

Универзитет у Београду – Хемијски факултет

Наставно-научно веће

ПРЕДМЕТ: Извештај Комисије за оцену докторске дисертације **Немање Д. Мијина**, мастер биохемичара

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета одржаној 12. децембра 2024. године изабрани смо за Комисију за оцену докторске дисертације Немање Д. Мијина, мастер биохемичара, под насловом:

„Утицај јона Pb(II), Cd(II) и Pd(II) на конформационе прелазе овалбумина”

Након прегледања поднете дисертације, подносимо следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација кандидата Немање Д. Мијина написана је на српском језику, на 108 страна А4 формата (фонт Times New Roman величине 12 pt, са проредом 1,0, маргинама 2 cm) и садржи 34 слике, 5 табела, и 259 литературних навода. Дисертација се састоји из девет поглавља: *Увод* (2 стране), *Теоријски део* (28 страна), *Циљеви* (3 стране), *Материјали и методе* (10 страна), *Резултати* (32 стране), *Дискусија* (10 страна), *Закључци* (3 стране), *Литература* (17 страна), *Прилози* (3 стране). Поред тога, дисертација садржи: *Захвалницу* на српском језику, *Сажетке* на српском и енглеском језику, *Садржај*, *Биографију кандидата* на српском језику, *Списак објављених радова и саопштења*, *Изјаву о ауторству*, *Изјаву о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада* и *Изјаву о коришћењу*. Дисертација је по овој структури и садржају у потпуности у складу са стандардима прописаним од стране Универзитета у Београду.

Увод дисертације описује генерални значај разумевања конформационих прелаза протеина и формирања протеинских агрегата. Описани значај се просеже кроз већи број примењених области, укључујући прехранбену индустрију и медицину. Поред значаја, увод истоветно описује предмет и циљ саме дисертације. Конкретно, описан је утицај протеинлиганд интеракција на конформационе прелазе протеина, при којима јони тешких метала изазивају

промене у протеинским структурама, као и примену овалбумина као модел система за одређивање степена неспецифичних протеин-лиганд интеракција.

Теоријски део обухвата већи број целина. У првој целини су описани нивои структуре полипептида, од примарне до кватернарне структуре. Истакнут је значај разумевања датих нивоа структуре ради бољег разумевања самих конформационих прелаза протеина. Следећа целина описује значај различитих термодинамичких и физичких фактора који утичу на конформационе прелазе протеина, укључујући и теорије које описују ефекте и резултате различитих фактора на дестабилизацију нативне структуре протеина и формирање агрегата. Целина која следи додатно описује различите протеинске агрегате, њихове карактеристике и факторе који су неопходни за њихов настанак. Посебно су истакнути амилоидни фибрили, који представљају изузетно термодинамички стабилне протеинске агрегате са високим степеном уређености. Дата целина описује нивое организације амилоидних структура, као и механизам њиховог формирања. Поред структурних описа амилоидних фибрила, истакнут је и њихов значај у различитим обољењима, од неуродегенеративних болести до системских амилоидоза. Истоветно, дати су примери присуства амилоидних структура са различитим биолошким функцијама код извесних микроорганизама. У последњим целинама теоријског дела су описане методе које се могу применити у анализи протеинских структура и њихових конформационих прелаза, као и опис одабраног модел система за анализу протеин-лиганд интеракција.

У **Циљевима** дисертације су истакнуте главне тачке, односно кораци, који су били неопходни за додатно разумевање конформационих прелаза овалбумина. Као главни циљ је постављена анализа дејства јона тешких метала и органометалних комплекса на овалбумин као модел систем. Као додатан циљ, постављена је анализа физичко-хемијских карактеристика извесних органометалних комплекса паладијума, укључујући и праћене структурних промена у овалбумину након успостављања протеин-лиганд интеракција са датим комплексима.

У поглављу **Материјали и методе** је наведена целокупна методологија коришћена при изоловању протеина и припреми узорака овалбумина, укључујући детаљне описе техника које су примењене за структурне анализе протеина. У ову сврху су примењене методе попут инфрацрвене спектроскопије са Фуријеровим трансформацијама у моду пригушене тоталне рефлексије (ATR-FTIR) за праћење промена у оквиру секундарне структуре овалбумина након успостављања протеин-лиганд интеракција са јонима метала. Даље, описане су спектрофлуориметријске методе које су коришћене за одређивање природе формираних протеинских агрегата. Димензије и морфологија новонасталих агрегата су одређене применом методе динамичког расејавања светлости (DLS) и микроскопије атомских сила (AFM), а добијени резултати су коришћени за конструкцију тродимензионалног модела иницијалног везивања јона тешких метала. Истоветно су наведени програми који су коришћени за теоријску анализу везујућих места јона метала за овалбумин, уз кратак опис примењених програма за карактеризацију органометалних комплекса.

Резултати и Дискусија су одвојена поглавља у којима је кандидат описао све постигнуте резултате током израде дисертације. Првобитно су описани резултати пречишћавања и

процеса инкубирања овалбумина у присуству јона тешких метала и одабраних органометалних комплекса. Други део поглавља првобитно описује карактеризацију конформационих прелаза протеина који су изазвани везивањем јона тешких метала, олова и кадмијума. Приказани су резултати 8-анилино-1-нафтален сулфонских (ANS) и Тиофлавин Т (ThT) спектрофлуориметријских есеја, који показују иницијално дестабилишући ефекат изазван успостављањем протеин-лиганд интеракција са јонима тешких метала. Ови резултати су истоветно показали ток процеса хидрофобне агрегације овалбумина који је описан падом интензитета флуоресценције ANS пробе, док је истовремени скок у ThT флуоресценцији показао да присуство јона тешких метала фаворизује формирање амилоидних структура. На основу датих резултата, конструисан је модел преференцијалног везивања јона тешких метала за овалбумин, који је коришћен за додатну корелацију и опис добијених резултата. Настанак амилоидних структура је потврђен морфолошком анализом помоћу AFM технике у случајевима протеина који су инкубирани у присуству јона тешких метала. Остатак поглавља описује дејство интеракција органометалних комплекса на конформацију овалбумина. Изразит пад у интензитету ThT флуоресценције је указао на формирање аморфних агрегата протеина у случајевима протеина који су инкубирани у присуству органометалних комплекса кадмијума. Аморфна природа протеинских агрегата је такође потврђена ANS есејом у случају овалбумина након успостављања протеин-лиганд интеракција са органометалним комплексима паладијума. Физичко-хемијске карактеристике и фармаколошки профили органометалних комплекса су одређени *in-silico* и успостављена је веза између степена дестабилизације овалбумина приликом успостављања неспецифичних протеин-лиганд интеракција и високе липофилности испитиваних комплекса.

У поглављу **Закључак** сумирани су и прокоментарисани резултати добијени у оквиру целокупне докторске дисертације.

Литература обухвата радове из области истраживања и покрива све делове дисертације, са укупно 259 цитата.

У **Прилогу** су дати неки од експерименталних података који су добијени у оквиру истраживања описаних у поглављима **Резултати** и **Дискусија**.

Б. Кратак опис постигнутих резултата

У датој дисертацији су приказани резултати утицаја интеракција различитих јона тешких метала, олова и кадмијума, као и извесних органометалних комплекса кадмијума и паладијума, са овалбумином као модел системом. Овалбумин је одабран као модел систем за анализу неспецифичних протеин-лиганд интеракција услед његове високе заступљености и расположивости протеина. Истовремено, како је у литератури показано да овалбумин функционише као брзо-фибрилишући протеин без пријављених специфичних протеин-лиганд интеракција, то овај протеин представља адекватан модел који симулира испуњено ћелијско окружење.

Овалбумин је првобитно дестабилизован у присуству растућих концентрација јона тешких метала, олова и кадмијума. Након периода инкубације, добијене протеинске структуре су анализирани низом различитих метода. Степен везивања ThT пробе, који је сразмеран степену присутних амилоидних структура, је такође био директно сразмеран растућој концентрацији јона тешких метала. Док је плато постигнут у случајевима узорака овалбумина који су садржали само појединачне јоне олова и кадмијума, интензитет флуоресценције ове пробе је додатно порастао у узорку овалбумина који је садржао једнаке концентрације оба јона метала. Дати резултат указује на синергистички, позитиван ефекат јона тешких метала на формирање амилоидних структура, у односу на узорке са једнаким концентрацијама појединачних јона метала. Овај резултат је објашњен од стране кандидата теоријском анализом везивних места испитиваних јона тешких метала за протеинске структуре, укључујући конструкцију тродимензионалног модела преференцијалног иницијалног везивања јона олова и кадмијума за већи број молекула овалбумина. Дати модел додатно описује последице преференцијалног везивања олова и кадмијума и конкретан ефекат њиховог везивања на морфологију и природу формираних агрегата овалбумина. Ефекат везивања јона тешких метала на секундарне структуре је приказан у резултатима ATR-FTIR спектроскопије, где је конверзија секундарних структура нативне конформације овалбумина у агрегационе β -плочице директно сразмерна концентрацији присутних јона тешких метала. Последице иницијалне дестабилизације су додатно приказане у резултатима AFM анализе, где је преференцијално везивање јона олова изазвало настанак амилоидних структура са разгранатом морфологијом. С друге стране, снимци фибрила формираних у присуству јона кадмијума су били видљиво кратки и компактни, са знатно нижим степеном разгранатости. Хидрофобна природа описаних агрегационих процеса је такође потврђена резултатима ANS есеја, при којем је везивање флуоресцентне пробе било спречено самом хидрофобном агрегацијом протеинских фрагмената. Као резултат, пад у интензитету ANS флуоресценције је био директно сразмеран степену агрегације протеина, односно концентрацији присутних јона тешких метала. Димензије формираних, растворљивих агрегата су такође биле сразмерне растућој концентрацијом присутних јона метала, што се огледало у порасту хидродинамичког дијаметра који је праћен DLS методом.

Овалбумин је такође примењен у анализи протеин-лиганд интеракција органометалних комплекса кадмијума и паладијума. Како је за растворљивост испитиваних комплекса неопходно присуство органског растварача, диметилсулфоксида (DMSO), првобитно је анализиран утицај растућих концентрација датог растварача на конформације овалбумина. Добијени резултати ATR-FTIR анализе су показали да, при концентрацији од 1%, DMSO не утиче на транзицију секундарних структура овалбумина на собној температури. Међутим, концентрације DMSO изнад 1% су изазвале постепено агрегацију овалбумина која је била директно сразмерна растућој концентрацији органског растварача. Накнадно су процењене физичко-хемијске карактеристике испитиваних узорака органометалних комплекса паладијума, чији су фармаколошки профили одређени *in-silico*. Од датих узорака органометалних комплекса паладијума, узорак са најизраженијим степеном липофилности је истовремено имао дестабилишући ефекат на нативну структуру овалбумина. Добијени резултати ATR-FTIR и ANS метода су показали да еквимоларне концентрације овог комплекса нарушавају нативну форму овалбумина формирањем протеин-лиганд интеракција.

Услед овога, долази до формирања аморфних агрегата, што је додатно доказано у случају везивања органометалних комплекса кадмијума.

Добијени резултати недвосмислено доказују да протеин-лиганд интеракције јона олова и кадмијума индукују конверзију овалбумина у амилоидну форму, чији је степен директно сразмеран концентрацији присутних јона. Истовремено, резултати неспецифичних протеин-лиганд интеракција овалбумина са органометалним комплексима кадмијума и паладијума указују на потенцијалну примену овалбумина као модел система за анализу универзалних неспецифичних интеракција.

В. Компаративна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Резултати ове докторске дисертације пружају значајне информације о утицају јона тешких метала, олова и кадмијума, на протеинске структуре. Фаворизована конверзија протеинских структура из нативне форме у амилоидну, услед везивања јона тешких метала, је од изузетног значаја у медицини¹, као и у хемији хране².

Како је присуство депоа амилоидних фибрила у нервним ткивима корелисано са развојем неуродегенеративних обољења³, резултати кандидата додатно поткрепљују штетне ефекте који су потенцијално изазвани акумулацијом тешких метала у животној средини. У случају Паркинсонове болести, амилоидни фибрили су често депоновани у инклузионим телима, заједно са повишеним концентрацијама јона кадмијума⁴. Слична појава се може уочити у случају акумулације јона олова, чије везивање за Тау протеин је такође детектовано⁵. Амилоидни фибрили, услед своје изузетне термодинамичке стабилности, често индукују конверзију околних протеинских структура из нативне у амилоидну⁶. Ово представља основу за њихову цитотоксичност. Самим тим, иницијално формирање амилоидних структура у овим случајевима је поприлично непожељно и резултати приказани од стране кандидата показују директну везу између развоја амилоидних структура и присуства јона тешких метала. Протеинска агрегација је свакако честа појава приликом које долази до извесне конкуренције између формирања аморфних или амилоидних агрегата⁷. Како је најчешће фаворизовано формирање аморфних агрегата, конкретно одређивање фактора који фаворизују настанак амилоидних структура истовремено доприноси целокупном разумевању агрегационих процеса. Резултати добијени од стране кандидата су од фундаменталног значаја у разумевању датих конформационих прелаза протеина.

Поред анализе дејства слободних јона тешких метала на конформационе прелазе протеина, иницирање дестабилизације примењеног модел система овалбумина је од потенцијалног значаја у одређивању вијабилности терапеутика. Органометални комплекси паладијума се чешће користе као хемотерапеутици на бази метала, и њихов развој прати дуготрајну примену хемотерапеутика на бази платине⁸. Током развоја нових терапеутика, неопходно је разматрање извесног броја различитих карактеристика и параметара који су директно повезани са ефикасношћу потенцијалног терапеутика. Генерално, од одређених фармакокинетичких параметара, липофилност нових хемотерапеутика је један од главних

параметара који је често корелисан са антипролиферативном активношћу, услед директне везе са степеном апсорпције кроз ћелијске мембране⁹. Међутим, ова корелација није апсолутна услед потенцијалних неспецифичних протеин-лиганд интеракција. Током стандардне процене вијабилности нових терапеутика, анализа неспецифичних протеин-лиганд интеракција често није урачуната као додатан параметар.

Како за овалбумин нису пријављени специфични лиганди, а са друге стране, ћелијска средина је испуњено окружење, где већина протеина нису специфични циљни молекули за нове терапеутике¹⁰, резултати приказани од стране кандидата указују на то да се овалбумин може применити као модел систем за предвиђање датих интеракција и као додатан корак приликом предвиђања вијабилности нових терапеутика.

Литература

1. Notarachille, G., Arnesano, F., Calò, V. & Meleleo, D. Heavy metals toxicity: Effect of cadmium ions on amyloid beta protein 1-42. Possible implications for Alzheimer's disease. *BioMetals* **27**, 371–388 (2014).
<https://doi.org/10.1007/s10534-014-9719-6>
2. Li, T., Wang, D., Song, Y., Zhang, X. & Wang, L. Effect of heavy metal ions on rice protein fibrillation: Structure, morphology, and functionality. *Food Biosci.* **56**, 103368 (2023).
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103368>
3. Giacoppo, S. *et al.* Heavy metals and neurodegenerative diseases: an observational study. *Biol. Trace Elem. Res.* **161**, 151–160 (2014).
<https://doi.org/10.1007/s12011-014-0094-5>
4. Lorentzon, E. *et al.* Effects of the Toxic Metals Arsenite and Cadmium on α -Synuclein Aggregation In Vitro and in Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
<https://doi.org/10.3390/ijms222111455>
5. Kim, A. C., Lim, S. & Kim, Y. K. Metal Ion Effects on A β and Tau Aggregation. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 19 (2018).
<https://doi.org/10.3390/ijms19010128>
6. Merlini, G. & Bellotti, V. Molecular Mechanisms of Amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* **349**, 583–596 (2003).
<https://doi.org/10.1056/NEJMra023144>
7. Hirota, N., Edskes, H. & Hall, D. Unified theoretical description of the kinetics of protein aggregation. *Biophys. Rev.* **11**, 191–208 (2019).
<https://doi.org/10.1007/s12551-019-00506-5>

8. Cheff, D. M. & Hall, M. D. A Drug of Such Damned Nature.1 Challenges and Opportunities in Translational Platinum Drug Research. *J. Med. Chem.* **60**, 4517–4532 (2017).
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01351>
9. Mendoza-Ferri, M. G. *et al.* Transferring the Concept of Multinuclearity to Ruthenium Complexes for Improvement of Anticancer Activity. *J. Med. Chem.* **52**, 916–925 (2009).
<https://doi.org/10.1021/jm8013234>
10. Li, J., Zhang, S. & Wang, C. Effects of Macromolecular Crowding on the Refolding of Glucose- 6-phosphate Dehydrogenase and Protein Disulfide Isomerase *. *J. Biol. Chem.* **276**, 34396–34401 (2001).
<https://doi.org/10.1074/jbc.M103392200>

Г. Објављени и саопштени радови који чине део дисертације

Немања Мијин је до сада је објавио два рада, од тога један у часопису изузетних вредности (M21a) и један у међународном часопису (M23). Саопштио је и три рада на скуповима националног значаја (M64).

Радови објављени у међународним часописима изузетних вредности (M21a):

- **Mijin, N.**, Milošević, J., Stevanović, S., Petrović, P., Lolić, A., Urbic, T. and Polović, N. Amyloid-like aggregation influenced by lead (II) and cadmium (II) ions in hen egg white ovalbumin. *Food Hydrocoll.* 2023; 136, 108292.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108292>

Радови објављени у међународним часописима (M23):

- **Mijin, N.D.**, Milošević, J., Filipović, N.R., Mitić, D., Anđelković, K., Polović, N.Đ. and Todorović, T. The effect of non-specific binding of Pd (II) complexes with N-heteroaromatic hydrazone ligands on the protein structure. *J Serb Chem Soc.* 2022; 87 (10), 1143. <https://doi.org/10.2298/JSC220518050M>

Радови саопштени на скуповима националног значаја штампани у изводу (M64):

1. **Mijin N. D.**, Milošević J., Lolić A., Polović N., In vitro analiza amiloidogeneze pod uticajem teških metala primenom biofizičkih metoda/ An in vitro analysis of heavy metal-influenced amyloidogenesis using biophysical methods, 58. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Kratki izvodi radova Knjiga radova, str. 61, Beograd 9. i 10. jun 2022.
2. **Mijin N.**, Petrić J., Jovčić B., Lolić A., Polović N., Milošević J., Amyloid fibril formation of ovalbumin in the presence of heavy metal ions, lead and cadmium, Serbian Biochemical

Society Tenth Conference with international participation “Biochemical Insights into Molecular Mechanisms”, str. 95, 24. 9. 2021. Kragujevac, Serbia

3. Milošević J., **Mijin N.**, Maleš L. , Milovanović A., Jovčić B., Polović N., Kinetics of amyloid fibril formation in the presence of metal ions and low-molecular-weight compounds, Serbian Biochemical Society Ninth Conference with international participation “Diversity in Biochemistry” str. 133, 14-16. 11. 2019. Belgrade, Serbia

Д. Провера оригиналности докторске дисертације

Оригиналност докторске дисертације под називом „**Утицај јона Pb(II), Cd(II) и Pd(II) на конформационе прелазе овалбумина**”, аутора **Немање Мијина**, проверена је на начин прописан Правилником о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета у Београду, бр. 204/22.06.2018). Помоћу програма “iThenticate” утврђено је да количина подударарања текста износи 6%. Приказани степен подударности је последица цитата, афилијација, назива једињења и скраћеница, назива коришћених материјала и метода, општих података, као и навођења библиографских података о коришћеној литератури.

На основу свега изнетог, Комисија сматра да извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата **Немање Мијина**, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Е. Закључак

На основу свега изложеног може се закључити да је у поднетој дисертацији под насловом „**Утицај јона Pb(II), Cd(II) и Pd(II) на конформационе прелазе овалбумина**“ кандидат, мастер биохемичар **Немања Д. Мијин**, успешно одговорио на све постављене задатке који се односе на детаљну анализу структурних промена овалбумина као модел система које су изазване неспецифичним интеракцијама са јонима тешких метала и њихових органометалних комплекса. Комисија сматра да резултати објављени у оквиру ове докторске дисертације представљају значајан и оригиналан научни допринос у разумевању конформационих прелаза протеина, формирања амилоидних структура, и у потенцијалном развоју метода за процену вијабилности нових терапеутика.

Резултати истраживања проистекли из ове докторске дисертације објављени су у оквиру два научна рада, од којих је један у часописима изузетних вредности (M21a) и један у међународном часопису (M23). Саопштена су и три рада на скуповима националног значаја (M64).

На основу свега изложеног Комисија сматра да се ова дисертација уклапа у савремене трендове биохемије, те на основу свега изложеног предлаже Наставно–научном већу Универзитета у Београду – Хемијског факултета да прихвати поднету докторску дисертацију Немање Д. Мијина под називом „Утицај јона Pb(II), Cd(II) и Pd(II) на конформационе прелазе овалбумина“ и одобри њену одбрану.

У Београду, 25. 12. 2024.

Комисија:

Проф. др Милица Поповић, ванредни професор
Универзитет у Београду - Хемијски факултет

Проф. др Тамара Тодоровић, редовни професор
Универзитет у Београду - Хемијски факултет

др Сања Стевановић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду, Институт за хемију, технологију и
металургију - Институт од националног значаја за Републику Србију