

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На V редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 11.3.2016. године, прихваћен је извештај ментора др Ђорђа Фире и др Милана Којића о урађеној докторској дисертацији **Горана Н. Вукотића**, истраживача сарадника на Биолошком факултету, под насловом „**Протеиназе млечно-киселинских бактерија: диверзитет у мезофилним врстама лактобацила и утицај на активност бактериоцина**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу др Ђорђе Фира, редовни професор Биолошког факултета, др Милан Којић, научни саветник Института за Молекуларну генетику и генетичко инжењерство и др Бранко Јовчић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација **Горана Н. Вукотића** под насловом „**Протеиназе млечно-киселинских бактерија: диверзитет у мезофилним врстама лактобацила и утицај на активност бактериоцина**“, написана је на 77 страна, и подељена у 8 поглавља: **Увод** (18 страна), **Циљеви рада** (1 страна), **Материјал и методе** (20 страна), **Резултати** (15 страна), **Дискусија** (13 страна), **Закључци** (2 стране), и **Литература** (8 страна). Рад садржи 103 литературна цитата, 19 слика, 5 табела, Садржај и Сажетке на српском и енглеском језику.

АНАЛИЗА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Поглавље **Увод** докторске дисертације садржи пет потпоглавља. У њему је дат сажет приказ досадашњих сазнања из литературе која су непосредно везана за предмет дисертације.

У потпоглављу "Род *Lactobacillus*" истакнут је велики диверзитет поменутог рода, различита станишта које врсте настањују, као и њихове физиолошке, филогенетске и генетичке разлике. Истакнут је такође значај лактобацила за здравље људи и дати различити примери њиховог пробиотичког деловања, као и примери њихове употребе у производњи широког спектра ферментисаних производа. У потпоглављу "Род *Lactococcus*" указано је на изузетан значај овог рода за индустрију ферментисаних млечних производа, првенствено сирева. Међу важним позитивним особинама које омогућавају интензивну примену ових микроорганизама истакнуте су протеолитичка и бактериоцинска активност. У следећем потпоглављу "Бактериоцини МКБ" дат је сажет преглед досадашњих знања о бактериоцинима, њиховој структурној и функционалној разноврсности, као и о потенцијалу и значају које имају у презервацији хране и у

медицини. Потпоглавље "Протеолитичка активност МКБ" бави се протеолитичким системом МКБ, његовим компонентама и физиолошком улогом, са посебним акцентом на протеиназе као прве и најважније ензиме у оквиру ових система. Детаљно су описане PrtP протеиназа код лактокока као и неколико различитих протеиназа код лактобацила, при чему је указано на феномен израженог диверзитета протеиназних гена код лактобацила. Поред поменуте физиолошке функције, истакнуто је неколико различитих процеса у којима протеиназе МКБ остварују запажене улоге а које су од значаја за човека, попут производње млечних производа, механизма пробиотичке активности и производње биоактивних пептида. У наредном потпоглављу "Карактеристике одабраних врста и сојева", дат је детаљан литературни опис врста на којима је рађено у докторској дисертацији. Описани су такође и проблеми са таксономским статусом појединих припадника *Lactobacillus casei* групе на којима је рађено, док је код *L. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-501 детаљно објашњена генетичка основа протеолитичке и бактериоцинске активности, а посебан акценат стављен на утицај нутритивних услова спољашње средине на активност протеиназе PrtP и бактериоцина LcnB.

У поглављу **Циљеви рада** описана су два главна научна циља докторске дисертације. Први научни циљ био је да се испита протеолитичка активност различитих врста мезофилних лактобацила према пет различитих протеина млека понаособ и да се потом, у селектованим протеолитички активним сојевима, анализира присуство и дистрибуција различитих протеиназних гена. Паралелно са наведеним, постављен је и циљ да се сојеви са проблематичним таксономским статусом додатно окарактеришу методама молекуларне детерминације како би се стекао бољи увид у њихове филогенетске односе.

Други циљ ове дисертације био је да се испита механизам медијум-зависне експресије бактериоцина LcnB, односно да се окарактерише интеракција између протеиназе PrtP и бактериоцина LcnB у соју *L. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-501.

У поглављу **Материјал и методе** наведене су хемикалије и апаратуре које су коришћене у раду, као и детаљан опис поступака који су примењивани у манипулацији са коришћеним бактеријама, њиховим протеинима и генетичким материјалом. Посебан акценат је стављен на конструкцију мутираних сојева *L. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-501 код којих су инсерционом мутагенезом појединачно инактивирани *prtP* и *lcnB* гени.

У поглављу **Резултати** изложени су резултати истраживања који су такође груписани у две целине. У првом делу је показано да анализирани сојеви лактобацила поседују добру протеолитичку активност, поготово *Lb. zaeae* LMG17315, који је хидролизован све понуђене протеине млека. Утврђено је да се код неких сојева протеиназе одвајају са ћелија у активном облику. Посебно детаљно су испитани протеолитички капацитети сојева *Lb. zaeae* LMG17315 и *Lb. casei* ATCC393. Након тога, приступљено је покушају да се утврди који гени су одговорни за уочену протеолитичку активност, с обзиром да ни у једном соју од анализираних у тези, протеиназни гени до сада нису описани. Утврђено је да код *Lb. zaeae* LMG17315 постоје најмање три различита протеиназна гена, од којих су два слична раније описаним генима у врсти *Lb. rhamnosus*, док је за трећи утврђено да потенцијално представља нови тип протеиназе. Код *Lb. casei* ATCC393 уочено је присуство истог новог гена као и код *Lb. zaeae* LMG17315, са разликом да други протеиназни гени у овом соју нису детектовани. Код анализираних сојева *Lb. plantarum* групе, са изузетком LMG9208, није установљено присуство ниједног од анализираних гена одговорних за протеолитичку активност ових сојева. Код LMG9208 детектован је ген сличан раније описаном *prtP* гену у врсти *Lb. rhamnosus*, али је анализом његове секвенце установљено да се и у овом случају ради о потенцијално новом типу протеиназе.

Затим су приказани резултати молекуларне детерминације, којима су добијени адекватни BOX и PFGE профили, специфични за сваки анализирани сој.

У другом делу овог поглавља, представљени су резултати анализе механизма медијум-зависне регулације генске експресије бактериоцина LcnB. Прво су потврђена ранија сазнања о зависности антимикробне активности бактериоцина LcnB од концентрације пептида у медијуму. Затим је извршена транскрипциона анализа зависности активности промотора *lcnB* гена од концентрације пептида у медијуму где је уочено да активност промотора P_{lcnB} негативно корелира са активношћу бактериоцина. С обзиром на то даље је испитано да ли протеиназа PrtP може утицати на антимикробну активност бактериоцина LcnB. Утврђено је да инактивација протеиназе доводи до два ефекта: 1) губитка поменуте зависности активности бактериоцина LcnB од концентрације пептида у медијуму; и 2) антимикробна активност бактериоцина LcnB се повећала у односу на исходни сој. Протеолитички третмани бактериоцинских екстраката добијених из мутираног и оригиналног соја потврдили су да протеиназа PrtP смањује активност бактериоцина LcnB, али не у потпуности. С обзиром на добијени резултат, урађена је детаљна анализа молекулске масе бактериоцина у циљу утврђивања релације хидролизе бактериоцина и смањене активности, где је установљено да је маса LcnB бактериоцина *in vivo*, када бактерије расту у условима које погодују експресији протеиназе PrtP, мања од масе предвиђене на основу његове ДНК/аминокиселинске секвенце. Упоредивањем ових маса утврђено је да до исецања долази између шесте и седме аминокиселине на N терминусу бактериоцина LcnB.

У поглављу **Дискусија** дата је упоредна анализа оригиналних резултата ове докторске дисертације и података из литературе, која указује на значај постигнутих резултата. Овим радом је детаљно окарактерисана протеолитичка активност сојева анализираних врста са акцентом на *Lb. zaeae*, врсту слабо описану у литератури, код које су детектована најмање три потенцијано активна протеиназна гена, што је први такав случај у оквиру *Lb. casei* групе. Међу тим генима два су била слична раније описаним – *prtP* и *prtR* генима, при чему је тиме, такође први пут, показано присуство *prtR* гена ван врсте *Lb. rhamnosus*. Осим поменутих, детектован је и нови, до сада неокarakterисан протеиназни ген, назван *prtP1*, чије присуство је потврђено и код *Lb. casei* ATCC393. Иако у прилог томе сведочи велики број података из литературе и за тим постоје захтеви одређеног броја научника, у овој тези је, поред наведеног, методама молекуларне детерминације утврђено да *Lb. zaeae* LMG17315 и *Lb. casei* ATCC393 не могу да се сврстају у исту врсту.

Осим новог протеиназног гена код *Lb. zaeae* LMG17315 и *Lb. casei* ATCC393, још један нови протеиназни ген пронађен је код *Lb. plantarum* LMG9208.

Други део дискусије је пружио увид у механизме регулације генске експресије бактериоцина LcnB, присутног у соју *L. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-501, и његове интеракције са протеиназом PrtP из истог соја. Показано је да је експресија бактериоцина медијум-зависна, али посредно, односно да је та зависност последица активности протеиназе PrtP. С обзиром да је утврђено да активност бактериоцина LcnB расте упоредо са опадањем активности његовог промотора P_{lcnB} , постављена је хипотеза да активност која се уочава у бактериоцинским тестовима не зависи од броја присутних молекула већ од активности самих молекула. Другим речима, претпостављено је да активност појединачног молекула бактериоцина није апсолутна већ релативна и подложна промени *in vivo*. Уочено је да се варирањем услова средине, највећа активност бактериоцина LcnB поклапа са најмањом активношћу протеиназе PrtP, и обрнуто. Имајући све наведено у виду, размотрена је могућност да протеиназа PrtP хидролизује бактериоцин LcnB. Показано је да PrtP заиста смањује антимикробну активност бактериоцина LcnB *in vitro*. Међутим, констатовано је и да је тај ефекат ограничен, на основу чега је претпостављено да долази до специфичне хидролизе након које молекули бактериоцина остају делимично

активни. Ове претпоставке су потврђене када је показано да бактериоцин LcnB заиста пролази кроз протеолитичку обраду у бактеријској култури. Масеном спектрометријом утврђено је да до специфичне дигестије долази на позицији између шесте и седме аминокиселине са N терминаса бактериоцина LcnB.

На основу добијених резултата постављен је модел експресије бактериоцина LcnB, његове интеракције са протеиназом и ванћелијском средином. Према овом моделу, експресија бактериоцина је ниска у условима високе концентрације пептида у медијуму, тј. у богатој средини. Када дође до пада у концентрацији пептида, долази до експресије и секреције протеиназе PrtP у ванћелијски матрикс да би деградацијом протеина обезбедила слободне пептиде и аминокиселине ћелијама. У средини су присутни и молекули LcnB бактериоцина који бивају хидролизоване од стране протеиназе. Хидролизом долази до смањења али не и до потпуног одсуства антимикуробне активности, што молекулима бактериоцина омогућава да задрже своју физиолошку улогу. Претпостављено је да је повећање активности промотора *P_{lcnB}*, до ког долази у условима ниске концентрације пептида у медијуму, одговор на смањење активности бактериоцина LcnB.

Разматрано је и питање о смислености дигестије сопственог бактериоцина, односно о томе да ли је у питању физиолошка појава или штетан ефекат који случајно настаје услед присуства специфичне аминокиселинске секвенце у бактериоцинском пептиду коју протеиназа препознаје и сече. Приликом разматрања овог питања у обзир је узето више познатих процеса у којима је показано да протеиназа PrtP хидролизује протеине из исте бактерије, као и учинковитост њеног деловања у обављању физиолошке функције. Све наведено, заједно са чињеницама да након дигестије молекули бактериоцина, у нешто мањем обиму, задржавају своју физиолошку улогу, као и да одсецање терминалног хектапептида са N терминаса ових молекула доводи до пораста концентрације малих пептида у ванћелијској средини, указује да је у питању смислен физиолошки процес. Размотрена је и могућност да до хидролизе бактериоцина LcnB долази у склопу посттранслационе обраде бактериоцина, и да такво деловање може имати улогу у „quorum sensing“ комуникацији између бактерија.

У поглављу **Закључци**, сажето и јасно су изнети најважнији закључци до којих се дошло анализирањем добијених експерименталних резултата. Ово поглавље је подељено на два пододељка, ради лакшег сумирања свих резултата добијених у тези. У првом делу закључено је да анализирани мезофилне врсте лактобацила поседују протеолитичку активност за коју су одговорне нове, до сада неокarakterисане екстраћелијске протеиназе. У геному *Lb. zeae* LMG17315 су детектовани и *prtP*-сличан и *prtR*-сличан ген, указујући да ови гени нису својствени само *Lb. casei/paracasei* односно *Lb. rhamnosus* врстама већ да су се проширили интерспецијски, највероватније посредством хоризонталног генског трансфера. Овај закључак потврђује и чињеница присуства *prtR*-сличног гена у *Lb. plantarum* LMG9208. Иако *Lb. casei* ATCC393 и *Lb. zeae* LMG17315 поседују нови, у овом раду откривени *prtPI* ген, услед низа уочених фенотипских и генотипских разлика закључено је да ATCC393 треба сврстати у нови таксон или у подврсту у оквиру врсте *Lb. zeae*.

У другом делу, изведени су закључци из резултата добијених радом на интеракцији протеиназе PrtP и бактериоцина LcnB. Закључено је да је активност бактериоцина LcnB променљива након његове секреције у спољашњу средину, да одсуство PrtP протеиназе доводи до пораста у антимикуробној активности соја BGMN1-501, као и да PrtP протеиназа делимично нарушава поменуту активност. Коначно, закључено је да до хидролизе бактериоцина LcnB од стране протеиназе PrtP долази и *in vivo*, и то између шесте и седме аминокиселине са N терминаса молекула бактериоцина.

У поглављу **Литература** дата је листа коју чине 103 библиографске јединице. Наведене научне публикације су актуелне, и односе се на области које су од значаја за

урађену дисертацију и цитиране су на начин који објашњава и потврђује добијене резултате.

БИБЛИОГРАФИЈА

Поглавље у монографији међународног значаја

1. **M14** - Veljović K, Terzić-Vidojević A, Tolinački M, Mihajlović S, Vukotić G, Golić N, Kojić M. (2014). Molecular characterization of natural dairy isolates of *Enterococcus faecalis* and evaluation of their antimicrobial potential. In *Enterococcus faecalis: Molecular Characteristics, Role in Nosocomial Infections and Antibacterial Effects*, pp 123-136, ISBN: 978-1-63321-049-3, Nova Publisher.

Радови и конгресна саопштења из уже научне области:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

2. **M21** - Mirkovic N, Polovic N, **Vukotic G**, Jovic B, Miljkovic M, Radulovic Z, Diep DB, Kojic M. *Lactococcus lactis* LMG2081 produces two bacteriocins: a non-lantibiotic and a novel lantibiotic. *Appl Environ Microbiol.* 2016 Feb 19. pii: AEM.03988-15. doi: 10.1128/AEM.03988-15
3. **M21** - **Vukotić G**, Mirković N, Jovčić B, Miljković M, Strahinić I, Fira, Đ, Radulović Z, Kojić M. (2015). Proteinase PrtP impairs lactococin LcnB activity in *Lactococcus lactis* BGMN1-501: new insights into bacteriocin regulation. *Front. Microbiol.* 10; 6:92. doi: 10.3389/fmicb.2015.00092.
4. **M23** - **Vukotić G**, Strahinić I, Begović J, Lukić J, Kojić M, Fira D. Survey on Proteolytic Activity and Diversity of Proteinase Genes in Mesophilic Lactobacilli. *Microbiology*, 2016, Vol. 85, No. 1, pp. 33–41.
5. **M23** - Stanisavljević N, **Vukotić G**, Pastor F, Sužnjević D, Jovanović Ž, Strahinić I, Fira Đ, Radović S. (2015). Antioxidant activity of pea protein hydrolysates produced by batch fermentation with lactic acid bacteria. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 67(3), 1033-1042, 2015.
6. **M23** - Stanković S, Mihajlović S, Draganić V, Dimkić I, **Vukotić G**, Berić T, Fira Đ. (2012) Screening of the presence of biosynthetic genes for antimicrobial lipopeptides in natural isolates of *Bacillus* sp., *Arch. Biol. Sci.*, 64(4), 1425-1432 .

Б2. Радови у часописима домаћег значаја

1. **M**
2. **M**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **M34** – Mihajlović S, Draganić V, Dimkić I, **Vukotić G**, Berić T, Stanković S, Fira Đ. (2011) Distribution of biosynthetic genes for antimicrobial lipopeptides in natural isolates of *Bacillus* sp., 7th Balkan Congress of Microbiology, Belgrade, Serbia, CD of Abstracts.
2. **M34** – **Vukotić, G**, Strahinić, I, Kojić, M., Begović, J., Fira, Đ., Topisirović, Lj., 2012. Diversity of proteolytic systems in lactobacilli offers possible positive

implications on human health, Belgrade International Food Conference, Belgrade, Serbia CD of Abstracts.

3. **M34** – Stanisavljević N, **Vukotić G**, Fira Đ, Jovanović Ž, Miljuš Đukić J, Radović S, Mikić A, Maksimović V. 2013. Application of different *Lactobacillus* strains in production pea seed protein hydrolysates with antioxidative activity. First Legume Society Conference: A Legume Odyssey, 9-11 May 2013, Novi Sad, Serbia, Book of abstracts, pp 286.
4. **M34** – Strahinić I, **Vukotić G**, Lozo J, Fira D, Besu I, Matic I, Juranic Z. (2014) Bacterial hydrolysis of cow milk proteins completely abrogates their immunoreactivity in patients with recurrent oral ulcers. International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics - IPC2014, Hungary, Budapest, June 24th-26th. Proceeding Book p: 156.
5. **M34** – **Vukotić G**, Mirković N, Strahinić I, Fira D, Kojić M. (2014) Interaction of Proteinase PrtP and Bacteriocin LcnB in *Lactococcus lactis* BGMN1-501. V Congress of The Serbian Genetic Society, Serbia, Kladovo, September 28th- October 2nd. Book of Abstracts, p. 77.
6. **M34** – Golić N, Nikolić M, Lukić J, Miljković M, Filipić B, Dinić M, **Vukotić G**, Kojić M. Molecular mechanisms involved in health promoting potential of lactic acid bacteria. V Congress of the Serbian Genetic Society, Serbia, Kladovo, September 28th- October 2nd, 2014. Book of Abstracts, p. 375.
7. **M34** – **Vukotić G**, Mirković N, Jovčić B, Strahinić I, Fira D, Radulović Z, Veljović K, Kojić M. Lactococcal proteinase PrtP enhances antilisteric activity of enterocins from different niches. 9th Balkan Congress Of Microbiology 22-24 October 2015, Thessaloniki. Book of Abstracts, p. 162.

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **M64** - Stanisavljević N, **Vukotić G**, Fira Đ, Jovanović Ž, Radović S, Strahinić I, Pastor F, Sužnjević D, Samardžić J, 2013. Proizvodnja peptida sa antioksidativnom aktivnošću hidrolizom proteina semena graška pomoću sojeva roda *Lactobacillus*. Drugi kongres Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalnu fiziologiju, Niš, Srbija, Knjiga sažetaka, str 29.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **M21** - **Vukotić G**, Mirković N, Jovčić B, Miljković M, Strahinić I, Fira, Đ, Radulović Z, Kojić M. (2015). Proteinase PrtP impairs lactococcal LcnB activity in *Lactococcus lactis* BGMN1-501: new insights into bacteriocin regulation. *Front. Microbiol.* 10; 6:92. doi: 10.3389/fmicb.2015.00092.
2. **M23** - **Vukotić G**, Strahinić I, Begović J, Lukić J, Kojić M, Fira D. Survey on Proteolytic Activity and Diversity of Proteinase Genes in Mesophilic *Lactobacilli*. *Microbiology*, 2016, Vol. 85, No. 1, pp. 33–41.

Б2. Радови у часописима домаћег значаја

1. **М**
2. **М**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **М34 – Vukotić, G**, Strahinić, I, Kojić, M., Begović, J., Fira, Đ., Topisirović, Lj., 2012. Diversity of proteolytic systems in lactobacilli offers possible positive implications on human health, Belgrade International Food Conference, Belgrade, Serbia CD of Abstracts.
2. **М34 – Vukotić G**, Mirković N, Strahinić I, Fira D, Kojić M. (2014) Interaction of Proteinase PrtP and Bacteriocin LcnB in Lactococcus lactis BGMN1-501. V Congress of The Serbian Genetic Society, Serbia, Kladovo, September 28th- October 2nd. Book of Abstracts, p. 77.

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **М**
2. **М**

МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Докторска дисертација кандидата **Горана Н. Вукотића**, под насловом **„Протеиназе млечно-киселинских бактерија: диверзитет у мезофилним врстама лактобацила и утицај на активност бактериоцина“** представља научни рад са јасно формулисаним циљевима заснованим на добром познавању научне проблематике, са адекватно планираним и успешно реализованим истраживачким поступком чији резултати представљају оригинални научни допринос разумевању диверзитета протеиназних гена код лактобацила и молекуларних механизма регулације генске експресије бактериоцина LcnB.

У изради дисертације Горан Н. Вукотић је показао иницијативу при дефинисању хипотезе и циљева, применио адекватне експерименталне методе и показао висок степен самосталности како у експерименталном раду тако и при обради добијених резултата које је критички дискутовао, уз исцрпне податке из литературе. Треба нагласити да су представљени резултати објављени у врхунским међународним часописима, што потврђује да је кандидат, у сарадњи са менторима, пажљиво одабрао тему истраживања, која у наредном периоду може бити успешно развијана.

На основу увида у експериментални рад током истраживања и постигнуте резултате, Комисија закључује да су задаци постављени у циљу и програму, који су усвојени приликом прихватања теме за израду докторске дисертације, испуњени у потпуности и има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета, Универзитета у Београду, да прихвати позитивну оцену докторске дисертације **Горана Н. Вукотића**, под насловом **„Протеиназе млечно-киселинских бактерија: диверзитет у мезофилним врстама лактобацила и утицај на активност бактериоцина“** и омогући кандидату јавну одбрану рада.

У Београду, _____ 2016. године.

КОМИСИЈА:

др Ђорђе Фира, редовни професор
Биолошког факултета Универзитета у Београду

др Милан Којић, научни саветник
Института за молекуларну генетику
и генетичко инжењерство Универзитета у Београду

др Бранко Јовчић, ванредни професор
Биолошког факултета Универзитета у Београду