

Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

Nastavno-naučno veće

Predmet: Izveštaj Komisije za pregled i ocenu doktorske disertacije Brankice Rašković, master biohemičara

Na redovnoj sednici Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, održanoj 09.06.2016. godine, određeni smo za članove Komisije za pregled i ocenu doktorske disertacije Brankice Rašković, prijavljene pod naslovom: „**Ispitivanje stabilnosti serin- i cistein-proteaza na niskim temperaturama**“.

Pošto smo podnetu disertaciju pregledali, podnosimo sledeći

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja disertacije

Doktorska disertacija Brankice Rašković pod navedenim naslovom napisana je na 153 strane A4 formata (prored 1,5). Sadrži 59 slika (od toga 5 u Prilogu), 42 tabele (od toga 3 u Prilogu). Rad obuhvata sledeća poglavlja: 1. Uvod (2 strane), 2. Teorijski deo (30 strana), 3. Ciljevi (2 strane), 4. Materijal i metode (31 strana), 5. Rezultati (49 strana), 6. Diskusija (17 strana), 7. Zaključci (2 strane), 8. Literatura (14 strana, 192 citata) i Prilog (5 strana). Pored navedenog, teza sadrži izvod na srpskom i engleskom jeziku (3, odnosno, 2 strane), sadržaj, zahvalnicu i biografiju kandidata.

U **Uvodu** je dat kraći osvrt na oblast istraživanja i aktuelnost teme u naučnoj literaturi. Kao glavni cilj ove doktorske disertacije navedeno je utvrđivanje uzroka inaktiviranja enzima niskom temperaturom na detaljnom strukturnom nivou, kako bi se, s jedne strane, pružio doprinos fundamentalnim istraživanjima problematike stabilnosti i denaturacije proteina na niskim temperaturama, a sa druge strane, ponudilo konkretno rešenje za povećavanje stabilnosti komercijalnih enzima i produžavanje njihovog veka trajanja.

U **Teorijskom delu** kandidat navodi opšte pojmove o strukturi proteina i konformacionim prelazima, sa posebnim osvrtom na kinetiku i termodinamiku uvijanja proteina, kao i denaturaciju i nenativno agregiranje.

Pored toga, kandidat je dao poseban osvrt na mehanizam denaturacije proteina na niskim temperaturama i ukratko opisao značaj i eksperimentalne pristupe proučavanja stabilnosti proteina na niskim temperaturama.

Opisani su i model sistemi ove studije, njihove strukture, osnovne karakteristike i primena.

Ciljevi ove doktorske disertacije formulisani su u okviru istoimenog poglavlja.

U okviru poglavlja **Materijal i metode** kandidat je dao detaljan opis korišćenih materijala i eksperimentalnih procedura uključujući analitičke metode, metode za izolovanje proteina, testove za praćenje aktivnosti, kao i tehnike za ispitivanje stabilnosti proteaza na niskim temperaturama.

U poglavlju **Rezultati** kandidat iznosi glavne rezultate svojih istraživanja. U prvoj celini navedeni su rezultati karakterisanja proteina lateksa smokve (*Ficus carica*) kao izvora iz koga su izolovana dva od četiri model sistema ove studije (ficin i kolagenaza).

U sledećoj celini dati su rezultati izolovanja ficina, kolagenaze i papaina, kao i bazične karakterizacije novootkrivene kolagenaze lateksa smokve.

Slede rezultati koji prikazuju optimizovanje metodologije za ispitivanje stabilnosti proteaza na niskim temperaturama na modelu papaina, nakon kojih je dato ispitivanje stabilnosti proteaza (papaina, ficina, tripsina i kolagenaze) na niskim temperaturama. Ovi rezultati obuhvataju praćenje promena aktivnosti, stabilnosti primarne strukture, kao i stabilnosti sekundarne/tercijarne strukture i formiranje agregata usled izlaganja niskoj temperaturi.

Finalno su prikazani rezultati optimizovanja uslova za skladištenje tripsina za sekvenciranje na niskim temperaturama u rastvornom obliku.

Poglavlje **Diskusija** komentariše i tumači dobijene rezultate u kontekstu postojeće naučne literature koja se bavi sličnom problematikom.

U poglavlju **Zaključci** sumirani su najvažniji zaključci proistekli iz ove doktorske disertacije.

U **Prilogu** su dati dodatni eksperimentalni podaci dobijeni u okviru istraživanja opisanih u poglavlju **Rezultati**.

B. Kratak opis postignutih rezultata

Na primeru papaina optimizovana je metodologija za proučavanje stabilnosti proteina na niskim temperaturama. Uobičajeno korišćene metode za ispitivanje stabilnosti/denaturacije/tranzicije konformacije proteina, kao što su diferencijalna UV spektroskopija i diferencijalna skenirajuća kalorimetrija, ne obezbeđuju precizne podatke o stabilnosti proteaza na niskim temperaturama, usled formiranja leda u rastvorima proteina. Ipak, na ovaj način je detektovan početak denaturacije na niskim temperaturama i utvrđeno je da je tačka tranzicije papaina, T_c , na temperaturi od $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$. U potrazi za optimalnom metodologijom, pokazano je da je inaktivacija pod uticajem temperature i denaturanata vezana za tranziciju native strukture koja vodi inaktivaciji, te je tačku promene načina uvijanja papaina (denaturaciju) moguće pratiti i merenjem aktivnosti.

Kako su dobijene promene sekundarnih struktura (upotrebom infracrvene spektroskopije sa Furijevom transformacijom (FT-IR)) prilikom termalne denaturacije papaina konzistentne sa padom tendencije zauzimanja α -helikoidne strukture u korist agregacionih β -pločica, FT-IR spektroskopija bi mogla da bude korisna metoda za proučavanje strukturnih promena proteina denaturisanih na niskim temperaturama, čak i u prisustvu agregata.

Kombinacijom predloženih metoda pokazano je da skladištenje proteaza na temperaturama ispod $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, dovodi do inaktivacije cistein-proteaza. Uočeni pad aktivnosti (75% u slučaju papaina) ne može se objasniti autoproteolizom koja je u svim ispitivanim slučajevima ograničena na manje od 10%. Kod cistein-proteaza, niske temperature izazivaju destabilizaciju α -helikoidnog domena, uz izraziti porast sadržaja nenativnih intermolekulskih β -pločica koje predstavljaju nukleus za

stvranje agregata. Strukturne promene nisu uočene u okviru kompaktnog β -pločastog domena cistein-proteaza.

Skladištenje serin-proteaza na temperaturama ispod 0 °C na operativnim pH vrednostima ne dovodi do dramatičnog gubitka aktivnosti, kao ni do strukturnih rearanžmana. Tek kombinacijom stresova (niska temperatura i pH vrednost 3) dolazi do strukturnih rearanžmana koji su konzistentni denaturaciji na niskim temperaturama u slučaju tripsina (porast sadržaja intramolekulske β -pločice na račun pada neuređenih struktura i α -heliksa).

Na osnovu pronađenih dokaza da je inaktiviranje tripsina za sekvenciranje posledica denaturacije na niskim temperaturama, a ne autoproteolize, optimizovani su uslovi za skladištenje ove komercijalno značajne proteaze na niskim temperaturama.

C. Uporedna analiza rezultata Kandidata sa rezultatima iz literature

Ispitivanje stabilnosti i denaturacije proteina na niskim temperaturama u poslednjih dvadesetak godina dobija na značaju. Teorija denaturacije proteina u zamrznutom stanju objašnjava destabilizaciju nativne strukture proteina kolapsom hidrofobnog efekta i slabljenjem hidrofobnih interakcija usled pada temperature što dovodi do izlaganja nepolarnih ostataka vodi i time finalno dovodi do alternativnog načina uvijanja proteina. Nekoliko autora je prijavilo porast sadržaja β -pločice u proteinima denaturisanim niskom temperaturom u poređenju sa nativnim, te se može zaključiti da su rezultati ove doktorske disertacije konzistentni sa literaturnim podacima. Kako ovi rezultati ukazuju na strukturne promene izazvane denaturacijom niskim temperaturama, zaključeno je da je denaturacija objašnjenje za drastično detektovano inaktiviranje proteaza tokom izlaganja niskoj temperaturi, nasuprot opštem verovanju da je glavni faktor koji dovodi do inaktiviranja proteaza autoproteoliza. U naučnoj literaturi pokazano je da nenativne konformacije proteina (pogrešno uvijeni ili denaturisani proteini) koji imaju povišen sadržaj β -pločica predstavljaju nukleuse za formiranje agregata. U našoj studiji je potvrđeno da kod proteina kod kojih čitavi domeni menjaju obrazac sekundarnih struktura iz α -heliksa u β -pločice dolazi do agregiranja (papain i ficin). U ovom istraživanju je na primeru tripsina pokazano da formiranje agregata ne mora nužno pratiti strukturne rearanžmane izazvane denaturacijom na niskim temperaturama, već da agregiranje zavisi od organizacije sekundarnih,

supersekundarnih i domenskih struktura u nativnom proteinu, što je takođe u saglasju sa literaturnim podacima.

Tumačenje rezultata ove disertacije u kontekstu postojećih literaturnih podataka o denaturaciji proteina na niskim temperaturama, ima i praktičan značaj, pošto, pored doprinosa u razjašnjavanju strukturnih promena proteaza, doprinosi razvoju optimalnih uslova čuvanja komercijalno značajnih proteina na niskim temperaturama.

D. Objavljeni i saopšteni radovi koji čine deo disertacije

Radovi objavljeni u vrhunskim časopisima međunarodnog značaja (M-21):

1. Raskovic B, Vatic S, Andjelkovic B, Blagojevic V, Polovic N. Optimizing storage conditions to prevent cold denaturation of trypsin for sequencing and to prolong its shelf life. *Biochemical Engineering Journal* 105 (2016) 168–176.
2. Raskovic B, Lazic J, Polovic N. Characterization of general proteolytic, milk clotting and antifungal activity of *Ficus carica* latex during fruit ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96:2 (2016) 576-582.

Radovi objavljeni u istaknutim časopisima međunarodnog značaja (M-22):

3. Raskovic B, Popovic M, Ostojic S, Andjelkovic B, Tesevic V, Polovic N. Fourier transform infrared spectroscopy provides an evidence of papain denaturation and aggregation during cold storage. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 150 (2015) 238–246.
4. Raskovic B, Bozovic O, Prodanovic R, Niketic V, Polovic N. Identification, purification and characterization of a novel collagenolytic serine protease from fig (*Ficus carica* var. Brown Turkey) latex. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 118:6 (2014) 622-627.

Radovi objavljeni u časopisima međunarodnog značaja (M-23):

5. Raskovic B, Babic N, Korac J, Polovic N. The evidence of β -sheet structure induced kinetic stability of papain upon thermal and sodium dodecyl sulphate denaturation. Journal of the Serbian Chemical Society 80:5 (2015) 613-625.

Saopštenja na naučnim skupovima međunarodnog značaja štampana u izvodu (M-34):

1. Raskovic B, Polovic N. Collagenolytic activity of fig latex proteases. Abstracts of the 38th FEBS Congress, The FEBS Journal, Volume 280 Supplement 1 July 2013, Saint Petersburg, Russia July 6–11, 2013. p. 510.
2. Raskovic B, Polovic N. Fourier transform infrared spectroscopy provides an evidence of papain denaturation and aggregation during cold storage. FEBS3+ Meeting Molecules of Life, 2015, Portorož, Slovenia, Book of Abstracts, p. 153.

Saopštenja na naučnim skupovima nacionalnog značaja štampana u izvodu (M-64):

1. Rašković B, Polović N. Kolagenolitička aktivnost proteaza lateksa smokve. Prva konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 2012, Kratki izvodi radova BH O12, str. 74.
2. Rašković B, Polović N. Inaktivacija papaina tokom skladištenja na niskoj temperaturi prouzrokovana je promenama u tercijarnoj strukturi i agregacijom. Treća konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 2015, Kratki izvodi radova BB P 11, str. 70.
3. Vatić S, Rašković B, Polović N. Alkalni uslovi čuvanja tripsina na hladno sprečavaju denaturaciju ovog proteina na niskim temperaturama. Treća konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 2015, Kratki izvodi radova BB P 06, str. 65.

4. Raskovic B, Polovic N. Cold stability of proteases. 5th Annual Meeting of Serbian Biochemical Society, November 2015, Proceedings 127-129, Belgrade, Serbia.

E. Zaključak

Na osnovu izloženog može se zaključiti da je u doktorskoj disertaciji pod naslovom „**Ispitivanje stabilnosti serin- i cistein-proteaza na niskim temperaturama**“ kandidat, **Brankica Rašković**, uspešno odgovorila na sve postavljene zadatke koji se tiču karakterisanja strukturnih promena kojima proteaze podležu usled izlaganja niskoj temperaturi, kao i objašnjavanja na koji način niske temperature dovode do inaktiviranja serin- i cistein-proteaza.

Rezultati istraživanja proistekli iz ove doktorske disertacije objavljeni su u okviru pet radova od kojih su dva štampana u vrhunskim međunarodnim naučnim časopisima (kategorije M-21), dva štampana u istaknutim časopisima međunarodnog značaja (kategorija M-22), jedan štampan u časopisu međunarodnog značaja (kategorija M-23), kao i 2 saopštenja štampana u izvodu sa skupova međunarodnog značaja i 4 saopštenja štampana u izvodu sa skupova nacionalnog značaja.

Komisija smatra da rezultati objavljeni u okviru ove doktorske disertacije predstavljaju značajan naučni doprinos oblasti strukturne biohemije, sa aspekta proučavanja stabilnosti i denaturacije proteina na niskim temperaturama, i predlažu novi, optimizovani, način skladištenja tripsina za sekvenciranje u rastvornom obliku na niskim temperaturama kojim se povećava stabilnost i sprečava denaturacija.

Istovremeno, Komisija smatra da ova disertacija daje doprinos metodološkom pristupu proučavanja stabilnosti komercijalno važnih proteina na niskim temperaturama i da se time uklapa u savremene pristupe strukturne biohemije dajući značajan doprinos teoriji i praksi analize konformacionih promena proteina, pre svega sekundarnih struktura metodom infracrvene spektroskopije u cilju utvrđivanja obrazaca denaturacije proteina.

Na osnovu svega izloženog Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, da podnetu doktorsku disertaciju Brankice Rašković prihvati i odobri njenu odbranu.

U Beogradu, 20.07.2016. godine

Komisija:

Dr Natalija Polović (mentor)

docent

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. Dr Marija Gavrović-Jankulović

redovni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. Dr Zoran Vujčić

redovni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Vlatka Vajs

naučni savetnik CH-IHTM

Dr Anđelka Ćelić

docent

Prirodno-matematički fakultet,

Univerzitet u Novom Sadu
