

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ – ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Извештај о оцени научне заснованости и оправданости предложене теме за израду докторске дисертације **Срђана З. Марковића**, мастера биохемије.

На редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду – Хемијског факултета, одржаној 10.9.2026 године (одлука 201/4), изабрани смо за чланове Комисије за подношење извештаја о оцени научне заснованости и оправданости предложене теме за израду докторске дисертације кандидата **Срђана З. Марковића**, мастера биохемије, пријављене под насловом: **„Конформационе промене химопаина у условима ограничене аутолизе“**.

На основу поднете и прикупљене документације, као и увида у досадашњи рад кандидата, подносимо Наставно-научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Биографски подаци о кандидату

Срђан З. Марковић је рођен 22.07.1990. године у Београду. Основну школу, Десанка Максимовић у Београду, је похађао од 1997. до 2004. године, а средњу школу, Четрнаесту београдску гимназију, од 2005. до 2009. године. Основне академске студије је уписао школске 2014/15. године на Хемијском факултету Универзитета у Београду, студијски програм Хемија. Основне академске студије је завршио 2018. године са просечном оценом 7,89 (седам и 89/100), одбранивши завршни рад под насловом „Превођење бутиролактона у акрилате“ са оценом 8 (осам). Мастер академске студије је уписао школске 2018/2019. године на Хемијском факултету Универзитета у Београду, на студијском програму Биохемија. Мастер академске студије је завршио 2019. године са просечном оценом 8,80 (осам и 80/100), одбранивши мастер рад под насловом „Пречишћавање папаина и испитивање утицаја реверзибилних и иреверзибилних инхибитора цистеин-протеаза на активност, стабилност и конформацију папаина“ са оценом 10 (десет) и стекао звање мастер биохемичар.

Докторске академске студије је уписао 2019. године на Хемијском факултету Универзитета у Београду, на студијском програму Биохемија, и положио све испите предвиђене планом и програмом докторских академских студија са просеком 10 (десет).

Кандидат Срђан Марковић бави се научно-истраживачким радом у области биохемије протеина, са фокусом на структурне транзиције и стабилност цистеинских протеаза сличних папаину, при Катедри за биохемију Хемијског факултета у Београду.

Говори течно енглески језик, а служи се и руским.

Б. Објављени научни радови и саопштења

Срђан Марковић је до сада објавио три рада, од тога један у часопису изузетних вредности (M21a), један у међународном часопису (M23) и један у тематском зборнику водећег међународног значаја (M13).

Библиографија кандидата, категорисана према Правилнику о стицању истраживачких и научних звања (Сл. Гласник РС, бр 169/2020-82):

Радови објављени у међународним часописима изузетних вредности (M21a):

- **Marković, S., Andrejević, N.S., Milošević, J. and Polović, N.Đ., 2023.** Structural transitions of Papain-like cysteine proteases: implications for sensor development. *Biomimetics*, 8(3), 281. <https://doi.org/10.3390/biomimetics8030281>

Радови објављени у међународним часописима (M23):

- **Marković, S., Milošević, J., Đurić, M., Lolić, A. and Polović, N., 2021.** One-step purification and freeze stability of papain at acidic pH values. *Archives of Biological Sciences*, 73(1), 57-64. <https://doi.org/10.2298/ABS201217001M>

Радови објављени у тематском зборнику водећег међународног значаја (M13):

- **Marković, S. and Polović, N., 2025.** Reversible Inhibition of Cysteine Proteases Using S-Methyl Methanethiosulfonate. In *Zymography: Principles, Process, and Pitfalls, Volume I* (259-267). New York, NY: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-4478-2_22

В. Образложење теме

1. Научна област: Хемијске науке

Ужа научна област: Биохемија

2. Предмет рада

Предмет истраживања предложене докторске дисертације су конформационе промене химопапаина изазване променама услова у раствору и контролисаном ковалентном модификацијом тиолне групе у активном центру ензима. Химопапаин, као представник цистеинских протеаза сличних папаину, одабран је као модел-систем јер истовремено

поседује изражену кинетичку стабилност нативне структуре и способност да под благим условима пролази кроз значајне конформационе прелазе, због чега представља погодан модел систем за непосредно проучавање везе између ковалентне модификације активног центра и конформационих промена целог ензима.

Истраживање у оквиру ове тезе чиниће три целине. Први део истраживања обухватиће развијање и оптимизацију стратегије за пречишћавање химопапаина из листа папаје таложним методама, уз његову основну биохемијску карактеризацију, у циљу добијања стабилног и репродуктивног модел-система. Чистоћа препарата и присуство аутолитичких фрагмената пратиће се натријум-додецилсулфат полиакриламидном гел електрофорезом (SDS-PAGE), активност синтетичким супстратом BAPNA, а идентитет изолованог ензима биће потврђен основном биохемијском карактеризацијом. Ради ограничавања аутолизе, стабилност препарата испитиваће се у условима удаљеним од рН оптимума и циклусима замрзавања и одмрзавања на различитим рН вредностима, уз праћење заостале активности и структурних промена реакцијом са синтетичким супстратом N- α -бензоил-D,L-аргинин-4-нитроанилид (BAPNA) и инфрацрвеном спектроскопијом са Фуријеовом трансформацијом (ATR-FTIR) ради дефинисања услова складиштења при којима се избегавају денатурација и агрегација.

Други део истраживања обухватиће реверзибилну инактивацију химопапаина применом S-метил-метантиосулфоната (MMTS), који са слободном тиолном групом каталитичког цистеина гради мешовиту дисулфидну везу, и његову накнадну реактивацију тиолним редукционим агенсом дитиотреитолом (DTT), уз структурну и биофизичку анализу добијених протеинских стања. Одредиће се молски односи ензима и инхибитора при којима се постиже потпуна и контролисана инхибиција, при чему ће се степен инхибиције и повратак активности после додатка DTT-а пратити реакцијом са синтетичким супстратом BAPNA. Утицај ковалентне модификације слободне тиолне групе и реактивације на структуру ензима испитиваће се комплементарним методама: изложеност хидрофобних површина растварачу праћењем флуоресценције 8-анилинонафтален-1-сулфонске киселине (ANS), заступљеност секундарних структура ATR-FTIR спектроскопијом уз деконволуцију Амидног I региона, а настанак агрегата SDS-PAGE електрофорезом. Посебна пажња биће посвећена степену реверзибилности структурних промена — односно томе у којој мери се, сразмерно повратку протеолитичке активности, ензим враћа у нативну конформацију.

Трећи део истраживања обухватиће иреверзибилну инхибицију химопапаина алкиловањем тиолне групе у активном центру (јодоацетамидом), ради потврде претходно детектоване конформационе промене потичу управо од модификације слободног каталитичког цистеина, а не од споредног ефекта реверзибилног реагенса коришћеног у другој целини, уз детаљну биофизичку анализу стања ензима добијених при инхибицији (ANS и унутрашња флуоресценција триптофана, ATR-FTIR анализа Амидног I региона, динамичко расејавање светлости и мерење зета-потенцијала).

3. Научни циљ истраживања

Главни циљ предложене дисертације је испитивање утицаја окружења и ковалентне модификације цистеина у активном центру ензима на конформационе промене цистеинских протеаза папаинског типа, на модел-систему химопапаина, као и развијање и оптимизација метода и протокола за изоловање, складиштење, инхибицију и реактивацију химопапаина у условима ограничене аутолизе и денатурације.

Најбитнији специфични циљеви предложене дисертације били би:

- Развијање и оптимизација поступка за изоловање и пречишћавање химопапаина из листа папаје таложењем солима, уз ограничавање аутопротеолизе и денатурације ензима и очување активности;
- Биохемијска карактеризација изолованог ензима;
- Одређивање оптималних услова за стабилизацију и складиштење ензима, уз праћење конформационе стабилности током циклуса замрзавања и одмрзавања;
- Постизање потпуне и контролисане реверзибилне инхибиције MMTS-ом и потпуне реактивације ензима DTT-ом, уз квантификацију степена повратка активности;
- Структурна и биофизичка карактеризација стања ензима након реверзибилне ковалентне модификације и реактивације, укључујући изложеност хидрофобних површина, прерасподелу секундарних структура и степен агрегације, ради одређивања степена реверзибилности конформационих промена;
- Постизање потпуне и контролисане иреверзибилне инхибиције алкиловањем цистеина у активном центру ензима јодоацетамидом;
- Потврда да конформационе промене примећене при реверзибилној инхибицији MMTS-ом потичу управо од модификације каталитичког цистеина, упоредном структурном анализом иреверзибилно инхибираних стања.

4. Методе истраживања

У току израде предложене докторске дисертације предвиђена је примена следећих техника и метода:

а) стандардне методе протеинске биохемије за изоловање, пречишћавање и карактеризацију химопапаина из листа папаје (фракционисање солима — натријум-хлоридом и амонијум-сулфатом, дијализа и одређивање концентрације протеина Бредфордском методом);

б) мерење протеолитичке активности синтетским супстратом BAPNA и казеинолитичком методом, као и желатинска зимографија;

в) електрофоретске технике: SDS-PAGE ради процене чистоће препарата, праћења аутолитичких фрагмената и детекције агрегата отпорних на термалну солубилизацију;

г) хемијска модификација слободне тиолне групе активног центра реверзибилним (MMTS) и иреверзибилним (јодоацетамид) реагенсом, уз реактивацију дитиотреитолом (DTT);

д) спектрофлуориметрија ради анализе интеракција протеина са ANS-ом и мерења унутрашње флуоресценције триптофана, што пружа увид у степен изложености хидрофобних површина растварачу и промену окружења ароматичних бочних остатака;

ђ) инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом у моду пригушене тоталне рефлексије (ATR-FTIR) и анализа Амидног I региона ради квалитативног и квантитативног праћења промена у секундарној структури;

е) техника динамичког расејавања светлости (DLS) за одређивање величине протеинских честица и агрегата, уз мерење зета-потенцијала (електрокинетичког потенцијала).

5. Актуелност проблематике у свету

Цистеин-протеазе папаинске суперфамилије представљају једну од најзначајнијих група протеолитичких ензима, како по биолошкој улози, тако и по комерцијалној вредности. Њихову тако широку употребу омогућавају две особине: изузетно широка супстратна специфичност, због које хидролизују практично сваки протеински супстрат, и висока стабилност у широком опсегу рН вредности и температура, због које остају активне и у грубим индустријским условима. Управо зато су ензими папаинског типа из папаје (*Carica papaya*) данас међу најшире примењиваним биокатализаторима — у прехранбеној, фармацеутској, козметичкој, текстилној и кожарској индустрији — при чему се и данас развијају нови поступци њиховог добијања и производње [1,2]. Истовремено, чланови исте суперфамилије имају и велики медицински значај: катепсини се доводе у везу са канцером, реуматoidним артритисом и другим обољењима и предмет су интензивног развоја инхибитора [3], док је папаину слична протеаза (PLpro) коронавируса SARS-CoV-2 валидована мета антивирусне терапије [4]. Овим ензимима се стога подједнако интензивно бави и примењена биотехнологија и фундаментална структурна биохемија.

Каталитичка активност свих ових ензима заснива се на слободној, високо реактивној тиолној групи цистеина каталитичке тријаде, која у механизму хидролизе пептидне везе има улогу нуклеофила. Управо та реактивност, неопходна за катализу, представља и место највеће осетљивости молекула: слободни цистеин је подложен оксидацији, променама

јонизационог стања и ковалентној модификацији, а промене у његовом непосредном окружењу, изазване поменутим процесима, одражавају се на конформацију читавог молекула [5]. Реактивност овог остатка се данас систематски и намерно користи: активни центар цистеинских протеаза представља класичну мету ковалентних, иреверзибилних инхибитора — епоксисукцинилних пептида, халометил-кетона и других алкилујућих агенаса [6] — при чему се реагенси са јодоацетамидном групом рутински примењују за трајно блокирање каталитичког цистеина [7]. Упркос тако широкој употреби ковалентних модификатора, остаје отворено питање шта се са самим ензимом дешава када се његов каталитички цистеин модификује — у ком обиму се мења конформација, да ли долази до агрегације и колико су те промене реверзибилне. Структурне последице модификације саме каталитичке тиолне групе до сада нису систематски описане, што представља јасну и актуелну научну празнину.

Посебан изазов у раду са протеазама јесте аутолиза — способност ових ензима да разграђују сами себе и друге молекуле исте врсте. Под условима блиским рН оптимуму протеазе папаинског типа подлежу аутолизи, при којој долази до разградње молекула, губитка активности и пратећих структурних промена; последице су низак принос и ограничена чистоћа препарата, као и краћи век трајања, што је документовано и при класичном двостепеном таложењу папаина из латекса, где принос активности остаје низак [8]. Из тога следе два практична захтева: развој једноставног поступка изоловања са високим приносом, при коме се губици услед аутолизе своде на минимум а идентитет препарата недвосмислено потврђује, и одређивање услова складиштења при којима је даљи губитак активности најмањи. Као стратегија привремене заштите активног центра све чешће се разматра и реверзибилна ковалентна модификација слободне тиолне групе [9], која омогућава накнадну реактивацију ензима редукционим агенсима. Код транспортних протеина, као што је албумин серума, је описано да тиолни статус цистеинског остатка утиче на масивне конформационе промене и агрегацију, те да је оксидација тиолне групе донекле иреверзибилна [10], што поново отвара питање колико је такав приступ безбедан за структуру ензима и до које границе је стварно реверзибилан.

Конформација и стабилност нису само физичкохемијске одлике ензима — оне одређују и све оно што се од њега у пракси очекује: принос при изоловању, очувану активност после чувања, отпорност на аутолизу и предвидиво понашање при употреби. Због тога питање шта се са молекулом дешава када му се модификује каталитички цистеин није само теоријско: слободна тиолна група је место преко кога се ови ензими рутински инхибирају, привремено заштићују, поново активирају и везују за носаче, па од тога да ли таква модификација нарушава стабилност и мења нативну конформацију зависи и то да ли је сам поступак заиста реверзибилан.

Стога систематско проучавање конформационих промена химопапаина — најзаступљеније, а знатно мање испитане цистеинске протеазе латекса папаје — у условима ограничене аутолизе и контролисане модификације активног центра представља актуелан

научни проблем, чија применљивост покрива готово све области у којима се ови ензими користе: од биотехнологије, преко медицине и фармације, до прехранбене индустрије.

6. Очекивани резултати

У предложеној дисертацији очекује се напредак у разумевању структурних транзиција и конформационих промена цистеинских протеаза сличних папаину, у зависности од услова у раствору и стања цистеина у активном центру ензима. Очекује се оптимизован и репродуктиван протокол за пречишћавање химопапаина из листа папаје уз добро очување активности, као и дефинисани оптимални услови складиштења који ограничавају аутолизу и структурну дестабилизацију протеина. Добијени структурни и биофизички подаци омогућиће детаљније разумевање молекулских механизма конформационих промена изазваних ковалентном модификацијом тиолне групе у активном центру, као и степена њихове реверзибилности након реактивације.

Укупно, очекује се да ће резултати допринети унапређењу стратегија за добијање, стабилизацију и контролисану инактивацију и реактивацију цистеинских протеаза сличних папаину, са потенцијалном применом у биотехнолошким процесима и биомедицинским истраживањима.

7. Литература

1. Fernández-Lucas, J., Castañeda, D. and Hormigo, D., 2017. New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 68, 91-101. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.017>
2. Gonzalez-Rabade, N., Badillo-Corona, J.A., Aranda-Barradas, J.S. and del Carmen Oliver-Salvador, M., 2011. Production of plant proteases *in vivo* and *in vitro*—a review. *Biotechnology advances*, 29(6), 983-996. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.017>
3. Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B. and Turk, D., 2012. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1824(1), 68-88. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.10.002>
4. Shin, D., Mukherjee, R., Grewe, D., Bojkova, D., Baek, K., Bhattacharya, A., Schulz, L., Widera, M., Mehdipour, A.R., Tascher, G. and Geurink, P.P., 2020. Papain-like protease regulates SARS-CoV-2 viral spread and innate immunity. *Nature*, 587(7835), 657-662. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2601-5>

5. Edwin, F. and Jagannadham, M.V., 2000. Single disulfide bond reduced papain exists in a compact intermediate state. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1479(1-2), 69-82. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00062-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00062-5)
6. Powers, J.C., Asgian, J.L., Ekici, Ö.D. and James, K.E., 2002. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chemical reviews*, 102(12), 4639-4750. <https://doi.org/10.1021/cr010182v>
7. Hartman, K., Mielczarek, P. and Silberring, J., 2020. Synthesis of the novel covalent cysteine proteases inhibitor with iodoacetic functional group. *Molecules*, 25(4), 813. <https://doi.org/10.3390/molecules25040813>
8. Nitsawang, S., Hatti-Kaul, R. and Kanasawud, P., 2006. Purification of papain from Carica papaya latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. *Enzyme and Microbial technology*, 39(5), 1103-1107. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.02.013>
9. Makarov, V.A., Tikhomirova, N.K., Savvateeva, L.V., Petushkova, A.I., Serebryakova, M.V., Baksheeva, V.E., Gorokhovets, N.V., Zernii, E.Y. and Zamyatnin Jr, A.A., 2019. Novel applications of modification of thiol enzymes and redox-regulated proteins using S-methyl methanethiosulfonate (MMTS). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1867(11), 140259. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.07.012>
10. Andrejević, N., Petrović, P., Stevanović, S., Urbič, T., Polović, N., 2026. Human serum albumin: Amyloid or amorphous aggregation? The influence of thiol status and ligand binding. *Journal of Molecular Liquids*, 446, 129290, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2026.129290>

Г. Закључак

На основу свега изложеног, Комисија сматра да је предложена тема докторске дисертације актуелна и научно заснована, као и да очекивани резултати представљају напредак и научни допринос у области протеинске биохемије и биохемије цистеинских протеаза. У складу са Законом о високом образовању и Статутом Хемијског факултета у Београду, сматрамо да кандидат испуњава све предвиђене услове за одобрење израде докторске дисертације. Комисија зато предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Хемијског факултета да кандидату Срђану Марковићу, мастеру биохемије, одобри израду докторске дисертације под насловом: **„Конформационе промене химопапаина у условима ограничене аутолизе“**.

Комисија предлаже за ментора др Наталију Половић, редовног професора Универзитета у Београду – Хемијског факултета. Спискови радова предложеног ментора објављених у научним часописима Science Citation Index (SCI) листе, који ментора квалификују за вођење докторске дисертације кандидата, дати су у **Прилогу 1** овог извештаја.

Београд, 23.9.2026. године

Комисија:

др Наталија Половић (ментор), редовни професор
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

др Радивоје Продановић, редовни професор,
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

др Немања Мијин, научни сарадник,
Универзитет у Београду – Институт за хемију, технологију и металургију ИХТМ,
Институт од националног значаја за Републику Србију

Прилог 1

Списак радова предложеног ментора објављених у научним часописима са SCI листе који ментора квалификују за вођење докторске дисертације.

Име и презиме ментора: **др Наталија Половић**

Звање: **Редовни професор**

Изабрани радови предложеног ментора:

1. Andrejević, N., Petrović, P., Stevanović, S., Urbič, T. and **Polović, N.**, 2026. Human serum albumin: Amyloid or amorphous aggregation? The influence of thiol status and ligand binding. *Journal of Molecular Liquids*, 129290.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2026.129290>
2. Tintor, Đ., Ninković, K., Milošević, J. and **Polović, N.**, 2024. Gaining insight into protein structure via ATR-FTIR spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 134, 103726.
<https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2024.103726>
3. Mijin, N., Milošević, J., Stevanović, S., Petrović, P., Lolić, A., Urbic, T. and **Polović, N.**, 2023. Amyloid-like aggregation influenced by lead (II) and cadmium (II) ions in hen egg white ovalbumin. *Food Hydrocolloids*, 136, 108292.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108292>
4. Milošević, J., Prodanović, R. and **Polović, N.**, 2021. On the protein fibrillation pathway: oligomer intermediates detection using ATR-FTIR spectroscopy. *Molecules*, 26(4), 970.
<https://doi.org/10.3390/molecules26040970>
5. Vatić, S., Mirković, N., Milošević, J.R., Jovčić, B. and **Polović, N.**, 2021. Trypsin activity and freeze-thaw stability in the presence of ions and non-ionic surfactants. *Journal of bioscience and bioengineering*, 131(3), 234-240.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.10.010>