

UNIVERZITET U BANJOJ LUCI
 FAKULTET: Prirodno-matematički fakultet



РЕПУБЛИКА СРПСКА
 УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
 Природно-математички факултет
 Број: 19-1492/14
 Датум: 20.06.2014 год.
 БАЊА ЛУКА

IZVJEŠTAJ

o ocjeni podobnosti teme i kandidata za izradu doktorske teze

PODACI O KOMISIJI

Na osnovu odluke Naučno-nastavnog vijeća Prirodno-matematičkog fakulteta br. 19/3.254/14 imenovana je Komisija za ocjenu podobnosti teme i kandidata mr Dušana Materića za izradu doktorske disertacije pod nazivom "Biohemijsko-bioinformatička analiza proteinskih profila i isparljivih organskih jedinjenja sa ciljem identifikacije ektomikoriznih vrsta gljiva i monitoring ekosistema"

Komisija u sastavu:

1. dr Jelena Vukojević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, uža naučna oblast Algologija i mikologija, mentor- predsjednik
2. dr Biljana Kukavica, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci, uža naučna oblast Biohemija, molekularna biologija, mentor-član
3. dr Dragan Matić, docent, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci, Uža naučna oblast Informacione nauke i bioinformatika (razvoj softvera), član

Sastav Komisije sa naznakom imena i prezimena svakog člana, zvanje, naziv uže naučne oblasti za koju je izabran u zvanje, naziv univerziteta i fakulteta u kojem je član komisije stalno zaposlen.

1. BIOGRAFSKI PODACI, NAUČNA I STRUČNA DJELATNOST KANDIDATA

Dušan Materić je rođen u Bihaću, Bosna i Hercegovina, 4. aprila 1980. godine. Osnovnu školu je završio u Drvaru a srednju, šumarsko tehničku, u Banjoj Luci. Četvorogodišnje studije biologije je počeo 1998 god. na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Banjoj Luci. Diplomski rad iz biohemije pod nazivom "Ciklopentadienilni kompleks željeza kao inhibitor tripsina" pod mentorstvom prof. dr Zorana Kukrića, odbranio je 7. jula 2003. godine sa ocjenom 10 i opštim uspjehom tokom školovanja 8,3. U toku apsolventskog staža je kao laborant, asistirao na predmetu Biologija algi i gljiva. Nakon studija je upisao jednogodišnji kurs engleskog jezika na Impact College, Reading, UK, gdje je stekao Oxfords First Certified. Po povratku iz Engleske je preko programa italijanske ambasade u Sarajevu za razmjenu studenata dobio stipendiju za

osamnaestomjesečni kurs (specijalizaciju) iz proteomike primjenjene u zootehnologiji, koji je počeo u aprilu 2005. i trajao do novembra 2006. god. Specijalizacija je održana na Istituto Sperimentale Italiano "Lazzaro Spallanzani", Milano, i obuhvatala je uglavnom eksperimentalne metode dvodimenzionalne gel elektroforeze kao i bioinformatičke metode obrade rezultata. Od 5. februara 2007 god. je bio zaposlen u Srednjoj školi Drvar, na mjestu profesora biologije, a pored Biologije je predavao i predmete: Informatika i Računarstvo sa programiranjem.

Školske 2008/09 god. upisao je magistarske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Banjoj Luci na studijskom programu Biologija, smjer – biosistematika. Magistarski rad pod naslovom "Biohemijska, molekularna i bioinformatička analiza taksona gljiva podcarstva Dikarya", pod mentorstvom doc. dr Biljane Kukavica i prof. dr Jelene Vukojević je odbranio 31.10.2011.

Od 10. septembra 2009. god. je bio zaposlen kao asistent na Pedagoškom Fakultetu Bijeljina, Univerziteta u Istočnom Sarajevu, na biološkoj grupi predmeta. Od 01. aprila 2013. godine radi kao mladi istraživač na The Open University, UK, stipendista Marie Curie asocijacije.

Objavljeni naučni radovi:

1. Materić D. 2013. STestGenerator – program za generisanje različitih tipova testova provjere znanja i njegova primjena u biološkim naukama. Nova Škola, 11: 91-102
2. Materić D., Kukavica B., Boroja M., Vukojević J. 2012. Optimizacija protokola za ekstrakciju proteina iz plodonosnih tijela gljiva (vrste rodova: Boletus, Russula, Lactarius i Agaricus) za SDS-elektroforezu. Skup, IV(1): 36-41.
3. Materić, D. 2011. Promjene u sistematici živog svijeta, carstva gljiva i pedagoške implikacije. Nova Škola, 8: 213-222.
4. Materic D., Roncada P., Fortin R., Caviraghi A., Greppi G.F. 2006. A two-dimensional electrophoresis approach for bovine meat quality evaluation, Buiatria: Journal of the Italian Association for Buiiatrics, 38: 95-101.

Učešće na naučnim skupovima:

Materić D. STestGenerator – program za generisanje različitih tipova testova provjere znanja i njegova primjena u biološkim naukama. Treći naučni skup sa međunarodnim učešćem: Savremena škola – izazovi i dileme. Pedagoški fakultet Bijeljina. 2012.

Materić D., Kukavica B., Boroja M., Vukojević J. Protocols optimization for the extraction of proteins from fruiting bodies of fungi (genera: Boletus, Russula, Lactarius and Agaricus) for SDS-electrophoresis. II Simpozium Biologa Republike Srpske. OJ Prirodno-Matematički fakultet, Banja Luka. 2010.

Materić D., Kukavica B., Vukojević J. Principles and trends in fungal systematics. II Simpozium Biologa Republike Srpske. OJ Prirodno-Matematički fakultet, Banja Luka. 2010.

Materić D. Promjene u sistematici živog svijeta, carstva gljiva i osnovno školstvo. Prvi

naučni skup sa međunarodnim učešćem: Stanje i perspektive u osnovnom i predškolskom vaspitanju i obrazovanju. Pedagoški fakultet Bijeljina. 2010.

- a) Navesti neophodne biografske podatke: školovanje, uspjeh u toku školovanja, kretanje u službi, rezultati naučno-istraživačkog ili stručnog rada, javna priznanja, društvene aktivnosti i poznavanje stranih jezika;
- b) U prilogu biografije dostaviti spisak objavljenih naučnih radova.

2. ZNAČAJ I NAUČNI DOPRINOS ISTRAŽIVANJA

Značaj istraživanja:

Iako se savremena taksonomija gljiva uglavnom zasniva na molekularnim metodama, razvoj pouzdane biohemijske metode identifikacije gljiva na osnovu proteinskih profila, bio bi od velike praktične važnosti, prvenstveno sa aspekta brzine dobijanja rezultata, pristupačnosti laboratorijske opreme i rentabilnosti. U magistarskom radu je kandidat razvio biohemijsko-bioinformatičke metode taksonomije za analizu plodonosnih tijela gljiva (Materić, 2011). Razvijen je Distance -matrix algoritam poređenja proteinskih traka i analizirani su proteinski profili gljiva dobijeni 1D SDS elektroforezom. Primjenom ove metode, koja koristi biohemijske podatke, dobijeni su dendrogrami identični onima koji su dobijeni analizom molekularnih podataka ITS1 regiona rDNA, čime je pokazano su proteinski profili, jednako pouzdan pokazatelj taksonomskih odnosa na nivou familije, roda i vrste, kao što su to molekularni podaci. Nastavak istraživanja u okviru doktorske disertacije bio bi u pravcu razvoja biohemijsko-bioinformatičke metode identifikacije vrsta gljiva iz nepoznatog uzorka, koja bi bila primjenljiva u sistematici, ekologiji, šumarstvu, fitopatologiji, poljoprivredi i dr. Ciljna grupa organizama za ovaj rad bi bile prvenstveno ektomikorizne gljive (rodovi: *Boletus*, *Suillus*, *Leccinum*, *Lactarius*, *Russula*, *Amanita*, *Macrolepiota*, *Tuber*) ali i predstavnici ekološki i privredno važnih saprobnih i parazitskih vrsta gljiva (*Agaricus*, *Pleurotus*, *Polyporus*, *Fomes*).

Drugi dio doktorske disertacije bila bi analiza isparljivih organskih jedinjenja (IOJ) koja se oslobadaju u procesu metabolizma gljiva kao sekundarni metaboliti. Izopren kao najvažniji predstavnik IOJ se emituje od strane biljaka u ogromnoj količini, ravnoj ukupnoj emisiji metana od strane biljaka (Sharkey et al. 2008). Emisija IOJ je proučavana kod biljaka i životinja, ali je malo istraživanja kod predstavnika carstva gljiva. Analiza količine emitovanja isparljivih organskih jedinjenja od strane nekih predstavnika gljiva (*Agaricus sp.*, *Suillus sp.*, *Glomus sp.* i sl.) bila bi značajna za dobijanje informacija o količini oslobođenog izoprena kao najznačajnijeg predstavnika isparljivih organskih jedinjenja i dublju predstavu o ulozi gljiva u ekosistemu. Takođe, da li i u kojoj mjeri mikorizne gljive utiču na emisiju isparljivih organskih jedinjenja biljaka bi bilo od velike važnosti sa aspekta procjenjivanja doprinosa globalnoj emisiji.

Pregled istraživanja:

Gljive su posebna grupa organizama čija taksonomija i sistematika predstavlja veliki izazov savremenoj nauci (Alexopoulos, 1962; Guarro et al., 1999; Ingold et al., 1973; Marinović, 1991). Najnovija taksonomska istraživanja podupiru stav izdvajanja gljiva u carstvo Fungi, koje je podijeljeno na 7 razdjela, od kojih su Basidiomycota i Ascomycota svrstani u podcarstvo Dikarya. Gljive predstavljaju važnu kariku u ekosistemima s obzirom na njihovu ulogu u razgradnji organskih materija, a time i njeno vraćanje u ciklus kruženja materije (Alexopoulos, 1962; Guarro et al., 1999). S druge strane, značaj gljiva za ekosisteme se proučava i sa aspekta njihove sposobnosti da sa višim biljkama grade specifične simbiotske zajednice (mikorize), što je privuklo pažnju naučnika još sredinom prošlog vijeka (Kelley, 1950). Novija istraživanja upućuju na činjenicu da su mikorize esencijalne za život viših biljaka, jer između ostalog obezbjeđuju povećanje asimilacione površine korjena time što hife grade mrežu koja se proteže kroz cijeli ekosistem obezbjeđujući svojevrstan sistem prometa materija. Stoga, proučavanje prisustva simbiotskih gljiva kao i razmjene materija sa višim biljkama u smislu monitoringa stanja ekosistema je opravdano.

Radna hipoteza sa ciljem istraživanja:

Upotreba SDS i 2D elektroforeze u taksonomiji ima višestruku prednost: proteinski profili su bogat izvor biomarkera, te u poređenju sa molekularnim metodama relativno je brza i rentabilna (Westermeier, 1993; Westermeier & Naven, 2002). Metoda zasnovana na biohemijsko-bioinformatičkoj identifikaciji bila bi primjenljiva u mikologiji, fitopatologiji, šumarstvu i privredi, te u sistematici i taksonomiji izvan okvira carstva gljiva. Mikorizne vrste gljiva svojim hifama obezbjeđuju optimalnije usvajanje hranljivih materija iz zemljišta te se to može vidjeti i na emisiji sekundarnih metabolita kao što su isparljiva organska jedinjenja.

S obzirom na postavljene hipoteze ciljevi rada su:

- 1) Optimizacija protokola za ekstrakciju proteina za uzorke gljiva različitog stadijuma razvića, ektomikoriznih i parazitskih gljiva.
- 2) Optimizacija protokola za 1D i 2D elektroforeze.
- 3) Razvoj algoritma koji će na osnovu numeričkih podataka za proteinske profile moći izvršiti poređenje i uspješnu identifikaciju/ determinaciju vrste.
- 4) Gljive proizvode isparljiva organska jedinjenja u različitim fazama razvoja mjerenje nivoa isparavanja isparljivih organskih jedinjenja u prvom redu izoprena.

Materijal i metode rada:

Materijal

Eksperimentalni materijal bi bile privenstveno ektomikorizne gljive (rodovi: *Boletus*, *Suillus*, *Leccinum*, *Lactarius*, *Russula*, *Amanita*, *Macrolepiota*, *Tuber*) i predstavnici ekološki i privredno važnih saprobnih i parazitskih vrsta gljiva (*Agaricus*, *Pleurotus*, *Polyporus*, *Fomes*).

Metode:

Elektroforetske tehnike koje podrazumjevaju korištenje SDS-PAGE (1D i 2D), izoelektrično fokusiranje u opsegu pH 3-10. Za kvantifikaciju sadržaja proteina u uzorku koristiće se spektrofotometrijske tehnike po Lowry-u i Bradfordu (Bradford, 1976), dok će za analizu proteinskih traka na gelu biti korišten softver TotalLab Quant i prethodno razvijen program MWcalc1D u magistraskom radu kandidata. Za analizu rezultata elektroforeze će se koristiti standardne bioinformatičke i klasične metode kao što su: distance matrix, maximum likelihood i neighbor-joining. Za razvijanje novih aplikacija će se koristiti multiplatformski programski jezik Java, i po potrebi C, C++ i Perl. Kladišćke i taksometrijske obrade kao i grafičko predstavljanje filogenetskih stabala će se ostvariti korištenjem programskog paketa PHYLIP (PHYLogeny Inference Package) (www.phylip.com).

- 1) SDS elektroforeza (Bio-Rad Mini Gel sistem)
- 2) Za spektrofotometrijska mjerenja će biti korišten spektrofotometar Shimadzu 1800 UV-USA.
- 3) Gasno maseni spektrometar GC-MS će se koristiti za analizu isparljivih organskih jedinjenja

Faze u izradi doktorske disertacije:

- 1) Prikupljanje uzoraka ektomikoriznih, saprobnih i parazitskih vrsta gljiva. Uzorci ciljnih vrsta gljiva (iz rodova: *Boletus*, *Suillus*, *Leccinum*, *Lactarius*, *Russula*, *Amanita*, *Macrolepiota*, *Tuber*, *Agaricus*, *Pleurotus*, *Polyporus*, *Fomes*), će se prikupljati sa dostupnih prirodnih lokaliteta, obilježiti, zamrznuti i čuvati na temperaturi od -20°C. Pri sakupljanju vodiće se računa o tome da se izaberu vrste koje se pouzdano mogu identifikovati upotrebom dostupnih ključeva.
- 2) Ekstrakcija i razdvajanje proteina metodom SDS elektroforeze. Optimizacija protokola za 1D SDS i 2D SDS elektroforezu podrazumijeva: optimizaciju protokola za ekstrakciju i kvantifikaciju proteina i optimizaciju vizuelizacije proteinskih traka. Optimizacija ekstrakcije proteina će ići u pravcu što bolje homogenizacije različitih vrsta uzoraka te prilagodavanje sastava pufera za izdvajanje što veće količine proteina. Optimizacija kvantifikacije proteina u ekstraktu će se vršiti zbog mogućeg prisutva velike količine fenola u uzorcima gljiva. Zbog toga će se koncentracija proteina određivati metodom po Lowry-u i Bradfordu. Budući da će se raditi sa uzorcima koji sadrže relativno malo proteina (uzorci lišajeva, uzorci ektomikoriza na korjenu i sl.), dovoljna osjetljivost će

se postići bojenjem gelova srebro nitratom čiji protokol mora da se optimizuje.

3) Analiza rezultata dobijenih elektroforezom i pravljenje baze proteinskih profila karakterističnih vrsta.

Rezultati dobijeni elektroforezom će se analizirati standardnim (npr. TotalLab) i prethodno razvijenim softverskim alatima u magistarskom radu u cilju dobijanja numeričkih podataka: (1) molekulske mase za svaki protein i (2) relativnog inteziteta svake proteinske trake. Poseban akcenat će biti stavljen na utvrđivanje sličnosti proteinskih profila između anamorfa i teleomorfa u cilju razvijanja kompjuterske metode identifikacije. Numerički podaci će se pohraniti u bazu podataka pogodnu za *in-silico* analizu.

4) Razvijanje algoritma i aplikacije za identifikaciju i determinaciju vrsta na osnovu kvalitativne i kvantitativne analize proteinskih profila.

Za dalju analizu razviće se algoritam izdvajanja karakterističnih proteina koji će služiti kao bar-kod ili fingerprint date vrste. Razviće se softverski alat koji će prema ovim karakterističnim proteinima, koji su jedinstveni za svaku vrstu, vršiti testiranje prisustva određene vrste u nepoznatom uzorku ili, u slučaju plodonosnih tijela, identifikaciju.

5) Prikupljanje uzoraka isparljivih organskih jedinjenja koristeći "pull" ili "push-pull" sistem (Tholl et al, 2006).

Budući da su isparljiva organska jedinjenja jako reaktivna, za uzorkovanje će se koristiti teflonske ili nalofenske vrećice. U teflonske vrećice će se pumpom uzorakovati tačna zapremina gasa iz mikrokosmosa uzgajališta gljiva gdje su gljive u različitim stadijumima razvića. Takođe će se uzorkovati gas sadnica zatvorenih u teflonsku vreću koje na svom korjenovom sistemu imaju ili nemaju razvijene mikorizne gljive. Uzorkovani gas će se transportovati do laboratorije u prirodnim uslovima i u roku nekoliko sati analizirati.

6) Analiza isparljivih organskih jedinjenja pomoću GC-MS, SIFT-MS i analiza rezultata. Pomoću uređaja GC-MS će se nakon kalibracije analizirati cijeli spektar gasovitih jedinjenja različitih molekulskih masa. Prilikom analize rezultata obratiće se pažnja na koncentracije pojedinih isparljivih organskih jedinjenja kao što je izopren. Očekivano je da se vidi statistički značajna razlika između koncentracija određenih isparljivih organskih jedinjenja između mikoriznih i ne mikoriznih biljaka.

Dio eksperimenata će se obaviti na The Open University, UK, gdje će se obaviti mjerenja emisije isparljivih organskih jedinjenja sa uređajima SIFT-MS i TD-GS-MS.

Naučni doprinos doktorske disertacije:

Posjedovanje brze i rentabilne biohemijsko-bioinformatičke metode identifikacije i determinacije gljiva koja bi bila primjenljiva na sve stadijume razvića gljiva, bilo bi od velikog značaja. Razvoj nove, biohemijske metode bi omogućio identifikaciju gljiva koje su u mikorizi sa korjenovim sistemom viših biljaka, identifikaciju prisustva patogenih gljiva u biljnim tkivima, determinaciju morfološki sličnih vrsta, što bi dalo osnovu za jedan kompletniji monitoring stanja i promjena u ekosistemima, te bi moglo da ima ekonomski

značaj ako se ispituje prisustvo ekonomski važnih vrsta (tartufi, ljekovite rijetke vrste i sl.). Gljive u simbiozi za višim biljkama višestruko poboljšavaju usvajanje i protok hranljivih materija iz zemljišta osiguravajući opstanak biljaka u izrazito nepovoljnim uslovima sredine (Govindarajulu et al., 2005). Takođe, mjerenje emisije isparljivih organskih jedinjenja gljiva bi bilo nov i jedinstven pristup koji bi uticao na procjenu ukupne globalne emisije ovih jedinjenja.

CITIRANA LITERATURA:

1. Alexopoulos, C.J. 1962. *Introductory Mycology*, Second Edition. John Wiley and Sons, Inc., London.
2. Bradford, M.M. (1976), "Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.* 72: 248–254
3. Govindarajulu, M., Pfeffer, P. E., Jin, H., Abubaker, J., Douds, D. D., Allen, J. W., . . . Shachar-Hill, Y. (2005). Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature*, 435(7043), 819-823.
4. Guarro, J., Gené, J., Stchigel, A.M. 1999. Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews.* 12: 454-500.
5. Ingold, C.T. 1973. *The Biology of Fungi*, Revised and Expanded Edition. Hutchinson Educational. London.
6. Kelley, P. A. 1950. *Mycotrophy in Plants*. Waltham. Mass., USA.659.
7. Marinović, Ž. R. 1991. *Osnovi Mikologije i Lihenologije*. Naučna Knjiga. Beograd.
8. Sharkey, T. D., Wiberley, A. E., Donohue, A. R. (2008). Isoprene emission from plants: why and how. *Annals of Botany*, 101(1), 5-18. .
9. Tholl, D., Boland, W., Hansel, A., Loreto, F., Röse, U. S. R., Schnitzler, J.-P. (2006). Practical approaches to plant volatile analysis. *The Plant Journal*, 45(4), 540–560.
10. Westermeier, R., Naven, T. 2002. *Proteomics in Practice: A Laboratory Manual of Proteome Analysis*. WIEY-VCH. Weinheim.
11. Westermeier, R. 1993. *Electrophoresis in Practice: A Guide to Theory and Practice*. WIEY-VCH. Weinheim.

3. OCJENA I PRIJEDLOG

Na osnovu prethodno navedenog Komisija smatra da kandidat mr Dušan Materić ispunjava sve Zakonom predviđene uslove za izradu prijavljene doktorske disertacije. S obzirom na uspješno odbranjen magistarski rad i objavljene radove iz iste oblasti Komisija smatra da kandidat posjeduje odgovarajuće naučne kvalifikacije da pristupi izradi navedene doktorske disertacije. Predložena istraživanja su aktuelna i naučno opravdana, a rezultati koji se očekuju će imati svoj fundamentalni i primjenjeni značaj. Komisija je saglasna u ocjeni da je tema „Biohemijsko-bioinformatička analiza proteinskih profila i isparljivih organskih jedinjenja sa ciljem identifikacije ektomikoriznih vrsta gljiva i monitoring ekosistema" podobna za izradu doktorske disertacije, kao i da je kandidat mr Dušan Materić dobar za izradu iste.

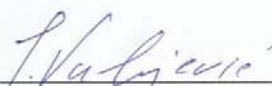
Zbog svega prethodno navedenog, Komisija predlaže Naučno-nastavnom Vijeću Prirodno-matematičkog fakulteta u Banjoj Luci da prihvati ovaj Izvještaj i odobri izradu navedene doktorske disertacije.

- a) Kratka ocjena o naučnim i stručnim kvalifikacijama kandidata tj. o njegovim sposobnostima da pristupi izradi disertacije;
- b) Naučna ili praktična opravdanost predloženih istraživanja i rezultati koji se mogu očekivati;
- v) Mišljenje o predloženoj metodi istraživanja;
- g) Ukoliko komisija smatra da kandidat ne posjeduje odgovarajuće naučne i stručne kvalifikacije, da neke pretpostavke kandidata u vezi prijavljene disertacije nisu tačne ili je predložen metod rada neadekvatan, isti treba detaljno obrazložiti.
- d) Prijedlog sa obrazloženom ocjenom o podobnosti teme i kandidata (Obavezno napisati ocjenu da li su tema i kandidat podobni ili ne)

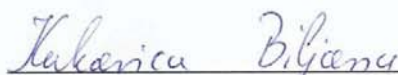
U Banjoj Luci 13.6. 2014.

POTPIS ČLANOVA KOMISIJE

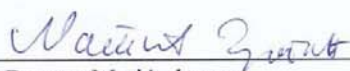
1.


dr Jelena Vukojević, redovni profesor
naučna oblast Algologija i mikologija,
mentor- predsjednik

2.


dr Biljana Kukavica, vanredni profesor
naučna oblast Biohemija, molekularna
biologija, mentor-član

3.


dr Dragan Matić, docent
Informacione nauke i bioinformatika (razvoj
softvera), član