

ПРИМЉЕНО: 13. 8. 2018.			
Орг. јед.	Број	Прилог	Вредности
	12236		

Наставно научно већу
Хемијског факултета
Универзитета у Београду

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду одржаној 12.11.2015. године одређени смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације мастер биохемичара Гордане Ковачевић под насловом:

„Протеински инжењеринг и развој високоефикасних метода за претраживање библиотеке гена глукоза-оксидазе из *Aspergillus niger* у циљу повећања ензимске активности и стабилности“

Поднету дисертацију смо прегледали и подносимо Наставно-научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Гордане Ковачевић написана је на 114 страна, А4 формата и садржи 27 слика и 11 табела. Рад обухвата Увод (2 стране), Теоријски део (27 страна), Циљеви истраживања (1 страна), Материјал и методе (31 страна), Резултати и дискусија (32 стране), Закључци (2 стране), Литература (17 страна, 203 цитата) и Прилози (2 стране). Поред наведеног, дисертација садржи извод на српском и енглеском језику (по 3 стране), Садржај (3 стране), Листу скраћеница (2 стране), Захвалницу (1 страна) и Биографију кандидата (1 страна).

У Уводу је описан предмет истраживања ове докторске дисертације као и њени циљеви. Истакнути су значај и ограничења примене ензима у индустрији, са посебним освртом на глукоза-оксидазу, као и методе којима се ензими могу унапредити. Такође су идентификоване особине глукоза-оксидазе које је неопходно побољшати за њену ширу индустријску примену, као и опис до сада развијених метода претраживања које су довеле до проналажења активнијих варијанти глукоза-оксидазе.

Теоријски део обухвата пет већих целина. У првој целини је детаљно описан механизам реакције глукоза-оксидазе, њене структурне и кинетичке карактеристике, стабилност и примена. Друга целина даје општи приказ протеинског инжењеринга и метода које се користе за конструисање библиотека гена. У трећој целини је дат приказ различитих квашчевих експресионих система и њихове предности и недостаци. Четврта

целина описује методе за претраживање библиотека гена, као и до сада развијене методе за претраживање библиотека гена глукоза-оксидазе, док пета целина даје приказ употребе зеленог флуоресцентног протеина као обележивача локације и експресије протеина.

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

У делу **Резултати и дискусија** кандидаткиња је приказала и детаљно продискутовала добијене резултате у три целине. Најпре су приказани резултати експресије, пречишћавања и карактеризације дивљег типа и M12 мутанта глукоза-оксидазе у квасцу *Pichia pastoris* упоређених са експресијом истих варијанти у квасцу *Saccharomyces cerevisiae*. У другој целини испитиван је утицај позиције метионина на оксидативну стабилност глукоза-оксидазе, и изоловани су и окарактерисани мутанти са повећаном активношћу и оксидативном стабилношћу. Такође је приказан развој методе за претраживање библиотеке гена глукоза-оксидазе у циљу проналажења оксидативно стабилнијих варијанти ензима. У трећој целини приказани су резултати развоја високо ефикасне методе претраживања библиотеке гена глукоза-оксидазе засноване на проточној цитометрији и експресији зеленог флуоресцентног протеина као маркера количине експримиране глукоза-оксидазе.

У **Закључку** кандидаткиња је сумирала резултате добијене у току израде докторске дисертације.

У поглављу **Литература** су наведени радови из области истраживања који покривају све делове дисертације.

У **Прилозима** су дате нуклеотидне секвенце прајмера коришћених у процедурама клонирања.

Б. Кратак приказ резултата

У овој докторској дисертацији испитивана је могућност експресије глукоза-оксидазе у квасцу *Pichia pastoris* у циљу превазилажења ниског приноса и ниске специфичне активности ензима експримираних у квасцу *Saccharomyces cerevisiae*. Показано је да ензим експримиран у квасцу *Pichia pastoris* има нижи степен гликозилације у односу на ензим експримиран у *Saccharomyces cerevisiae*, што је допринело троструком повећању специфичне активности. Мутант M12 експримиран у овом квасцу има 4 пута већу константу специфичности на физиолошком рН у односу на дивљи тип ензима, као и три пута повећану активност са редокс медијатором нитрозо-анилином, чиме је показан његов потенцијал за употребу у биосензорима и биогоривним ћелијама.

Метионин је идентификован као аминокиселина која је најчешће подложна оксидацији реактивним оксидативним врстама, стога је испитиван утицај његове позиције у односу на активно место глукоза-оксидазе на оксидативну стабилност ензима. Показано је да мутације на метионинским остацима које се налазе у близини

активног места највише доприносе повећању оксидативне стабилности, и да комбинацијом појединачних мутација не долази до додатног повећања стабилности. Пронађен је мутант глукоза-оксидазе који има два и по пута побољшану оксидативну стабилност, као и мутант који има три пута већу константу специфичности, у односу на дивљи тип ензима. Најстабилнији и најактивнији мутанти глукоза-оксидазе су пречишћени и окарактерисани. Упоредивањем резидуалних активности након третмана водоник-пероксидом пречишћених варијанти глукоза-оксидазе имобилизоване на макропорозном кополимеру и истих варијанти ензима експримираних на површини ћелија квасца, показано је да је систем експресије на површини квасца успешно примењен за претраживање библиотеке мутаната за побољшану оксидативну стабилност.

На крају ове дисертације, описан је развој методе високо ефикасне методе претраживања библиотеке гена глукоза-оксидазе која се базира на проточној цитометрији. Метода се заснива на детекцији глукоза-оксидазне активности користећи флуоресцентне деривате тирамида, и квантификацији експримираног ензима на површини ћелија квасца помоћу зеленог флуоресцентног протеина. Описана је оптимизација реакционих услова, и показано је да коришћење зеленог флуоресцентног протеина омогућава брже и ефикасније претраживање и сортирање библиотеке гена глукоза-оксидазе. Овом методом пронађена су два мутанта, који имају 1,3 и 2,3 пута већу активност на физиолошком рН у односу на дивљи тип ензима.

Ц. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

У производњи рекомбинантних еукариотских протеина квасац *Saccharomyces cerevisiae* је један од најчешће коришћених експресионих система, због лаке манипулације и гајења. Производња глукоза-оксидазе у овом квасцу је показала одређена ограничења у виду ниског приноса и хипергликозилације, која доводи до значајно смањене специфичне активности ензима у односу на ензим изолован из *Aspergillus niger*, чиме је ограничена његова примена. Са развојем метода мутагенезе и претраживања библиотека гена, добијени су мутанти глукоза-оксидазе који имају бољу активност и температурну стабилност у односу на дивљи тип ензима. Због наведених недостатака *Saccharomyces cerevisiae* у производњи глукоза-оксидазе уочена је потреба за експресионим системом којим ће се добијати грамске количине хетерологног протеина по литри ферментационе течности и у коме ће експримирани ензим имати већу специфичну активност. У овој дисертацији је испитивана експресија мутаната и дивљег типа ензима у квасцу *Pichia pastoris*, и у поређењу са литературним подацима за експресију у *Saccharomyces cerevisiae* добијене су троструко веће вредности за специфичну активност, чиме је показано да се овај квасац може користити за производњу глукоза-оксидазе на великој скали, која даље може имати различите примене у прехранбеној и фармацеутској индустрији.

Индустријска употреба глукоза-оксидазе је лимитирана њеном инактивацијом водоник-пероксидом који настаје као производ оксидације глукозе. Ароматичне аминокиселине (хистидин, триптофан, фенилаланин, тирозин) као и оне које садрже

сумпор (цистеин и метионин) су подложне оксидацији реактивним оксидативним врстама, и ранија истраживања су показала да оксидација метионина у метионин сулфоксид има посебно дестабилишући ефекат на структуру протеина. У литератури је постулирано да на оксидацију метионина велики утицај има његова изложеност растварачу. Прегледом литературе је такође уочено да у случају глукоза-оксидазе постоји индиција да оксидација једног метионинског остатка, највероватније у близини активног места, доводи до значајне инактивације ензима. Инактивација глукоза-оксидазе у присуству вишка водоник-пероксида се дешава када ензим активно оксидује глукозу, и у овој дисертацији је анализиран утицај позиције 11 метионинских остатака на оксидативну стабилност ензима. Показано је да позитиван утицај на оксидативну стабилност глукоза-оксидазе имају мутације на три метионинска остатка у близини активног места, а мутација на једној позицији је имала највећи допринос повећавајући оксидативну стабилност 2,5 пута у односу на дивљи тип ензима. Овим је потврђена почетна претпоставка и идентификован је метионински остатак чијом оксидацијом долази до инактивације ензима. С обзиром да се ови метионини налазе у унутрашњости ензима, њихова доступност растварачу је ограничена и самим тим је његов утицај на оксидацију ових метионина мали.

Проналажење мутаната глукоза-оксидазе који су активнији и стабилнији може бити веома дуготрајно уколико не постоје високо ефикасне методе претраживања. До сада је развијено неколико метода за претраживање библиотека гена глукоза-оксидазе базираних на проточној цитометрији, а најефикаснијом се до сада показала метода обележавања флуоресцентним тирамидом ћелија квасца које експримирају на својој површини глукоза-оксидазу. Овом методом је могуће квантитативно одредити ћелије са највећом ензимском активношћу, али интезитет флуоресценције зависи и од количине протеина експримиране на површини ћелија. Да би упростили квантификацију количине експримираног ензима на површини квасца и прецизније одредили специфичну активност ензима проточном цитометријом, у овој дисертацији тестирана је употреба зеленог флуоресцентног протеина као фузионог партнера са глукоза-оксидазом где би интезитет зелене флуоресценције био мера количине експримираног протеина, а интезитет црвене флуоресценције деривата тирамида мера ензимске активности. У једној рунди сортирања проценат ензимских варијанти активнијих од дивљег типа је повећан са 23% на 44%, што је ефикасније од до сада публикованих литературних резултата.

Д. Објављени радови и саопштења који чине део дисертације

1) Објављени радови

1. **Gordana Kovačević**, Raluca Ostafe, Ana Marija Balaž, Rainer Fischer, Radivoje Prodanović (2018). Development of GFP-based high-throughput screening system for directed evolution of glucose oxidase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. In press. doi:10.1016/J.JBIOOSC.2018.07.002 (M21, ИФ 2016: 2.24)

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172318303128>

2. **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 (M22, ИФ 2013: 2.262)

<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12033-013-9709-x>

2) Радови у припреми

1. **Gordana Kovačević**, Raluca Ostafe, Rainer Fischer, Radivoje Prodanović. **Influence of methionine residue position on glucose oxidase oxidative stability.**

3) Саопштења

1. **Gordana Kovacevic**, Radivoje Prodanovic, "Protein engineering and development of high-throughput screening methods for glucose-oxidase gene library", 7th *Conference of the Serbian Biochemical Society*, Belgrade 2017, Book of abstracts p.145-147 (2017) (M34)
2. **Gordana Kovačević**, Dušan Petrović, Raluca Ostafe, Rainer Fischer, Birgit Strodel, Radivoje Prodanović, "Semi-rational design of glucose oxidase from *Aspergillus niger* for the increased oxidative stability", *The 7th EMBO Meeting*, Mannheim 2016 (2016) (M34)
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) (M34)

Е. Закључак

На основу свега изложеног, може се закључити да је у поднетој дисертацији под насловом „Протеински инжењеринг и развој високоефикасних метода за претраживање библиотеке гена глукоза-оксидазе из *Aspergillus niger* у циљу повећања ензимске активности и стабилности”, кандидат Гордана Ковачевић успешно одговорила на постављене задатке који се односе на испитивање утицаја структуре на активност и стабилност глукоза-оксидазе, као и на развој нових високоефикасних метода за претраживање библиотеке гена глукоза-оксидазе у циљу повећања њене активности и стабилности. Резултати истраживања проистекли из ове дисертације су објављени у једном раду штампаном у врхунском међународном часопису (M21), једном раду штампаном у истакнутом међународном часопису (M22) и три рада штампана у форми саопштења на три научна скупа (M34). Резултати ове дисертације су од фундаменталног биохемијског значаја јер доприносе разумевању утицаја протеинске структуре на стабилност и активност ензима глукоза-оксидазе. На основу свега изложеног Комисија предлаже Наставно-научном већу Хемијског факултета

Универзитета у Београду, да поднету докторску дисертацију Гордане Ковачевић под насловом „Протеински инжењеринг и развој високоефикасних метода за прстраживање библиотеке гена глукоза-оксидазе из *Aspergillus niger* у циљу повећања ензимске активности и стабилности” прихвати и одобри њену одбрану за стицање академског звања доктора биохемијских наука.

Београд, 13.08.2018.

КОМИСИЈА:

Радивоје Продановић

др Радивоје Продановић
ванредни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду

М. Гавровић Јанкуловић

др Марија Гавровић Јанкуловић
редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду

Рада Баошић

др Рада Баошић
ванредни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду

Јасмина Никодиновић-Рунић

др Јасмина Никодиновић-Рунић
научни саветник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство
Универзитета у Београду