металургију, под називом:

„Протеински инжењеринг целобиоза – дехидрогеназе из *Phanerochaete chrysosporium* у циљу повећања оксидативне стабилности за примену у биокатализи“

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је на седници одржаној дана 01.02.2018. године на захтев Хемијског факултета, дало сагласност на предлог теме докторске дисертације под редним бројем 61206–265/2–18.

Комисија је докторску дисертацију прегледала и Наставно – научном већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Ана Марије Балаж написана је на 193 стране, А4 формата, фонт 12, проред 1,5 и садржи 44 слике и 37 табела. Докторска дисертација је подељена на 8 поглавља: Увод (4 стране), Теоријски део (42 стране), Циљеви истраживања, (3 стране), Материјал и методе (43 стране), Резултати и дискусија (48 страна), Закључци (3 стране), Литература (12 страна, 208 цитата), Прилог (8 страна). Поред наведеног дисертација садржи и Насловне стране на српском и енглеском језику, Страну са именима чланова комисије, Захвалницу (4 стране), Сажетак на српском и енглеском језику (по 3 стране), Листу скраћеница (4 стране), Садржај (7 страна), Биографију кандидата (2 стране), Изјаву о ауторству (1 страна), Изјаву о истоветности (1 страна), и Изјаву о коришћењу (2 стране).

Увод садржи предмет истраживања ове докторске дисертације као и њене циљеве, уз осврт на актуелна истраживања која су од значаја за ову докторску дисертацију. Описана је употреба ензима у биокатализи, са освртом на целобиоза – дехидрогеназу, на њену производњу од стране гљива као и на њену примену и улогу у природи. На основу карактеристика целобиоза – дехидрогеназе објашњене су потенцијалне примене ензима које су послужиле као смернице приликом израде ове докторске дисертације.

Теоријски део је подељен на пет целина. У целини *Микробиолошка разградња дрвета*, говори се о природним гљивама присутним на дрвенастим биљкама које излучују целобиоза – дехидрогеназу, као и о њиховом механизму дејства на структуру дрвета, односно целулозу. Друга целина *Целобиоза – дехидрогеназа* подразумева неколико делова у којима су описане опште карактеристике ензима као и његове структурне карактеристике, каталитички механизам дејства и биолошка функција. Такође је дат кратак приказ примене целобиоза – дехидрогеназе. Након детаљног приказа карактеристика целобиоза – дехидрогеназе, трећа целина под називом *Зелени флуоресцентни протеин* приказује опште и структурне карактеристике флуоресцентних протеина и могућу примену. *Протеински инжењеринг* је коришћен за добијање мутираних варијанти гена целобиоза – дехидрогеназе како би се добио ензим са измењеним особинама, стога су технике које су коришћене у изради ове

докторске дисертације описане у овој целини. Предности и мане коришћених експресионих система су описане у целини *Експресиони системи*.

Циљеви истраживања садрже кратак преглед истраживања приказаних у овој докторској дисертацији.

Материјал и методе садрже детаљан опис опреме, реагенаса и узорака као и експерименталних метода и процедура коришћених у овој докторској дисертацији.

Резултати и дискусија приказују резултате добијене током израде ове докторске дисертације који су детаљно прокоментарисани и подељени у пет целина. Прва целина приказује резултате добијене током развоја флуоресцентног есеја за високо ефикасну претрагу библиотека гена целобиоза – дехидрогеназе. Резултати добијени експресијом и приказивањем целобиоза – дехидрогеназе на површини ћелија квасца, као и анализа креираних библиотека гена употребом природног облика ензима, приказани су у другој целини. Трећа целина приказује резултате добијене током семи – рационално дизајна целобиоза – дехидрогеназе за продукцију мутираних форми ензима за повећање оксидативне стабилности у присуству водоник пероксида. Добијени мутанти су клонирани и експримирани у квасцу *Pichia pastoris*, након чега су пречишћени и детаљно окарактерисани и ови резултати су приказани у четвртој целини. Финално, у петој целини су приказани резултати производње лактобионске киселине употребом целобиоза – дехидрогеназе и лаказе.

Закључак садржи најрелевантније резултате претходно приказане у докторској дисертацији.

Литература обухвата радове који покривају све сегменте и истраживања приказане у докторској дисертацији.

Прилози приказују додатне резултате релевантне за истраживања из докторске дисертације, као што су нуклеотидне секвенце прајмера коришћених приликом клонирања гена целобиоза – дехидрогеназе, као и прикази хроматографских пречишћавања мутираних варијанти ензима.

Б. Кратак приказ резултата

Током израде ове докторске дисертације рађено је на развоју флуоресцентног есеја базираног на аминоксифенил-флуоресцеину и способности целобиоза – дехидрогеназе да у присуству водоник пероксида и јона гвожђа катализује формирање хидроксил радикала. Хидроксил радикал у присуству флуорогене пробе катализује њено превођење у флуоресцентно једињење, у овом случају флуоресцеин. Количина детектоване флуоресценције пропорционална је ензимској активности. Развој флуоресцентног есеја је имао за циљ његову употребу у високо ефикасној методи за претрагу библиотеке гена целобиоза – дехидрогеназе.

Експресијом и приказивањем природног облика целобиоза – дехидрогеназе на површини ћелија квасца није добијена детектабилна ензимска активност, због чега се приступило креирању библиотеке гена целобиоза – дехидрогеназе. Анализом добијених библиотека детектован је троструки мутант целобиоза – дехидрогеназе (Д20Н, А64Т, В592М) чија се активност могла детектовати на површини ћелија квасца и који је коришћен у даљим експериментима.

Семи-рационалним дизајном, као једном од метода протеинског инжењеринга, креиране су сатурационе библиотеке гена које су потом анализирани како би се детектовали мутанти са повећаном стабилности у присуству водоник пероксида, као реактивне кисеоничне врсте, у односу на природни облик ензима. За креирање сатурационих библиотека гена одабране су три позиције метионина (М65, М685, М738) најближе каталитичким аминокиселинама у активном месту ензима. Добијене библиотеке гена су анализирани и селектовани су мутанти, који су показивали повећану оксидативну стабилност у присуству водоник пероксида у односу на природни облик ензима, након чега су пречишћени и окарактерисани.

Троструки мутант добијен током претраге библиотеке гена са целобиоза-дехидрогеназом приказаном на површини ћелија квасца, као и мутанти стабилнији у присуству водоник пероксида у односу на природни облик ензима, су клонирани и

експримирани у *Pichia pastoris* KM71H соју, како би се произвела већа количина ензима за даље пречишћавање, детаљну кинетичку карактеризацију и примену.

Приказивање ензима на површини ћелија квасца представља јединствен начин имобилизације ензима и одржавања везе између фенотипа и генотипа. Приказивање троструког мутанта на површини ћелија квасца, а потом лиза ћелија и формирање ћелијских зидова са имобилизованим ензимом је искоришћено за производњу лактобионске киселине. Приликом производње лактобионске киселине искоришћен је и ензим лаказа, за реоксидацију редокс медијатора. Производња лактобионске киселине употребом ензима имобилизованог на ћелијским зидовима је била недовољно ефикасна, услед чега је урађена и оптимизација производње лактобионске киселине употребом целобиоза-дехидрогеназе експримиране у квасцу *Pichia pastoris* KM71H.

В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Гљиве беле трулежи *Phanerochaete chrysosporium* производе велике количине целобиоза – дехидрогеназе, око 0,5% од укупно продукованих ензима, међутим како би било могуће анализирати и увести модификације у ензим употребом метода протеинског инжењеринга неопходно је ген за целобиоза – дехидрогеназу клонирати у неки од експресионих система са развијеним ефикасним методама клонирања и трансформације. У овој докторској дисертацији коришћен је квасац као експресиони систем и у зависности од постављених циљева употребљено је неколико сојева квасаца.

Експресијом ензима и приказивањем на површини ћелија квасца остварује се спона између фенотипа и генотипа, што приликом креирања библиотека гена омогућава веома лаку претрагу библиотеке гена, анализу секвенце и детекцију положаја мутација. Експресијом природног облика целобиоза – дехидрогеназе није детектована ензимска активност на површини ћелија квасца, након чега је креирањем библиотека гена добијен троструки мутант који је показивао активност. До сада у литератури није

било описано приказивање целобиоза-дехидрогеназе на површини ћелија квасца, иако је рађена експресија датог ензима у квасцима.

Показано је да је квасац *Saccharomyces cerevisiae* InvSc 1 погодан експресиони систем за оксидо – редуктазе, те самим тим представља и добар избор за експресију целобиоза – дехидрогеназе. Квасци као и остали еукариотски експресиони системи имају способност посттранслационих модификација протеина што их чини посебно погодним за експресију еукариотских протеина. Управо овај сој квасца је искоришћен за креирање сатурационих библиотека мутаната целобиоза – дехидрогеназе који су потом анализирани на оксидативну стабилност у присуству водоник пероксида. Квасац *Saccharomyces cerevisiae* InvSc 1 је до сада коришћен за експресију целобиоза – дехидрогеназе из *Mycrococcum thermophilum* при чему је показано да је погодан за дириговану еволуцију ензима, док је у овој дисертацији по први пут искоришћен за експресију библиотека гена истог ензима из гљиве *Phanerochaete chrysosporium*. Целобиозо-дехидрогеназа налази примену у биосензорима и пожељно је да поседује повећану активност и стабилност у присуству рекативних кисеоничних врста који настају приликом употребе ензима. У овој докторској дисертацији применом наведеног експресионог система добијени су мутанти који су показивали значајно повећану оксидативну стабилност у присуству водоник пероксида у односу на природни облик ензима.

Квасац *Saccharomyces cerevisiae* InvSc 1 због наведених особина представља један од најкоришћенијих експресионих система за дириговану еволуцију протеина. Ипак због своје особине да хипергликозиљује ензиме што може да утиче на активност самог ензима, након креирања и селекције мутираних варијанти ензима, често се мутирани гени клонирају у квасац *Pichia pastoris*, ради ефикасније експресије више активног а мање гликозилованог, облика ензима. Експресијом мутаната целобиоза – дехидрогеназе у квасцу *Pichia pastoris* показано је да је могућа продукција већих количина ензима, који могу наћи примену за конструисање биосензора и биогоривних ћелија и производњу лактобионске киселине.

Г. Објављени радови и саопштења који чине део докторске дисертације

Из резултата ове докторске дисертације проистекла су два научна рада од којих је један публикован у истакнутом међународном часопису (категорија М22), а други у међународном часопису (категорија М23), као и три саопштења од којих је једно саопштење са међународног скупа штампано у изводу (категорија М34), а два саопштења са скупова националног значаја штампана у изводима (категорија М64).

1. Објављени радови

Истакнути међународни часопис (М22)

Balaž AM, Stevanović J, Ostafe R, Blažić M, Ilić Đurđić K, Fischer R, Prodanović R. Semi-rational design of cellobiose dehydrogenase for increased stability in the presence of peroxide. *Molecular Diversity* (2019).

<https://doi.org/10.1007/s11030-019-09965-0>

ИФ=2,229 (2017)

Поље истраживања: Хемија 83/171 (2017)

ISSN: 1573-501X

Међународни часопис (М23)

Balaž AM, Blažić M, Popović N, Prodanović O, Ostafe R, Fischer R, Prodanović R. Expression, purification and characterization of cellobiose dehydrogenase mutants from *Phanerochaete chrysosporium* in *Pichia pastoris* KM71H strain. *Journal of the Serbian Chemical Society*, accepted (2019).

<https://doi.org/10.2298/JSC190320058B>

ИФ= 0,828 (2018)

Поље истраживања: Хемија 140/172 (2018)

ISSN: 1820-7421

2. Саопштења са међународних скупова штампана у изводима (М34)

Ana Marija Balaž, Raluca Ostafe, Rainer Fischer, Radivoje Prodanović. Semi rational design of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* for increased oxidative stability. The Annual International Conference Romanian Society for Biochemistry & Molecular Biology 8 – 9 June 2017, Timisoara, Romania, S4_P7. ISSN 293-2171; ISSN-L 2393-2171.

3. Саопштења са скупова националног значаја штампана у изводима (M64)

Ana Marija Balaž, Radivoje Prodanović. Cloning and expression cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* as himera with enhanced green fluorescent protein from *Aequoera victoria*. 2nd Conference of the Young Chemists of Serbia, Niš, 7 jun, 2014, Book of Abstracts BBO03, p.125 (2014).

Ana Marija Balaž, Raluca Ostafe, Radivoje Prodanović. Oxidative stability of cellobiose dehydrogenase. 4nd Conference of the Young Chemists of Serbia, Belgrade 2016, Book of Abstracts BBP07, p.70 (2016).

Поред наведених публикација и саопштења који су проистекли из ове дисертације, кандидат је коаутор на још четири научна рада од којих је један из категорије M21 часописа, док су два из категорије M22 и један из категорије M23 часописа.

Д. Провера оригиналности докторске дисертације

Оригиналност докторске дисертације Ана Марије Балаж је проверена употребом програма *iThenticate* на начин прописан Правилником о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета у Београду, бр. 204/22.06.2018.). Утврђено је да је степен подударности од 18% настао као последица цитата, личних имена, библиографских података коришћених у литератури, тзв. општих места и података у вези са темом

дисертације, као и претходно публикованих резултата истраживања проистеклих из дисертације, што је у складу са чланом 9. овог Правилника.

Стога сматрамо да је утврђено да је докторска дисертација Ана Марије Балаж у потпуности оригинална, као и да су у потпуности поштована академска правила цитирања.

Ђ. Закључак

На основу приказаних података и резултата, Комисија је закључила да је у поднетој дисертацији под називом „**Протеински инжењеринг целобиоза – дехидрогеназе из *Phanerochaete chrysosporium* у циљу повећања оксидативне стабилности за примену у биокатализи**“, кандидат Ана Марија Балаж успешно одговорила на задате циљеве у оквиру којих је развила флуоресцентни есеј заснован на аминокиселинско-фенил флуоресцеину, погодан за високо ефикасну претрагу библиотека гена целобиоза – дехидрогеназе, и испитала утицај аминокиселинске секвенце ензима на његову активност и стабилност. Приликом израде докторске дисертације, кандидат је успешно конструисао неколико мутираних облика ензима који показују повећану активност и стабилност у присуству водоник-пероксида и који се могу употребити у биосензорима, биогоривним ћелијама и за производњу лактобионске киселине.

Резултати научно – истраживачког рада кандидата постигнути у оквиру ове докторске дисертације су објављени у два научна рада, један у истакнутом међународном часопису (категорије M22) и један у међународном часопису (категорије M23), а који су уједно од великог значаја за разумевање механизма дејства ензима и примену целобиоза – дехидрогеназе у биокатализи. Резултати добијени током израде докторске дисертације су приказани и саопштени и на једном међународном скупу, као и на два скупа од националног значаја.

На основу изложеног Комисија предлаже Наставно – научном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду, да поднету докторску дисертацију Ана Марије Балаж под насловом „**Протеински инжењеринг целобиоза – дехидрогеназе из**

Phanerochaete chrysosporium у циљу повећања оксидативне стабилности за примену у биокатализи“ прихвати и одобри њену одбрану за стицање академског звања доктора биохемијских наука.

Београд,

08.10.2019.

КОМИСИЈА:

др Радивоје Продановић
ванредни професор Универзитета у Београду-Хемијског факултета

др Марија Гавровић Јанкуловић
редовни професор Универзитета у Београду-Хемијског факултета

др Наталија Половић
ванредни професор Универзитета у Београду Хемијског факултета

др Оливера Продановић
научни сарадник Института за мултидисциплинарна истраживања
Универзитета у Београду