

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА

ПРЕДМЕТ: Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације Милице В. Радибратовић, мастер хемичара

На редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Хемијског факултета одржаној 13. децембра 2018. године одређени смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације **Милице В. Радибратовић**, мастер хемичара, под називом:

„Теоријско проучавање конформационих промена албумина приликом везивања биоактивних лиганда из хране“.

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је, на својој седници одржаној дана 31.10.2019. године, на захтев Хемијског факултета, дало сагласност на предлог теме докторске дисертације (број одлуке: 02-07 61206-1806/6-19 МЦ).

Комисија је докторску дисертацију прегледала и подноси Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Хемијског факултета следећи:

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Милица В. Радибратовић, написана је на укупно 161 страни А4 формата (фонт Times New Roman величине 12 pt, са проредом 1,5). Дисертација обухвата следећа поглавља: 1. Увод (2 стране), 2. Општи део (76 страна), 3. Циљеве (2 стране), 4. Експериментални део (5 страна), 5. Резултати и дискусија (44 стране), 6. Закључци (2 стране), 7. Литература (30 страна, 264 цитата). Садржи 52 слике, 9 табела, 6 графика, 38 једначина и 3 шеме. Поред наведеног, дисертација на једној

страни садржи податке о менторима и члановима Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације, Извод на српском и енглеском језику (по 2 стране, односно до 1800 словних знакова с проредом), Листу скраћеница (3 стране), Захвалницу (1 страна), Садржај (4 стране). У Прилогу се налази и Биографија кандидата, Изјава о ауторству, Изјава о истовестности штампане и електронске верзије дисертације и Изјава о коришћењу.

У **Уводу** је описан предмет истраживања и укратко је описана улога и значај испитиваних албумина (хуманог серум албумина (ХСА) и α -лакталбумина (АЛА)) и биоактивних лиганата из хране (фикоцијанобилина и епигалокатехин-3-галата (ЕГЦГ)). Истакнут је значај теоријске хемије, односно, рачунарских метода које су коришћене у овој дисертацији, за проучавање утицаја везивања лиганата из хране на промену конформације протеина.

Општи део обухвата четири целине. У првој целини је дат детаљан приказ структуре и улоге испитиваних албумина (ХСА и АЛА). Истраживања која су доступна у литератури везана за повезаност структуре, функције и утицаја везивања различитих лиганата за ХСА и АЛА су такође представљена у овом делу. У другој целини кандидаткиња је описала структуру, активност и значај испитиваних биоактивних лиганата из хране (фикоцијанобилина и ЕГЦГ), као и њихове интеракције са протеинима и њихову примену у медицини. Трећа целина обухвата детаљан опис метода теоријске хемије за статичко и динамичко проучавање интеракција између биомолекула.

У поглављу **Циљеви** су јасно дефинисани циљеви и рачунарске методе неопходне за остваривање постављених циљева.

У **Експерименталном делу** детаљно су описани поступци рачунарских метода коришћених у овој дисертацији. Описани су квантно-механички прорачуни коришћени за добијање најповољније геометрије лиганата, као и протоколи употребљени за добијање еквилибрисаних почетних структура протеина. Дат је детаљан опис процедура молекулског докинга и молекулско-динамичких симулација. У циљу

репродуцибилности резултата, дати су услови коришћени у молекулском докингу и у свим фазама молекулско-динамичких симулација.

У делу **Резултати и дискусија** кандидаткиња је приказала и детаљно продискутовала добијене резултате у две целине. Најпре су приказани резултати интеракција фикоцијанобилина и ХСА, добијени након молекулско-динамичке симулације, који су упоређени са претходно добијеним резултатима молекулског докинга. Дискутована је постојаност везивних места током читаве симулације и извршено је поређење интеракција са постојећим кристалним структурама ХСА у комплексу са маркерима испитиваних везивних места. На основу резултата добијених молекулско-динамичком симулацијом описане су разлике у конформационим променама, компактности и мобилности између слободног ХСА и ХСА у комплексима са фикоцијанобилином. Дискутовани су утицаји везивања фикоцијанобилина на смањење конформационих промена ХСА. Такође, описан је и утицај фикоцијанобилина на везивање других физиолошких лиганата за ХСА. У другој целини приказани су резултати везивања ЕГЦГ за апо форму АЈА, и дискутоване су разлике у конформацијама слободних форми АЈА, као и његових комплекса са ЕГЦГ, током молекулско-динамичких симулација. Упоредна је структурна стабилност АЈА након уклањања јона калцијума са холо формом, а потом су испитани ефекти везивања ЕГЦГ на структуру обе форме (апо и холо) АЈА. Описани су детаљи финих промена у структури апо АЈА услед везивања ЕГЦГ и предложен је механизам којим ЕГЦГ заправо стабилише апоАЈА. Дато је и предвиђање утицаја везивања ЕГЦГ на одлагање промене конформације нативне апо форме АЈА у стање слично “стопљеној глобули”.

У **Закључцима** кандидаткиња је сумирала добијене резултате који су проистекли из ове дисертације и изнет је њихов значај.

У поглављу **Литература** (264 цитата) обухваћене су публикације из области које дисертација садржи.

Б. Кратак приказ резултата

У овој дисертацији испитивана је конформациона стабилност ХСА приликом везивања фикоцијанобилина, биоактивне хромофоре плаво-зелене алге Спирулине.

Теоријским методама описане су интеракције између ХСА и фикоцијанобилина, и то на оба везујућа места на протеину. Укупно су изведене три молекулско-динамичке симулације следећих система: слободан ХСА, ХСА у комплексу са фикоцијанобилином везаним за везивно место хема (субдомен IB) и ХСА у комплексу са фикоцијанобилином везаним за Судлово место I (субдомен IA).

Методама молекулско-динамичке симулације, у трајању од 0,3 μ s, потврђено је да фикоцијанобилин остаје у предложеним везивним местима ХСА током читаве симулације. Показано је да је број различитих конформација кроз које пролази ХСА приликом везивања фикоцијанобилина мањи у односу на слободан протеин, што говори да фикоцијанобилин повећава стабилност ХСА везивањем за било које од два потенцијална места везивања, при чему је стабилизација израженија када је везан за везивно место хема. Показано је и да током симулације сам лиганд показује промене у конформацији. Његова најстабилнија циклична, хеликоидна конформација, прелази у нешто опруженију конформацију приликом везивања за ХСА. Како је везивање фикоцијанобилина за ХСА изазвало промене конформације протеина, методама молекулског докинга испитано је везивање осталих физиолошких лиганата (варфарина, индометацина, билирубина, фузидинске киселине, масних киселина, тироксина, хемина, диазепама, ибупрофена, азапропазона, диклофенака и фикоцијанобилина), на новодобијену конформацију ХСА. Показано је да поједини лиганди показују већи афинитет везивања на ову конформацију у присуству фикоцијанобилина на везивном месту хема, док у присуству фикоцијанобилина на Судловом месту I сви лиганди показују нижи афинитет везивања у односу на слободан ХСА.

У овој дисертацији методама молекулског докинга испитано је и везивање главног катехина зеленог чаја, ЕГЦГ, за протеин млека, односно, апо форму АЈА (без Ca^{2+} -јона). Добијени резултати указали су на везивање ЕГЦГ између субдомена АЈА, што је у складу са пронађеним местом приликом везивања ЕГЦГ за холо форму АЈА (са Ca^{2+} -јоном). Изведене су укупно четири молекулско динамичке студије које су обухватале следеће системе: апо форму АЈА, холо форму АЈА, апо форму АЈА у комплексу са ЕГЦГ и холо форму АЈА у комплексу са ЕГЦГ. Молекулско-динамичка симулација потврдила је да ЕГЦГ остаје везан за предложено везивно место на апо

АЛА током читаве симулације. Овим студијама праћен је и утицај везивања лиганда на стабилизацију обе форме АЛА и конформационе промене кроз које пролазе, како слободне, тако и у комплексу са лигандом. Симулацијама је показано да уклањање јона калцијума из холо форме АЛА доводи до нарушавања Ca^{2+} -везујуће петље, што за последицу има смањење конформационе стабилности АЛА и доводи до раздвајања субдомена. Међутим, приликом везивања ЕГЦГ за апо форму долази до повећања стабилности АЛА, као последице враћања стабилности Ca^{2+} -везујуће петље, при чему се субдомени враћају у положај сличан као код холо форме.

Резултати ове дисертације показују да се ХСА и АЛА могу користити као средства за испоруку биоактивних молекула из хране. Показано је да директно везивање фикоцијанобилина за ХСА изазива промене у конформацији протеина које ће утицати на способност протеина да веже друге лиганде, као и на већу стабилност и дуготрајност протеина у плазми. Везивање ЕГЦГ за апо форму АЛА стабилизује ту структуру и одлаже њен прелазак у конформацију сличну “стопљеној глобули”. Стога, резултати ове докторске дисертације од значаја су за биодоступност и транспорт биоактивних лиганда фикоцијанобилина и ЕГЦГ, као и у продужену стабилност и полуживот албумина, као што су ХСА и АЛА, што може имати примену у медицини и хемији хране. Такође, резултати добијени у овој дисертацији показују да теоријско проучавање везивања малих биоактивних молекула за протеине, поред тога што може да подржи експериментално добијене резултате, може и да их објасни на молекулском нивоу.

В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Последњих година велики број научних истраживања усмерен је на испитивање утицаја биоактивних лиганда из хране на здравље људи [1]. Иако се годинама користе у исхрани, у последње време се посвећује велика пажња алгама као извору биоактивних лиганда. Фикоцијанобилин је тетрапиролни пигмент из модро-зелене, филаментозне цијанобактерије Спирулине. Структура овог пигмента је веома слична билирубину, те се сматра да поседују сличне антиоксидативне способности. Изведене су многобројне студије о везивању билирубина за хумани серум албумин, где је показано да се билирубин, као и фикоцијанобилин, везује за везивно место хема и Судлово место I

хуманог серум албумина [2]. Упркос томе, још увек постоје несугласице око тога за које место везивања билирубин показује већи афинитет.

Најпознатији представник фамилије албумина је ХСА. Како има веома дуг полуживот и способност да веже мноштво различитих лиганда, ХСА је најпроучаванији протеин из фамилије албумина [3, 4]. И поред многих теоријских приступа проучавања овог протеина, не постоје подаци у литератури о теоријском проучавању стабилности и конформационих промена ХСА приликом везивања фикоцијанобилина, као ни о молекулско динамичкој симулацији овог пигмента у потенцијалним везивним местима ХСА.

Иако се од давнина користе у исхрани, секундарни метаболити биљака (полифеноли) у последње време привлаче пажњу захваљујући њиховим биолошким улогама као што су антиоксидативне, антибактеријске, антиинфламаторне и антиканцерогене активности. У групу полифенола спада и главни катехин екстракта зеленог чаја ЕГЦГ. Различита полифенолна једињења показала су висок афинитет везивања за протеине попут АЛА, лактоферина, казеина и протеина соје [5]. У литератури је описано и место везивања многих полифенолних једињења за АЛА [6, 7]. Описано је и везивање ЕГЦГ за многе ензиме [8] и протеине (укључујући и холо форму АЛА) [9, 10], али не постоје подаци о молекулско-динамичкој студији утицаја везивања овог лиганда на стабилност и промену конформације обе форме (холо и апо) АЛА. С обзиром на чињеницу да апо форма АЛА представља почетну конформацију која води стању стопљене глобуле, од посебног значаја је испитивање утицаја везивања ЕГЦГ за апо-форму АЛА, која до сада није описана у литератури.

Ова теза је јединствена и по томе што је искључиво теоријским методама показан утицај везивања малих молекула на протеине, при чему су настале промене објашњене на молекулском нивоу.

1. Tahergorabi, R., K.E. Matak, and J. Jaczynski, *Fish protein isolate: Development of functional foods with nutraceutical ingredients*. Journal of Functional Foods, 2015. **18**: p. 746-756.
2. Minic, S.L., et al., *Phycocyanobilin, a bioactive tetrapyrrolic compound of blue-green alga Spirulina, binds with high affinity and competes with bilirubin for binding on human serum albumin*. RSC Advances, 2015. **5**(76): p. 61787-61798.

3. Fanali, G., et al., *Human serum albumin: from bench to bedside*. Molecular Aspects of Medicine, 2012b. **33**: p. 209-90.
4. Fasano, M., et al., *The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin*. IUBMB Life, 2005. **57**(12): p. 787-796.
5. Ma, C.-M. and X.-H. Zhao, *Depicting the Non-Covalent Interaction of Whey Proteins with Galangin or Genistein Using the Multi-Spectroscopic Techniques and Molecular Docking*. Foods, 2019. **8**(9).
6. Mohammadi, F. and M. Moeeni, *Analysis of binding interaction of genistein and kaempferol with bovine α -lactalbumin*. Journal of Functional Foods, 2015a. **12**: p. 458-467.
7. Stănciuc, N., et al., *Microencapsulation of Anthocyanins from Grape Skins by Whey Protein Isolates and Different Polymers*. Food and Bioprocess Technology, 2017. **10**(9): p. 1715-1726.
8. Pal, S., S.K. Dey, and C. Saha, *Inhibition of Catalase by Tea Catechins in Free and Cellular State: A Biophysical Approach*. PLOS ONE, 2014. **9**(7): p. e102460.
9. Al-Hanish, A., et al., *Noncovalent interactions of bovine α -lactalbumin with green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate*. Food Hydrocolloids, 2016. **61**: p. 241-250.
10. Vesic, J., et al., *Complexes of green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, and 2S albumins of peanut*. Food Chemistry, 2015. **185**: p. 309-317.

Г. Објављени радови и саопштења који чине део дисертације

Резултати истраживања проистекли из ове докторске дисертације објављени су у два рада и једном саопштењу (М64). Један рад је штампан у врхунском међународном часопису (М21), а други у међународном часопису изузетних вредности (М21а).

1. **Radibratović, M.**, Minić, S.L., Stanić-Vučinić, D., Nikolić, M.R., Milčić, M., Ćirković Veličković, T. Stabilization of human serum albumin by the binding of phycocyanobilin, a bioactive chromophore of blue-green alga Spirulina: molecular dynamics and experimental study. *PLoS One*, (2016) 11(12): Article No. e0167973; DOI: 10.1371/journal.pone.0167973; (Импакт фактор 3,057; Категорија: Мултидисциплинарне науке: 11/62 у 2015. години).

Линк: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814618319769>

2. **Radibratović M.**, Al-Hanish A., Minić S. L, Radomirović M., Milčić M. K, Stanić-Vučinić D., Ćirković Veličković T. **Stabilization of apo α -lactalbumin by binding of epigallocatechin-3-gallate: Experimental and molecular dynamics study**, *Food Chemistry*, (2019) 278, 388-395; DOI: /10.1016/j.foodchem.2018.11.038; (Импакт фактор (2018)= 5.399, Категорија: Примењена хемија 5/71 у 2018. години)

Линк: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814618319769?via%3Dihub>

Саопштења са националних скупова штампана у изводу (М64)

1. **Radibratović M.**, al-Hanish A., Minić S., Radomirović M., Milčić M., Stanić-Vučinić D., Ćirković Veličković T. Stabilization of apo-alpha-lactalbumin by binding of epigallocatechin-3-gallate: experimental and molecular dynamics study, UNIFood Conference, 5-6 October, 2018, Belgrade, Serbia, pp. 268.

Д. Провера оригиналности докторске дисертације

Докторанд Милица В. Радибратовић, завршава и брани докторску дисертацију из Хемије на основу Правилника о докторским академским студијама Универзитета у Београду - Хемијског факултета бр 1557/1 од 12. децембра 2013 године, који не захтева проверу плагијата. Међутим, због добре истраживачке праксе и моралног кодекса, уважен је и Правилник о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета у Београду бр. 204/18). Из извештаја генерисаног програмом „iThenticate” којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Теоријско проучавање конформационих промена албумина приликом везивања биоактивних лиганата из хране“, аутора Милице В. Радибратовић, констатујемо да утврђено подударане текста износи 2 %. Овај степен подударности последица је **општих места, личних имена/звања, назива институција/департмана, назива појмова на енглеском језику и формула**, што је у складу са чланом 9. Правилника. На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујемо да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Ђ. Закључак

На основу свега изложеног, може се закључити да је у поднетој дисертацији под насловом „**Теоријско проучавање конформационих промена албумина приликом везивања биоактивних лиганата из хране**“, кандидаткиња **Милица В.**

Радибратовић, самосталним радом успешно одговорила на постављене задатке везане за испитивање интеракција између албумина и биоактивних лиганата из хране. Добијени резултати су оригинални и пружају квалитетан научни допринос у области примењене хемије. Резултати истраживања, проистекли из ове докторске дисертације, публиковани су у једном научном раду у врхунском међународном часопису (M21), једном научном раду у међународном часопису изузетних вредности (M21a) и једном саопштењу на скуповима националног значаја штампана у изводу (M64). Објављени резултати имају фундаментални значај.

У овој дисертацији је по први пут динамички испитано везивање биоактивног лиганда фикоцијанобилина за хумани серум албумин (ХСА) и епигалокатехин-3-галата (ЕГЦГ) за α -лакталбумин (АЛА) искључиво теоријским методама. Показано је да везивање ових лиганата значајно утиче на конформациону стабилност испитиваних протеина. Такође, показано је да услед насталих конформационих промена ХСА долази до промене афинитета протеина за везивање других физиолошких лиганата, али и да везивање фикоцијанобилина може утицати и на већу стабилност и дуготрајност протеина у плазми.

Молекулско-динамичким симулацијама је показано да уклањање Ca^{2+} -јона из АЛА доводи до нарушавања структуре Ca^{2+} -везујуће петље, и тако утиче на смањење конформационе стабилности протеина, што се огледа у раздвајању субдомена. Везивање ЕГЦГ за апо форму АЛА доводи до повећања стабилности протеина, док Ca^{2+} -везујуће петља и субдомени заузимају конформацију сличну као код холо форме. Добијени резултати сугеришу да овај лиганд може остати везан и у желудачном простору, упркос томе што АЛА у апо форми заузима конформацију сличну “стопљеној глобули”. Резултати ове дисертације показују да везивање биоактивних молекула за албумине осим што побољшава њихову биодоступност и транспорт, може утицати и на продужену стабилност и полуживот протеина за које се везују. Стога, ови резултати осим фундаменталног значаја могу имати и директну примену у медицини и хемији хране.

На основу свега изложеног, а у складу са Законом о Универзитету и Статутом Хемијског факултета, Комисија сматра да су испуњени услови за одбрану докторске дисертације и предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Хемијског факултета, да поднету докторску дисертацију **Милице В. Радибратовић**, мастер хемичара, под насловом **„Теоријско проучавање конформационих промена албумина приликом везивања биоактивних лиганата из хране“** прихвати и одобри њену јавну одбрану за стицање академског звања Доктора хемијских наука.

У Београду, 8. новембра. 2019. године

др Тања Ћирковић-Величковић, дописни члан САНУ,
Редовни професор, Универзитет у Београду - Хемијски факултет (ментор)

др Милош Милчић,
Ванредни професор, Универзитет у Београду - Хемијски факултет (ментор)

др Драгана Станић-Вучинић,
Научни саветник, Универзитет у Београду - Хемијски факултет

др Милан Николић,
Доцент, Универзитет у Београду - Хемијски факултет

др Горан Јањић,
Виши научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за хемију,
технологију и металургију