

PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET**Vijeću Prirodno-matematičkog fakulteta**

PREDMET: Ocjena o pregledu i ocjeni Master rada kandidata Saše Perovića, spec.sci eksperimentalne biologije i biotehnologije

Na osnovu pregledanog rada i uslova utvrđenih Zakonom o visokom obrazovanju i Statutom Univerziteta Crne Gore, podnosimo sljedeći

IZVJEŠTAJ**Analiza Master rada:****Postavljeni ciljevi rada:**

Za process kondenzacije genetičkog materijala, na osnovu vodećih studija iz ove oblasti, zaslužan je pentamerni, proteinski kompleks kondenzin. Za većinu naučnika koji se bave hromozomskom biologijom, a posebno procesom kondenzacije, još od devedesetih godina prošlog vijeka, nije jasna potpuna struktura i funkcija ovog multisubjedinичnog kompleksa, nađenog kod svih živih bića, u manje ili više izmijenjenoj varijanti. Ciljevi ovog istraživanja naslanjaju se na ovu konstataciju. Naime, u ovom radu nastojalo se dati doprinos u razumijevanju protein-protein interakcija između pojedinih subjedinica kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*) koje grade kondenzin, i to Ycg1 i Brn1 subjedinica, ispitivanjem njihovih konzervativnih aminokiselinskih sekvenci u smislu sposobnosti da učestvuju u međuproteinskoj interakciji. U slučaju potvrđivanja postojanja protein-protein interakcija, cilj je bio identifikovati koji je to protein od ostalih kondenzinskih subjedinica (tzv. proteinski partner u vezivanju). Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je i provjeriti da li su i u kojoj mjeri takva konzervativna aminokiselinska polja bitna za protein-DNK interakciju, a takav vid interakcije je najproučavaniji kod kondenzina i njemu sličnih proteinskih kompleksa. Takođe, unošenjem mutacija u određene suspektne aminokiseline, nastojalo se utvrditi da li iste utiču na formiranje određenih subkompleksa u okviru kondenzina, prije svega Smc2-Brn1. Konačno, glavni ciljevi ove studije su doprinos razumijevanju strukture kondenzinskog kompleksa kod kvasca kao modela, a sve u cilju rasvjetljavanja svih njegovih funkcija u živim bićima.

Primijenjene metode:

U ovom istraživanju primijenjene su najsavremenije molekularno-biološke metode, koje se koriste u svim ovakvim studijama širom svijeta. Eksperimentalni dio istraživanja odrađen je u Laboratoriji za strukturu i dinamiku hromozoma, EMBL. U dijelu istraživanja koji se odnosi na ispitivanje izabranih konzervativnih aminokiselina u obrazovanju protein-protein interakcija u intaktnim ćelijama kvasca, korišćena je metoda *in vivo* fotokroslinkinga. Zahvaljujući procesu In fusion mutageneze i korišćenjem sintetičke fotoreaktivne aminokiseline Bpa (benzoil-fenilalanin), uvedene su mutacije u aminokiselinama koje okružuju ispitivane konzervativne aminokiseline, a sve na genima tih subjedinica sadržanih na plazmidima. Metodom transformacije plazmidima sa mutacijama dobijeni su željeni sojevi kvasca koji su podvrgnuti UV zračenju u metodi fotokroslinkinga. Rezultati su vizualizovani primjenom western blot metode. Važnost pomenutih konzervativnih aminokiselinskih sekvenci za vijabilnost kvasca ispitana je disekcijom tetrada i uzgojem haploidnih spora na sporulacionom medijumu.

U drugom dijelu istraživanja protein-protein interakcije ispitivane su *in-vitro*. Geni za određene subjedinice koje nose mutacije uvedeni su u vektore (plazmide), kojima su zatim transformisane kompetentne ćelije *E.coli*. U *in vitro* uslovima indukovana je transkripcija željenih gena (primjenom IPTG). Zatim je izvršena provjera postojanja protein-protein interakcija primjenom pull down testa. Rezultati su vizualizovani SDS PAGE metodom.

Analiza postojanja i procjene intenziteta protein-DNK interakcija izvršena je posredstvom EMSA metode, pri čemu su proteini prije izvođenja samog testa purifikovani primjenom hromatografskih metoda (ACTA pure hromatografija).

Dobijeni rezultati:

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju upućuju da ispitivana konzervativna polja dvije subjedinice kvasca, Brn1 i Ycg1, tj. njihove aminokiselinske sekvence koje su na osnovu procjene konzervativnosti postale predmet istraživanja, ne učestvuju u formiranju protein-protein interakcija. To se zaključuje iz rezultata western blottinga, gdje se vidi samo jedna traka koja se odnosi na pojedinačan protein, dok u slučaju pozitivne kontrole imamo dvije trake. Osim toga ispitivana aminokiselinska polja iako direktno ne učestvuju u međuproteinskom kontaktu, važna su za preživljavanje organizma, što se može vidjeti iz rezultata disekcije tetrada kvasca, gdje u haploidnom stanju ne rastu one spore koje nose mutirane verzije Brn1 gena. Takođe, na osnovu rezultata pull down testa, zaključuje se da je konzervativno polje u Brn1 subjedinici *Caethomium termophilum*-a (DNK136, analogno kvašćevom DNK40) od vitalnog značaja za obrazovanje Smc2-Brn1 subkompleksa. Nasuprot tome, ispitivanje važnosti mutacija u vratu Smc2 subjedinice za formiranje pomenutog subkompleksa, pokazalo je da one ne utiču bitno na stvaranje 3D strukture subkompleksa građenog od pomenute dvije subjedinice, a time ni na sklapanje čitavog kondenzinskog proteinskog kompleksa. Što se tiče uticaja mutacija u vratu Smc2 subjedinice na potvrđenu sposobnost ovog subkompleksa da veže DNK, pregledom

rezultata EMSA testa vidi se da ne postoji značajan uticaj, s tim što, čini se dvostruka mutacija u neznatno većoj mjeri redukuje sposobnost ovih proteina da vezuju DNK probu.

Primjenom *in vivo* fotokroslinkinga potvrđeno je da u interakciju sa Ycg1 stupa Brn1.

Iz rezultata se može vidjeti da je kandidat, primjenom i *in vivo* i *in vitro* tehnika ispitao različite odnose u samoj strukturi složenog kondenzinskog kompleksa, otkrivajući da određene konzervativne aminokiseline za koje se sa velikom vjerovatnoćom smatralo da učestvuju u protein-protein interakcijama, zapravo nemaju takvu ulogu, ali da su esencijalne za preživljavanje samog organizma. Sa druge strane uspio je da identifikuje proteinskog partnera koji učestvuje u međuproteinskom kontaktu sa Ycg1, a to je Brn1 proteinska subjedinica.

Zaključak i prijedlog komisije:

Nakon pregleda Master rada, analize rezultata i naučnog značaja ostvarenih istraživanja, komisija konstatuje da Master rad kandidata Saše Perovića, spec.sci eksperimentalne biologije i biotehnologije, pod naslovom "*Ispitivanje potencijalno novih protein-protein interakcija u molekulskom kompleksu kondenzina kvasca *Saccharomyces cerevisiae**", zadovoljava sve uslove naučno-istraživačkog rada. Postavljena tema ovog rada obrazložena je na savremen način, a iz rezultata se zaključuje da su sveobuhvatno ostvareni zadati ciljevi.

Na osnovu izliženog, komisija predlaže Vijeću Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta Crne Gore da rad kandidata Saše Perovića, pod nazivom "*Ispitivanje potencijalno novih protein-protein interakcija u molekulskom kompleksu kondenzina kvasca *Saccharomyces cerevisiae**" prihvati kao Master rad i odobri javnu usmenu odbranu.

KOMISIJA:

Prof dr Svetlana Perović

doc dr Slavica Vujović

prof dr Andjelka Šćepanović, mentor

