

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

**I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ**

1. Датум и орган који је именовao комисију:

Наставно-научно веће Природно-математичког факултета у Новом Саду, 31. 05. 2022.

2. Састав комисије у складу са Правилима докторских студија Универзитета у Новом Саду:

1.	Др Сузана Јовановић-Шанта	редовни професор	биохемија, 07. 03. 2021.
	презиме и име	звање	ужа научна област и датум избора
	Природно-математички факултет УНС		председник
	установа у којој је запослен-а		функција у комисији
2.	Др Наталија Половић	редовни професор	биохемија, 20. 10. 2021.
	презиме и име	звање	ужа научна област и датум избора
	Хемијски факултет Универзитета у Београду		члан
	установа у којој је запослен-а		функција у комисији
3.	Др Жељко Поповић	ванредни професор	молекуларна биологија, 01.03.2020.
	презиме и име	звање	ужа научна област и датум избора
	Природно-математички факултет УНС		члан
	установа у којој је запослен-а		функција у комисији
4.	Др Едвард Петри	ванредни професор	биохемија, 12.07.2018
	презиме и име	звање	ужа научна област и датум избора
	Природно-математички факултет УНС		члан
	установа у којој је запослен-а		функција у комисији
5.	Др Анђелка Ћелић	ванредни професор	молекуларна биологија, 12.07.2018.
	презиме и име	звање	ужа научна област и датум избора
	Природно-математички факултет УНС		члан - ментор
	установа у којој је запослен-а		функција у комисији

**II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ**

Име, име једног родитеља, презиме: Маја, Александар, Мариновић

Датум рођења, општина, држава: 8. мај 1991, Врбас, Република Србија

Назив факултета, назив претходно завршеног нивоа студија и стечени академски назив: Природно-математички факултет Универзитета у Новом Саду, мастер академске студије, мастер биолог

Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија: 2015, докторске академске студије, доктор наука – биолошке науке

### III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Идентификација деривата жучних киселина као лиганада хумане рекомбинантне 3 $\alpha$ -хидроксистероид дехидрогеназе типа 3 (3 $\alpha$ ХСД-3) и структурне основе модулације ензимске активности

### IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Навести кратак садржај са бројем страница, поглавља, слика, схема, графикона и сл.

Докторска дисертација кандидаткиње Маје Мариновић „Идентификација деривата жучних киселина као лиганада хумане рекомбинантне 3 $\alpha$ -хидроксистероид дехидрогеназе типа 3 (3 $\alpha$ ХСД-3) и структурне основе модулације ензимске активности" припада научној области биологија, ужој научној области молекуларна биологија, научним дисциплинама структурне биологије, односно ензимологије. Написана је на српском језику, ћириличним писмом, а сажетак је дат у кључној документацији на српском и енглеском језику.

Испред основног текста налазе се: насловна страна, кључна документацијска информација, захвалница и садржај. Срж дисертације чине 153 странице А4 формата, а дисертација је подељена на 7 поглавља: 1. Уводно разматрање, 2. Преглед литературе, 3. Циљеви рада, 4. Материјал и методе, 5. Резултати и дискусија, 6. Закључак и 7. Литература. На крају сржи дисертације налазе се прилози, који обухватају листу скраћеница и коришћених услова за кристализацију, као и биографија кандидаткиње. На крају документа налази се План третмана података. Срж дисертације садржи 11 табела, 59 илустрација и 31 графикон. Укупно су цитирана 144 литературна навода.

### V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Наслов докторске дисертације је јасно, концизно и прецизно формулисан, указује на њен садржај и одговара циљевима истраживања.

Уводно разматрање укратко описује предмет истраживања докторске дисертације. Ензим 3 $\alpha$  хидроксистероид дехидрогеназа типа 3 припада суперпородици алдо-кето редуктаза, а позната је његова веза са жучним киселинама и улога у физиолошким и патолошким процесима. Од патолошких стања посебан акценат се ставља на малигне болести, где овај ензим са једне стране има улогу у метаболизму стероидних хормона, што је значајно код типова канцера чије преживљавање зависи од стероидних хормона (канцер дојке, канцер простате), док је са друге стране приказана његова способност да инактивацијом хемиотерапеутика омогућава преживљавање малигнућ ћелија и доводи до стварања отпорности на хемиотерапију. У другом делу овог поглавља набројане су *in vitro*, *in silico* и кристалографске методе које су коришћене у изради тезе и повезане тако да се прикаже целина мерења јачине, специфичности и структурних основа инхибиције ензима 3 $\alpha$ ХСД-3 једињењима из испитиване библиотеке деривата природних жучних киселина.

Преглед литературе даје преглед постојећих ставова у научној литератури у вези са ензимом 3 $\alpha$ ХСД-3: његово место у суперпородици алдо-кето редуктаза, структуру, функцију, повезаност структуре и функције, инхибицију жучним киселинама и нестероидним антиинфламаторним агенсима, као и његову улогу у физиолошким и патолошким стањима. Поглавље је подељено у 8 целина. Прва целина бави се суперпородицом алдо-кето редуктаза и смешта испитивани ензим у ову суперпородицу, породицу АКР1 и потпородицу АКР1Ц. Приказују се заједничке карактеристике чланова суперпородице алдо-кето редуктаза, које одликују и ензим 3 $\alpha$ ХСД-3. Друга целина

проучава механизам ензимске катализе суперпородице АКР, који је очуван и код њеног члана 3 $\alpha$ ХСД-3 који је у центру истраживања ове дисертације. Трећа целина ближе описује породицу АКР1 и потпородицу АКР1Ц. Четврта целина је усмерена на сам ензим 3 $\alpha$ -ХСД-3, његове структурне одлике и функцију која произилази из структуре. Пета целина односи се на улоге овог ензима у физиолошким стањима. Шеста целина описује улоге 3 $\alpha$ -ХСД-3 у патолошким стањима, са фокусом на малигне болести, али је дат и преглед научних сазнања о улогама овог ензима у настанку и развоју запаљенских процеса, ендометриозе и поремећајима синтезе неуростероида у чији метаболизам је укључен 3 $\alpha$ ХСД-3. Седми део описује инхибиторе 3 $\alpha$ ХСД-3 и бави се нестероидним антиинфламаторним агенсима и жучним киселинама. У потпоглављу 8 дат је преглед теоријских основа техника коришћених у изради ове дисертације: рекомбинантна експресија протеина у бактеријама *E. coli*, праћење ензимске активности АКР1Ц ензима мерењем потрошње кофактора и утишавања природне флуоресценције триптофана, *in silico* технике молекулског докинга и молекулске динамике, као и основе протеинске кристалографије. Комисија је сагласна да је у поглављу Преглед литературе адекватно приказан преглед досадашњих сазнања у вези са темом ове докторске дисертације.

У поглављу Циљеви рада јасно су дефинисани циљеви појединих фаза истраживања ове докторске дисертације. Издвојено је 5 циљева, који заједнички воде ка идентификацији једињења из библиотеке деривата жучних киселина која показују инхибиторна својства према 3 $\alpha$ ХСД-3. За анализирана једињења се процењује јачина и специфичност инхибиције и дају структурне основне везивања за ензим. На крају се наводе *in vitro*, *in silico* и кристалографски приступ, који ће водити ка остварењу циљева. Комисија је сагласна да је кандидаткиња јасно представила циљеве истраживања и да су дати циљеви усклађени са оним наведеним у пријави теме докторске дисертације.

У поглављу Материјал и методе представљене су структуре испитиваних једињења из библиотеке деривата жучних киселина. Надаље, детаљно су описане технике коришћене током експерименталног рада, тако да оне могу бити поновљене од стране других истраживача. Најпре се описују коришћене технике за рад са рекомбинантом ДНК и хетерологна експресија протеина, као и процеси коришћени за пречишћавање рекомбинантно експримираних протеина из бактеријског лизата. Потом се објашњавају поступци приликом спровођења *in vitro* огледа за мерење инхибиције ензимске активности, укључујући и мерење јачине и специфичности инхибиције. Након *in vitro* техника детаљно се описују *in silico* технике коришћене за расветљавање структурних основа инхибиције ензима 3 $\alpha$ ХСД-3 једињењима из библиотеке деривата жучних киселина. На крају описују се кристалографски огледи који су довели до кристализације и решавања структуре сродног ензима 17 $\beta$ ХСД-5 у апопротеинској форми и са једним од лиганада из испитиване библиотеке деривата жучних киселина. Комисија закључује да је у овом поглављу кандидаткиња пружила довољно информација које су уклопљене у концизне описе експерименталних поступака, чиме је осигурала поновљивост урађених анализа.

Резултати истраживања су приказани у поглављу Резултати и дискусија јасно, концизно, уверљиво и прегледно, уз одговарајуће табеларне и графичке приказе. Кандидаткиња је објективно и са критичким освртом на актуелне литературне податке анализирала добијене резултате и изложила их на свеобухватан и исцрпан начин. У овом поглављу приказани су и дискутовани резултати који представљају оригинални научни допринос. Поглавље је подељено у 4 потпоглавља која су у зависности од садржаја издељена на мање целине. Први део везан је за *in vitro* ензимске есеје, где је најпре дат графички и нумерички приказ

иницијалног тестирања свих једињења из библиотеке деривата жучних киселина у потрази за инхибиторима 3 $\alpha$ ХСД-3, а потом је за најбоље кандидате из иницијалног тестирања процењена јачина инхибиције мерењем вредности IC50 и специфичност инхибиције мерењем активности хетерологно експримираног 5 $\beta$ ХСД-17. У оквиру овог дела приказан је и тест утишавања природне флуоресценције триптофана са једним од пронађених инхибитора. Други део резултата и дискусије посвећен је *in silico* симулацијама молекулског докинга, при чему су приказана једињења која су се у претходном поглављу показала као инхибитори. За ова једињења предложен је модел везивања у ензим 3 $\alpha$ ХСД-3, а процењен је и афинитет везивања једињења за рецептор на основу молекуларног докинга. На крају су резултати јачине и специфичности инхибиције, као и процењен афинитет везивања за 3 $\alpha$ ХСД-3 за најбоље кандидате, обједињени у табели у циљу прегледности. Трећи део Резултата и дискусије обухвата молекулску динамику комплекса протеин-кофактор-лиганд, где је за један од најјачих инхибитора пронађених у претходним експериментима тестирана стабилност и понашање током времена са ензимом у сфери воде у току 20 наносекунди. На крају, последње потпоглавље Резултата и дискусије посвећено је кристалографским студијама. Са једне стране дат је тренутни приказ кристализацијских експеримената макромолекула 3 $\alpha$ ХСД-3 и 17 $\beta$ ХСД-5, како би се могло наставити са развијањем услова при којима ће се добити дифрактујући кристали 3 $\alpha$ ХСД-3, а са друге стране одређене су две структуре 17 $\beta$ ХСД-5, у апопротеинској форми и са једним од једињења из деривата библиотеке жучних киселина, уз пропратне податке о снимљеним кристалима и основне методе валидације добијених резултата. Комисија сматра да је кандидаткиња прецизно и тачно обрадила резултате истраживања, јасно и систематично их груписала у логичке целине и опсежно дискутовала добијене резултате у светлу постојећих студија других истраживачких група, што доприноси научној вредности ове дисертације.

У поглављу Закључак су јасно, прегледно и сажето изнети закључци проистекли из добијених резултата истраживања представљених у одељку Резултати и дискусија. Истакнут је њихов значај, као и потенцијална примена у будућности. Из наведених резултата изводе се закључци који воде будућим истраживањима. Из библиотеке деривата жучних киселина одабрани су најбољи инхибитори рекомбинантно експримираног ензима 3 $\alpha$ ХСД-3, одређена је јачина и специфичност инхибиције и *in silico* и кристалографским методама су расветљене структурне основе везивања ових једињења у активно место ензима. Овај пут води ка даљој оптимизацији синтезе и креирању нових, потентнијих и специфичнијих једињења, која би могла ући у процес претклиничких и клиничких испитивања као кандидати за лечење одређених, у првом реду малигних болести. Комисија оцењује да су изведени закључци концизни, поуздани и научно засновани и да у потпуности дају одговоре на постављене циљеве истраживања.

Одељак Литература садржи листу одговарајућих научних радова (144), савремених и значајних у области истраживања. Листа је организована по азбучном реду и коришћен је измењени АПА стил цитирања. Комисија је мишљења да је литература цитирана у оквиру докторске дисертације релевантна и у складу са предметом истраживања и постављеним циљевима, као и да су све референце наведене прегледно и прецизно на одговарајућим местима у тексту. У Прилогу 1 је ради веће прегледности, азбучним редом дата листа скраћеница, с обзиром на то да се скраћенице објашњавају само приликом првог појављивања у тексту. У Прилогу 2 су дате табеле са свим испробаним условима за кристализацију.

Комисија позитивно оцењује све делове докторске дисертације.

## VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ:

Таксативно навести називе радова, где и када су објављени. Прво навести најмање један рад објављен или прихваћен за објављивање у складу са *Правилима докторских студија Универзитета у Новом Саду* који је повезан са садржајем докторске дисертације. У случају радова прихваћених за објављивање, таксативно навести називе радова, где и када ће бити објављени и приложити потврду уредника часописа о томе.

**Marinović MA**, Petri ET, Grbović LJ, Vasiljević B, Jovanović-Šanta S, Bekić SS, Ćelić AS.

2022. Investigation of the potential of bile acid methyl esters as inhibitors of aldo-keto reductase 1C2: insight from molecular docking, virtual screening, experimental assays and molecular dynamics. *Molecular informatics*. M21, IF = 3,82

<https://doi.org/10.1002/minf.202100256>

## VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА:

Кандидаткиња је у докторској дисертацији комбиновала *in vitro*, *in silico* и кристалографске експерименте ради идентификације нових инхибитора 3 $\alpha$  хидроксистероид дехидрогеназе типа 3 из библиотеке деривата жучних киселина, која се састојала од три серије једињења: ДС, СБ и ЈБГ. У прелиминарном скрининг тесту јаку инхибицију према 3 $\alpha$ ХСД-3 најбољу инхибицију показала су једињења 6 и 10 из ЈБГ серије, једињења 7 и 13 из ДС серије и једињења 140, 144, 156 и 157 из СБ серије, мада кандидаткиња истиче да резултате тестова са СБ једињењима треба узети са резервом, јер су контролне реакције рађене паралелно биле неконзистентне. За најбоље кандидате ЈБГ и ДС серије одређивана је IC50 вредност и утврђено је да сва 4 једињења имају микромоларне IC50 вредности инхибиције 3 $\alpha$ ХСД-3. Мерењем инхибиције активности 17 $\beta$ ХСД-5 утврђено је да је ДС13 најспецифичнији инхибитор 3 $\alpha$ ХСД-3, док остала једињења показују двојну инхибицију и то највише једињење ДС7, које инхибира 17 $\beta$ ХСД-5 готово 80% и делује као апсолутни инхибитор 3 $\alpha$ ХСД-3 при концентрацији коришћеној у прелиминарним тестовима (40  $\mu$ M). Тест утишавања природне флуоресценције триптофана у активном месту рађен је само са једињењем ЈБГ6 и показао је одређено везивање овог једињења за ензим 3 $\alpha$ ХСД-3, међутим, како и сам аутор наводи, потребно је поновити овај оглед и укључити друга једињења да би овај тест могао да потврди закључке добијене из тестова ензимске активности мерењем потрошње кофактора.

Симулације молекулског докинга предложиле су следеће начине везивања: за једињење ДС7 тетразолска група на В прстену остварује поларни контакт са Y55 из каталитичке тетраде, хидроксилна група на С3 формира водоничну везу са E127, док карбоксилатни анјон на D прстену стероидног молекула формира водоничну везу са H117 каталитичке тетраде 3 $\alpha$ ХСД-3; за једињење ДС13, карбоксилатни анјон на D прстену формира водоничну везу са H117 каталитичке тетраде ензима, док тетразол на С прстену формира поларне контакте са остацима A27, E224 и Y24 3 $\alpha$ ХСД-3; код једињења ЈБГ6, кето група на С3 атому формира две водоничне везе са H117 и Y55 из каталитичке тетраде; код једињења ЈБГ10, А прстен је оријентисан ка никотинамидном ентитету кофактора, ацетил група на положају 12 стероида формира водоничне везе Y24 и A27; једињење СБ140 остварује водоничне везе са остацима K31 и A25 ензима преко карбоксилатног анјона групе на D прстену; једињење СБ157 преко оксимске групе на C12 формира водоничну везу са хидроксилном групом Y55 ензима.

Симулација молекуларне динамике 3 $\alpha$ ХСД-3 са лигандом ЉГ6 у трајању од 20 наносекунди показала је да је комплекс стабилан и да не долази до значајних промена у позицији аминокиселина у ензиму током времена, али да се инхибитор помера у смеру супротном од казаљке на сату. За време трајања симулације појављују се три платоа на RMSD профила лиганда, што одговара трима конформацијама лиганда у протеину током симулације.

Кристализација ензима 17 $\beta$ ХСД-5 и покушаји кристализације ензима 3 $\alpha$ ХСД-3 који су резултовали појавом сферулита дали су, у складу са условима већ објављених кристалних структура других аутора, основе за даље кристализацијске експерименте. Надаље, ензим 17 $\beta$ ХСД-5 је први пут кристалисан у апопротеинској форми, без артефаката кристализације, а друга успешно решена структура представља комплекс ензима 17 $\beta$ ХСД-5 са једињењем ДС7, које се показало као најбољи дуални инхибитор 3 $\alpha$ ХСД-3 и 17 $\beta$ ХСД-5. Показано је да се ово једињење својим D прстеном окреће ка кофактору, што омогућава близак контакт карбоксилатног аниона групе са никотинамидним прстеном кофактора. Притом карбоксилатни анион група на D прстену у исто време делује као донор водоничне везе атомима кисеоника Y55 и азота H117 и као акцептор водоничне везе од молекула воде, преко које се веже са атомом кисеоника пиродифосфатног кофактора, чиме се вероватно осигурава повољна оријентација према кофактору.

Резултати приказани у овој тези могу да служе као полазна основа за проширивање знања о повезаности структуре и функције 3 $\alpha$ ХСД-3, а методолошки приступ биће примењен на будућа једињења и друге рекомбинантно експримиране ензиме. Резултати *in vitro*, *in silico* и кристалографских студија допринеће бољем разумевању везивања жучних киселина за 3 $\alpha$ ХСД-3 и помоћи да се у будућности синтетишу потентнији и специфичнији инхибитори, од којих ће неки можда наћи пут ка терапији патолошких стања повезаних са 3 $\alpha$ ХСД-3, у првом реду неких малигних болести.

Комисија констатује да су сви експерименти изведени у складу са научним методама и да се резултати могу сматрати валидним, а методе применљивим у будућим истраживањима.

#### **VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА:**

Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања:

Након прегледања докторске дисертације и анализе њених појединих делова, Комисија је закључила да је дисертација исправно структурирана, а да садржај дисертације одговара њеној теми, као и плану и циљевима који су предвиђени у Пријави теме.

*In vitro*, *in silico* и кристалографска истраживања, чије су основе објашњене у делу Преглед литературе, детаљно су описана у поглављу Материјал и методе, а резултати који су приказани у поглављу Резултати и дискусија, урађени су савесно и темељно, поштујући принципе научних метода.

Резултати у овој дисертацији приказани су јасно, концизно и систематично. Тумачење резултата је аргументовано, без спекулација. Резултати су детаљно представљени и структурно добро организовани, графички и табеларно интерпретирани, правилно анализирани и критички упоређени са релевантним резултатима из литературе.

Тестирањем на плагијаризам помоћу програмског пакета iThenticate (<https://www.ithenticate.com/>) утврђен је проценат преклапања од 5%. Увидом у Извештај о

тестирању на плагијаризам Комисија констатује да је кандидаткиња адекватно цитирала коришћену литературу.

#### **IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме?

Да. Комисија закључује да је ова дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе?

Да. Комисија оцењује да ова дисертација садржи све битне елементе.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?

Реализацијом ове докторске дисертације први пут су тестирана једињења из приказане библиотеке деривата жучних киселина у смислу инхибиције ензима

3 $\alpha$  хидроксистероид дехидрогеназе типа 3. За једињења која су прелиминарним тестовима показала инхибиторни потенцијал, процењена је јачина и специфичност инхибиције, а расветљавањем структурних основа везивања једињења за овај ензим дат је допринос фундаменталној науци, али су и оптимизоване методе којима је отворен пут ка будућим истраживањима утицаја различитих једињења на активност различитих хетерологно експримираних ензима, те, дугорочно, и проналажењу потенцијалних лекова. Такође, кристалографским студијама први пут је одређена структура сродног ензима 17 $\beta$ ХСД-5 у апопротеинској форми, без артефаката кристализације, поред једне структуре са лигандом из библиотеке деривата жучних киселина.

4. Који су недостаци дисертације и какав је њихов утицај на резултат истраживања?

Комисија сматра да дисертација нема суштинских недостатака.

**X ПРЕДЛОГ:**

На основу наведеног, комисија предлаже:

**a) да се докторска дисертација прихвати, а кандидату одобри одбрана;**

б) да се докторска дисертација врати кандидату на дораду (да се допуни односно измени);

в) да се докторска дисертација одбије.

Место и датум: Нови Сад, 02. 06. 2022.

др Сузана Јовановић-Шанта, редовни професор, председник

\_\_\_\_\_

др Наталија Половић, редовни професор, члан

\_\_\_\_\_

др Жељко Поповић, ванредни професор, члан

\_\_\_\_\_

др Едвард Петри, ванредни професор, члан

\_\_\_\_\_

др Анђелка Ћелић, ванредни професор, члан– ментор

**НАПОМЕНА:** Члан комисије који не жели да потпише извештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извештај образложење односно разлоге због којих не жели да потпише извештај и да исти потпише.