

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ – ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ

НАСТАВНО-НАУЧНО ВЕЋЕ

Предмет: Пријава теме докторске дисертације Милене О. Златанове, мастер биохемичара, студента Хемијског факултета

Молим Научно-наставно веће Универзитета у Београду, Хемијског факултета, да одобри израду докторске дисертације из области биохемије на Универзитету у Београду, Хемијском факултету, под радним насловом:

„Модулација инфламације посредоване NF- κ B сигналним путем у ћелијама урођеног имунског система малим молекулима“.

За оцену научне заснованости приложене теме докторске дисертације предлажем Комисију у саставу:

1. Др Марија Гавровић-Јанкуловић, редовни професор, Универзитет у Београду, Хемијски факултет
2. Др Тања Ћирковић-Величковић, редовни професор, Универзитет у Београду, Хемијски факултет, дописни члан САНУ
3. Др Милица Поповић, ванредни професор, Универзитет у Београду, Хемијски факултет
4. Др Маријана Стојановић, научни саветник, Универзитет у Београду, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Институт од националног значаја за Републику Србију

У прилогу достављам:

1. Образложење теме
2. Биографију
3. Библиографију

4. Изјаву да предложена тема није пријављена на другој високошколској установи у земљи или иностранству

У Београду,

24.02.2021.

Подносилац молбе

Милена Златанова

Истраживач-приправник

Универзитет у Београду, Хемијски факултет

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ-ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Образложење теме докторске дисертације кандидаткиње **Милене Златанове**, мастер биохемичара, пријављене под насловом „**Модулација инфламације посредоване NF-κB сигналним путем у ћелијама урођеног имунског система малим молекулима**“.

1. Научна област: Хемијске науке

Ужа научна област: Биохемија

2. Предмет научног истраживања

Предмет истраживања ове докторске дисертације је модулација процеса инфламације малим молекулима на ћелијама урођеног имунског система. Као окидач инфламације користиће се стимулуси липополисахарид (LPS, компонента ћелијског зида бактерије *Escherichia coli*) и главни алерген кивија (*Actinidia deliciosa*), Act d 1 (актинидин). LPS је често коришћен модел про-инфламаторног стимулуса, док је Act d 1 главни алерген кивија који припада C1 фамилији цистеин протеаза и као такав представља модел инфламаторног стимулуса у процесу сензитизације код алергија на храну.

Коришћењем про-инфламаторних стимулуса развиће се ћелијски модел систем базиран на макрофагима диференцираним из TLR-1 моноцита (ћелијска линија хумане акутне моноцитне леукемије), за детекцију и праћење инфламаторног одговора ћелија на мање потентне инфламаторне стимулусе, као што су алергени хране. Како су макрофаги ћелије урођене имуности, одговор на стимулус ће се пратити преко нивоа транскрипције (узводна регулација) про-инфламаторних цитокина од значаја за стање инфламације, и повећањем експресије површинских ћелијских рецептора који заједно омогућавају одређивање фенотипског профила макрофага и њихов допринос у инфламаторном процесу. Како би се окарактерисао и одговор ћелија које први долазе у контакт са молекулима из спољашње средине, као што су алергени хране, пратиће се и одговор епителних ћелија HEK293

(ћелијска линија хуманих ембрионалних ћелија бубрега) након третмана истим стимулусима.

Након оптимизовања система са наведеним ћелијским линијама који има могућност да започне инфламаторну реакцију као одговор на стимулус LPS-ом и Act d 1, провераваће се ефекат одабраних малих молекула (фенолна једињења и масне киселине) у контроли инфламаторног процеса, и то низводном регулацијом експресије про-инфламаторних цитокина и инхибицијом NF-κB, главног сигналног пута који се активира у инфламаторним стањима. Посебан акценат ће бити стављен на праћење главне компоненте овог сигналног пута p65 и анализи ефекта малих молекула на њену фосфорилацију и транслокацију у нуклеус ћелија.

3. Основе хипотезе

Инфламација представља есенцијални механизам опстанка организма који може бити индукован од стране патогена, хемијског или механичког стреса. Овај у основи заштитни процес уклања основни узрок оштећења ћелија и омогућава ефикасну поправку оштећених ткива. Међутим, прекомерна производња про-инфламаторних цитокина, хемокина и реактивних кисеоничних врста, које већински секретују ћелије имунског система као што су макрофаги, могу да направе штету и допринесу патогенези разних инфламаторних стања [1,2]. Из тог разлога су управо контрола и регулација од кључног значаја у процесу инфламације.

Један од главних медијатора инфламаторног одговора и регулатора урођене и адаптивне имуности је нуклеарни фактор NF-κB. Пет структурно повезаних протеина представљају главне компоненте овог сигналног пута и посредују у експресији циљних гена везивањем за специфичан елемент у ДНК секвенци у нуклеусу ћелије [3,4]. p65 компонента се сматра значјном за контролу овог сигналног пута која се остварује њеном фосфорилацијом и транслокацијом у нуклеус [3].

Алергија на храну је пренаглашени одговор имунског система на протеине из хране који се означавају као алергени и могу активирати алерген-специфичне механизме и инфламацију када се нађу у контакту са професионалним антиген-приказујућим ћелијама, као што су макрофаги и дендритске ћелије, или епителним ћелијама интестиналне баријере [5].

Управо ове чињенице указују на потребу да се испитивање утицаја алергена као про-инфламаторних стимулуса не ограничи само на макрофаге или дендритске ћелије, већ да се посматра и њихов ефекат на саме епителне ћелије које такође имају изузетно значајну улогу у инфламацији и део су урођеног имунског система [6]. Анти-инфламаторни ефекти разних биолошки активних малих молекула, као што су фенолна једињења и масне киселине, су изучавани на моделу инфламације посредоване липополисахаридима, али се мали број студија бавио стимулусима као што су алергени и имуномодулаторним потенцијалом малих биолошки активних молекула у алергијској инфламацији [7]. Инхибитори NF-κB се у новијим истраживањима користе и као модулатори инфламације заједно са адјувансима, како би се спречила прекомерна активација урођене имуности и синтеза про-инфламаторних цитокина, а побољшао одговор адаптивног имунског система, презентација самих антигена и активација Т ћелија [8]. Њихова потенцијална примена постаје све значајнија с обзиром на све већи број различитих патолошких стања у чијој молекулској основи је прекомерна активација NF-κB сигналног пута [4]. Потрага за биоактивним малим молекулима који ће имати инхибиторни ефекат на активацију NF-κB у процесима инфламације је у току, и добијени резултати би могли променити приступ у терапији бројних инфламаторних процеса, и потенцијално се показати као добри терапеутски агенси.

4. Циљ истраживања и очекивани резултати

Научни циљеви су дефинисани кроз следеће фазе:

- Диференцијација моноцита у макрофаге и оптимизација услова третмана про-инфламаторним стимулусима (липололисахарид LPS, алерген хране Act d 1)
- Морфолошка и фенотипска карактеризација диференцираних макрофага
- Испитивање цитотоксичног ефекта малих молекула на епителне ћелије и макрофаге
- Ефекат малих молекула на ниво експресије про-инфламаторних цитокина у епителним ћелијама и макрофагима
- Испитивање инхибиције NF-κB сигналног пута посредоване малим молекулима

Очекивани резултати су развој стабилног ћелијског модела за испитивање мање потентних инфламаторних стимулуса на макрофагима, као и модулација про-инфламаторног ефекта малим молекулима инхибицијом NF-κB сигналног пута у епителним ћелијама и макрофагима.

5. Методе истраживања

За оптимизацију услова третмана, макрофаги ће бити диференцирани из THP-1 моноцита и третирани у различитим временским интервалима про-инфламаторним стимулусима оптимизованих концентрација након чега ће се анализирати експресија про-инфламаторних цитокина.

Диференцираност макрофага пратиће се експресијом специфичних рецептора исказаних на површини ових ћелија флуоресцентном проточном цитометријом и морфологија самих макрофага и њихових нуклеуса флуоресцентном микроскопијом.

За испитивање цитотоксичног ефекта малих молекула и оптимизација њихове концентрације потребне за третмане епителних ћелија и макрофага користиће се ССК-8 есеј где ће се спектрофотометријски пратити вијабилност ћелија.

Како би се окарактерисао ефекат малих молекула на процес инфламације, пратиће се експресија про-инфламаторних цитокина. За анализу нивоа генске експресије одговарајућих про-инфламаторних цитокина користиће се ланчана реакција полимеразе .

Испитаће се ефекат малих молекула на активацију NF-κB сигналног пута. За праћење степена активације NF-κB пута у епителним ћелијама користиће се метода трансфекције хуманих ћелија одговарајућим NF-κB-GFP плазмидима, након чега ће зелени флуоресцентни сигнал бити праћен флуоресцентном микроскопијом и флуоресцентном проточном цитометријом.

Као показатељ активације NF-κB сигналног пута у макрофагима, пратиће се транслокализација p65, главне компоненте овог сигналног пута у нуклеус ћелије помоћу ELISA есеја. Такође, детектоваће се укупни ниво ове компоненте у ћелијском лизату специфичним антителима помоћу Western blot методе.

6. Литература

1. Afonina, I.S.; Zhong, Z.; Karin, M.; Beyaert, R. Limiting Inflammation—the Negative Regulation of NF-KB and the NLRP3 Inflammasome. *Nature Immunology* **2017**, *18*, 861–869, doi:10.1038/ni.3772
2. Ghosh, S.; Hayden, M.S. New Regulators of NF-KB in Inflammation. *Nature Reviews Immunology* **2008**, *8*, 837–848, doi:10.1038/nri2423
3. Liu, T.; Zhang, L.; Joo, D.; Sun, S.C. NF-KB Signaling in Inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2017**, *2*, 1–9, doi:10.1038/sigtrans.2017.23
4. Taniguchi, K.; Karin, M. NF-B, Inflammation, Immunity and Cancer: Coming of Age. *Nat Rev Immunol* **2018**, *18*, 309–324. doi:10.1038/nri.2017.142
5. Ballegaard, A.-S.R.; Bøgh, K.L. Intestinal Protein Uptake and IgE-Mediated Food Allergy. *Food Research International* **2023**, *163*, 112150, doi:10.1016/J.FOODRES.2022.112150
6. Peterson, L.W.; Artis, D. Intestinal Epithelial Cells: Regulators of Barrier Function and Immune Homeostasis. *Nature Reviews Immunology* **2014**, *14*, 141–153, doi:10.1038/nri3608
7. Moser, B.A.; Escalante-Buendia, Y.; Steinhardt, R.C.; Rosenberger, M.G.; Cassaidy, B.J.; Naorem, N.; Chon, A.C.; Nguyen, M.H.; Tran, N.T.; Esser-Kahn, A.P. Small Molecule NF-KB Inhibitors as Immune Potentiators for Enhancement of Vaccine Adjuvants. *Front Immunol* **2020**, *11*, 2333, doi: 10.3389/fimmu.2020.511513
8. Moser, B.A.; Steinhardt, R.C.; Escalante-Buendia, Y.; Boltz, D.A.; Barker, K.M.; Cassaidy, B.J.; Rosenberger, M.G.; Yoo, S.; McGonnigal, B.G.; Esser-Kahn, A.P. Increased Vaccine Tolerability and Protection via NF-KB Modulation. *Sci Adv* **2020**, *6*, 8700–8709, doi: 10.1126/sciadv.aaz8700

Биографски подаци кандидата

Милена О. Златанова рођена је у Скопљу 29.03.1997. године. Завршила је средњу школу, Гимназију у Лесковцу 2015. године, као носилац дипломе „Вук Стефановић-Караџић“. Основне академске студије је уписала школске 2015/2016. године на Хемијском факултету Универзитета у Београду, смер Биохемија. 2019. године завршила је основне академске студије са просечном оценом 9,51 (девет и 51/100), завршни рад под насловом „Утицај Act d 1, главног алергена кивија, на генску експресију проинфламаторних цитокина и протеина чврстих веза у хуманим ембрионалним ћелијама бубрега ин витро“ је одбранила са оценом 10 (десет). Добитница је дипломе Ђорђе Стефановић коју додељује Хемијски факултет најбољем студенту у генерацији на студијском програму Биохемија. Мастер академске студије је уписала школске 2019/2020. године на Хемијском факултету Универзитета у Београду, на студијском програму Биохемија. Мастер академске студије је завршила 2020. године са просечном оценом 10 (десет), завршни мастер рад под насловом „Активација NF-κB сигналног пута у алергијском одговору на главни алерген кивија Act d 1“ одбранила је са оценом 10 (десет). Кандидат Милена О. Златанова је била носилац студентске стипендије Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије у периоду 2016-2019. године, и стипендије за изузетно надарене студенте Министарства просвете, науке и технолошког развоја у периоду 2019-2020. године.

Докторске академске студије је уписала 2020. године на Хемијском факултету Универзитета у Београду, на студијском програму Биохемија. До сада је положила шест од шест испита предвиђених планом и програмом докторских академских студија, сваки са оценом 10.

На Катедри за биохемију је запослена од 2021. године до данас као истраживач-приправник. Од 2018. године до сада је на Хемијском факултету била ангажована као сарадник у настави на курсевима: Имунологија (421B2), Молекулске основе патолошких стања (422B2), Биохемија протеина и нуклеинских киселина (401B2) и Биоинформатика (451B2).

Кандидаткиња Милена О. Златанова бави се научно-истраживачким радом у области имунологије, при Катедри за биохемију Хемијског факултета у Београду. У досадашњем

раду кандидаткиња је радила методе пречишћавања и карактеризације протеина, гајење хуманих ћелијских линија, трансфекцију хуманих ћелија и анализе експресије ћелијских рецептора и цитокина.

Резултате истраживања Милена О. Златанова је приказивала у оквиру усмених презентација на FEBS Напредном курсу „360 degrees Lysosome: from Structure to Genomics, from Function to Disease“ 2022. године у Турској и у оквиру постер секција на FEBS Радионици “Proteolysis: at the interface between health and disease“ 2022. године у Словенији, X Конференцији Биохемијског друштва Србије „Biochemical Insights into Molecular Mechanisms“ 2021. године у Крагујевцу и XI Конференцији Биохемијског друштва Србије „Amazing Biochemistry“ 2022. године у Новом Саду.

2022. године је добила FEBS YTF стипендију за учешће на FEBS Напредном курсу „360 degrees Lysosome: from Structure to Genomics, from Function to Disease “ који је одржан у Турској и ICGEB стипендију за учешће на FEBS/ICGEB Радионици “Proteolysis: at the interface between health and disease“ која је одржана у Словенији.

Члан је Биохемијског друштва Србије од 2018. године и млађи члан Европске академије за алергију и клиничку имунологију од 2021. године.

Објављени научни радови и саопштења

Кандидаткиња Милена Златанова је аутор два рада који су објављени у истакнутим међународним часописима (M21). Аутор је саопштења на више научних међународних скупова. Досадашње резултате истраживања кандидаткиња је публиковала у следећим научним радовима и саопштењима:

Радови објављени у истакнутом међународном часопису (M21)

Knežević, S., Ognjanović, M., Stanković, V., Zlatanova, M., Nešić, A., Gavrović-Jankulović, M., & Stanković, D. (2022). La (OH) 3 Multi-Walled Carbon Nanotube/Carbon Paste-Based Sensing Approach for the Detection of Uric Acid—A Product of Environmentally Stressed Cells. *Biosensors*, 12(9), 705. <https://doi.org/10.3390/bios12090705>

Nešić, A., Čavić, M., Popović, M., Zlatanova, M., Pieters, R., Smit, J., & Gavrović-Jankulović, M. (2019). The kiwifruit allergen act d 1 activates NF-κB signaling and affects mRNA expression of TJ proteins and innate pro-allergenic cytokines. *Biomolecules*, 9(12), 816. <https://doi.org/10.3390/biom9120816>

Радови саопштени на скуповима међународног значаја штампани у изводу (M34)

Zlatanova M.; Gavrović-Jankulović M.; Food allergen Act d 1 promotes inflammation and antigen uptake in macrophages in vitro, Book of Oral Presentations of the FEBS Advanced Course „360 degrees Lysosome: from Structure to Genomics, from Function to Disease“, p. 47-48, 4-9 October 2022, Kusadasi/Izmir, Turkey.

Zlatanova M.; Trbojević-Ivić J.; Gavrović-Jankulović M.; Attenuation of the NF-κB mediated proinflammatory effect of kiwifruit cysteine protease Act d 1, Book of Abstracts of the FEBS ICGEB Workshop “Proteolysis: at the interface between health and disease”, 17-21 September 2022, Bled, Slovenia.

Zlatanova M.; Trbojević-Ivić J.; Gavrović-Jankulović M.; Pro-inflammatory effect of kiwifruit allergen on THP-1 derived macrophages and its inhibition, Book of Abstracts of the XI Conference of the Serbian Biochemical Society: “Amazing Biochemistry”, p. 160, 22-23 September 2022, Novi Sad, Serbia.

Protić-Rosić I.; Lopandić Z.; Zlatanova M.; Nešić A.; Miljković R.; Lukić I.; Atanaković-Marković M.; Stojanović M.; Gavrović-Jankulović M.; Immunomodulatory potential of banana lectin in allergen-specific immunotherapy, Book of Abstracts of the 1st European Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food (1-EuSPMF), p. 17, 7-9 September 2022, Belgrade, Serbia.

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

Zlatanova M.; Nešić A.; Trbojević-Ivić J.; Gavrović-Jankulović M.; Small molecules attenuate activation of the NF-κB signalling in epithelial cells by Act d 1 kiwifruit allergen, Book of Abstracts of the X Conference of the Serbian Biochemical Society: , p. 186, 24 September 2021, Kragujevac, Serbia.

ИЗЈАВА

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

„Модулација инфламације посредоване NF-κB сигналним путем у ћелијама урођеног имунског система малим молекулима“

није пријављена на другом високошколским установама у земљи или иностранству.

У Београду,

24.02.2023.

Милена Златанова

Истраживач-приправник

Универзитет у Београду, Хемијски факултет