

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ – ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**

Универзитет у Београду
ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ
Бр. 771/3
29-11-2023 год.
БЕОГРАД

Предмет: Извештај о оцени научне заснованости и оправданости предложене теме за израду докторске дисертације **Немање Д. Мијина**, мастера биохемије.

На редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду – Хемијског факултета, одржаној 12. 10. 2023. године, изабрани смо за чланове Комисије за подношење извештаја о оцени научне заснованости и оправданости предложене теме за израду докторске дисертације кандидата **Немање Д. Мијина**, мастера биохемије, пријављене под насловом: „Утицај јона Pb(II), Cd(II) и Pd(II) на конформационе прелазе овалбумина”.

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

ИЗВЕШТАЈ

А. Биографски подаци о кандидату

Немања Д. Мијин је рођен 16. 4. 1995. године у Београду. Основну школу, Јанко Веселиновић у Београду, је похађао од 2002. до 2010. године, а средњу школу, Осму београдску гимназију, од 2010. до 2014. године. Основне академске студије је уписао школске 2014/15. године на Хемијском факултету Универзитета у Београду, студијски програм Биохемија. Основне академске студије је завршио 2019. године са просечном оценом 8,48 (осам и 48/100), одбранивши завршни рад под насловом „Утицај присуства јона метала на формирање амилоидних фибрила” са оценом 10 (десет). Мастер академске студије је уписао школске 2019/2020. године на Хемијском факултету Универзитета у Београду, на студијском програму Биохемија. Мастер академске студије је завршио 2020. године са просечном оценом 9,60 (девет и 60/100), одбранивши мастер рад под насловом „Утицај присуства амилоидних структура на хидролизу азоказеина” са оценом 10 (десет) и стекао звање мастер биохемичар.

Докторске академске студије је уписао 2020. године на Хемијском факултету Универзитета у Београду, на студијском програму Биохемија, и положио све испите (шест од шест) предвиђене планом и програмом докторских академских студија са просеком 10 (десет), са укупном просечном оценом на свим нивоима студија 8,70 (осам и 70/100).

У периоду од 2020. до. 2023. године, Немања Мијин је био ангажован као сарадник у настави, консултацијама, држању лабораторијских и теоријских вежби из предмета основних студија “Биохемија (409X2)” и “Биохемија протеина и нуклеинских киселина (401B1)”, као и предмета мастер студија “Биохемија и биофизика макромолекула (453B2)”.

Кандидат Немања Мијин бави се научно-истраживачким радом у области протеинске биохемије и анализе реалних узорака са фокусом на развој и анализу својстава амилоидних протеинских структура, при Катедри за биохемију Хемијског факултета у Београду.

Говори течно енглески језик, а служи се и немачким.

Б. Објављени научни радови и саопштења

Немања Мијин је до сада је објавио два рада, од тога један у часописима изузетних вредности (M21a) и један у међународном часопису (M23). Саопштио је и 3 рада на скуповима националног значаја (M64).

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):

- **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., Andelković, K., Polović, N.D. 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

В. Образложење теме

1. Научна област: Хемијске науке

Ужа научна област: Биохемија

2. Предмет рада

Предмет истраживања предложене докторске дисертације је утицај присуства слободних јона Pb(II) и Cd(II), као и органометалних комплекса Pd(II) и Cd(II) са бидендатним *N*-хетероароматичним хелаторима на конформационе прелазе овалбумина као модел система. Као протеин за који није пријављено да специфично везује лиганде, овалбумин је изабран као модел систем ради праћења неспецифичних интеракција са присутним јонима метала. Са аспекта проучавања неспецифичних утицаја органометалних комплекса на агрегирање протеина, овалбумин симулира испуњено ћелијско окружење.

Истраживање у оквиру ове тезе чиниће две целине.

Први корак би обухватао припрему узорак, тј. изоловање и пречишћавање модел система овалбумина. Пречишћени овалбумин ће потом бити инкубиран у присуству различитих концентрација јона метала Pb(II) и Cd(II), под различитим условима у погледу температуре и рН вредности раствора, какви погодују амилоидној фибрилацији протеина. Добијени агрегати ће бити структурно окарактерисани флуоресцентном спектроскопијом уз употребу 8-анилинонафтален-1-сулфонске киселине (енг. скраћеница ANS) и тиофлавина Т (енг. скраћеница ThT). Промене секундарних структура протеина ће бити праћене применом инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом (енг. скраћеница FTIR). Места везивања јона метала за протеин и распореда амилоидогених пептида ће бити теоријски моделовано употребом доступних биоинформатичких алата. Добијени резултати ће омогућити боље разумевање молекулског механизма агрегације протеина у присуству јона тешких метала.

Други део дисертације би обухватао испитивање утицаја органометалних комплекса Pd(II) и Cd(II) на конформационе прелазе овалбумина и његову потенцијалну аморфну или амилоидну агрегацију, са фокусом на разграничавање утицаја координованих органских лиганата. Конформационе промене протеина биће испитане спектроскопским методама, док ће се применом софтверских пакета одређивати липофилност, растворљивост и јонизабилност органометалних комплекса.

3. Научни циљ истраживања

Најбитнији циљеви предложене дисертације били би: испитивање утицаја јона метала и органометалних комплекса на моделу овалбумина, као и структурна анализа и моделовање добијених агрегата, која би омогућила разумевање молекулског механизма утицаја датих јона на аморфну или амилоидну агрегацију протеина.

- Одређивање преференцијалних места везивања јона за овалбумин и распореда амилоидогених пептида;
- Испитивање ефеката јона на нативну и/или агрегирану структуру протеина;
- Утврђивање аморфне или амилоидне природе протеинских агрегата;
- Испитивање морфологије протеинских агрегата;
- Дискриминација утицаја металног јона и утицаја лиганда код органометалних комплекса на конформационе прелазе и потенцијално агрегирање протеина;
- Одређивање физичко-хемијских карактеристика, липофилности, и хидрофобности органометалних комплекса;
- Унапређење метода за праћење неспецифичног утицаја потенцијалних терапеутика на ћелијске протеине.

4. Методе истраживања

У току израде предложене докторске дисертације предвиђено је коришћење следећих техника и метода:

а) стандардне методе протеинске биохемије за изоловање и карактеристање овалбумина;

г) спектрофлуориметрија ради анализе протеинских интеракција са ANS-ом и ThT-ом, што ће пружати увид у степен хидрофобних интеракција и нивоа формирања амилоидних фибрила, редом;

д) FTIR спектроскопија ради испитивања секундарних структура полипептида;

ђ) техника динамичког расејавања светлости (енг. скраћеница DLS) за одређивање величине протеинских агрегата, као и њиховог електрокинетичког потенцијала;

е) микроскопија атомских сила (енг. скраћеница AFM) за описивање морфологије агрегата овалбумина;

ж) примена софтверских пакета ради одређивања физичко-хемијских и фармакокинетичких карактеристика органометалних комплекса, као и моделовања места

везивања металних јона за протеин и распореда амилоидогених пептида у оквиру аминокиселинске секвенце.

5. Актуелност проблематике у свету

Како протеини имају тенденцију да често подлежу различитим конформационим променама, при чему долази до губитка њихове целокупне нативне структуре и функције, у интересу је разумети и потенцијално предвидети ефекат фактора који утичу на конформационе прелазе протеина. Степен ових конформационих промена зависи од разних поменутих фактора при којима је нативни протеин изложен, попут рН вредности, промена у температури, и присуства денатуришућих агенаса.¹

Једна последица ових конформационих прелаза је и протеинска агрегација, која је од значаја у медицини, али и у технологији. Природно се разликују аморфни и амилоидни протеински агрегати. Током конформационих прелаза протеина и формирања нових интра- и интермолекулских интеракција, није у потпуности јасан тип резултујуће протеинске агрегације. Публиковани резултати често указују и на присуству комбиноване протеинске агрегације, где је испољена извесна конкуренција између развоја аморфних или амилоидних агрегата.²

Нованастанале полипептидне структуре могу бити од потенцијалне практичне користи у различитим индустријама. На пример, у прехранбеним производима се формирање протеинских агрегата генерално сматра као позитивна појава услед њиховог утицаја на техно-функционална својства хране.³ Међутим, присуство већих концентрација одређених протеинских агрегата, попут изузетно стабилних амилоидних фибрила, је такође корелисано са развојем различитих неуродегенеративних обољења. Услед њихове изузетне термодинамичке стабилности, формирање и развој амилоидних фибрила је основа за пропагацију и цитотоксичност прионских болести, које је примећено у Алцхајмеровој⁴, Хантингтоновој⁵, и Паркинсоновој болести⁶, као и у многим системским амилоидозама.⁷ Ово присуство амилоидних агрегата доводи до конверзије околних полипептида у амилоидну форму, што представља један од многих фактора цитотоксичне активности амилоидне фибрилације. У већини поменутих обољења су у нервним ткивима пацијената пронађени амилоидни фибрили у виду плакова, заједно са повишеним концентрацијама јона метала попут кадмијума и олова.^{4,7} Услед овога се сматра да присуство ових јона позитивно утиче на амилоидну фибрилацију, те самим тим и на развој многих неуродегенеративних болести.

Међутим, цитотоксична активност која је изазвана интеракцијом јона метала или њихових комплекса са протеинима може бити и од користи у медицини. У скорије време, комплекси јона платине и палладијума су показали цитотоксично дејство и представљају нове, потенцијално ефикасне агенсе за лечење различитих варијанти канцера.^{8,9} Ипак, њихова цитотоксична активност често није у корелацији са антиципираним механизмима

њиховог деловања, те се поставља императив познавања интеракција, координације и реактивности одређених органометалних комплекса према модел протеинима, како циљним, тако и према осталим протеинима у ћелијском окружењу. Резултати праћења структурних промена биомакромолекула указују на то да чак и само присуство растварача у којима су растворени потенцијални терапеутици, као што је диметилсулфоксид, утиче на бројне конформационе промене ћелијских протеина¹⁰, док неспецифични утицај потенцијалних терапеутика на свеприсутне ћелијске протеине још увек није познат.

6. Очекивани резултати

У предложеној дисертацији очекиван је напредак у разумевању неспецифичних интеракција које се остварују између јона метала и модел система овалбумина у *in vitro* условима, што ће имати приметан ефекат на структурне особине овалбумина или његових агрегата. Очекивано је ефикасно утврђивање аморфне или амилоидне природе добијених протеинских агрегата, укључујући и одређивање морфологије истих.

Резултати испитивања секундарних структура и морфологије овалбуминских комплекса ће бити основа за моделовање и боље разумевање интеракција јона тешких метала са протеинима. Применом добијених резултата и њиховом обрадом софтверским пакетима, биће изведено конкретно одређивање преференцијалних места везивања јона метала за овалбумин. Самим тим, биће омогућено унапређење метода за праћење неспецифичних утицаја потенцијалних терапеутика на ћелијске протеине.

7. Литература

1. Janković, B.G. and Polović, N.Đ. The protein folding problem. Biol. Serbica 2017; 39(1), 105-111. <https://doi.org/10.5281/zenodo.827151>
2. Hirota, N., Edskes, H. and Hall, D. Unified theoretical description of the kinetics of protein aggregation. Biophys Rev. 2019; 11(2), 191-208. <https://doi.org/10.1007/s12551-019-00506-5>
3. Huyst, A.M., Van der Meeren, P., Housmans, J.A., Monge-Morera, M., Rousseau, F., Schymkowitz, J. and Delcour, J.A. Improved coalescence and creaming stability of structured oil-in-water emulsions and emulsion gels containing ovalbumin amyloid-like fibrils produced by heat and enzymatic treatments. Food Hydrocoll. 2023; 145, 109142. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109142>
4. Karran, E. and De Strooper, B. The amyloid hypothesis in Alzheimer disease: new insights from new therapeutics. Nat Rev Drug Discov. 2022; 21(4), 306-318. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00391-w>

5. McGowan, D.P., van Roon-Mom, W., Holloway, H., Bates, G.P., Mangiarini, L., Cooper, G.J.S., Faull, R.L.M. and Snell, R.G. Amyloid-like inclusions in Huntington's disease. *Neuroscience* 2000; 100(4), 677-680. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00391-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00391-2)
6. Petrou, M., Dwamena, B.A., Foerster, B.R., MacEachern, M.P., Bohnen, N.I., Müller, M.L., Albin, R.L. and Frey, K.A., 2015. Amyloid deposition in Parkinson's disease and cognitive impairment: a systematic review. *Mov Disord.* 2015; 30(7), 928-935. <https://doi.org/10.1002/mds.26191>
7. Wechalekar, A.D., Gillmore, J.D. and Hawkins, P.N. Systemic amyloidosis. *Lancet* 2016; 387(10038), 2641-2654. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01274-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01274-X)
8. Cheff, D.M. and Hall, M.D. A drug of such damned nature. 1 challenges and opportunities in translational platinum drug research: miniperspective. *J Med Chem.* 2017; 60(11), 4517-4532. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01351>
9. Alam, M.N. and Huq, F. Comprehensive review on tumour active palladium compounds and structure–activity relationships. *Coord Chem Rev.* 2016; 316, 36-67. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.02.001>
10. Tunçer, S., Gurbanov, R., Sheraj, I., Solel, E., Esenturk, O. and Banerjee, S. Low dose dimethyl sulfoxide driven gross molecular changes have the potential to interfere with various cellular processes. *Sci Rep.* 2018; 8(1), 14828. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33234-z>

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. 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 Немањи Мијин, мастеру биохемије, одобри израду докторске дисертације под насловом: „Утицај јона Pb(II), Cd(II) и Pd(II) на конформационе прелазе овалбумина”.

Комисија предлаже за ментора др Наталију Половић, редовног професора Универзитета у Београду – Хемијског факултета. Спискови радова предложених 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, 29.11.2023. године

Комисија:

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

др Тамара Тодоровић, редовни професор
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

др Милица Поповић, ванредни професор
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

др Сања Стевановић, виши научни сарадник
Институт за хемију, технологију и металургију

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. Marković S, Andrejević NS, Milošević J, **Polović ND**. Structural Transitions of Papain-like Cysteine Proteases: Implications for Sensor Development. *Biomimetics*. 2023; 8(3):281. <https://doi.org/10.3390/biomimetics8030281>
2. Milošević J, Prodanović R, **Polović N**. On the Protein Fibrillation Pathway: Oligomer Intermediates Detection Using ATR-FTIR Spectroscopy. *Molecules* 2021; 26(4), 970. <https://doi.org/10.3390/molecules26040970>
3. Milošević J, Vrhovac L, Đurković F, Janković B, Malkov S, Lah J, **Polović, ND**. Isolation, identification, and stability of Ficin 1c isoform from fig latex. *New J Chem*. 2020; 44 (36), 15716-15723. <https://doi.org/10.1039/D0NJ02938F>
4. Milošević J, Petrić J, Jovčić B, Janković B, **Polović N**. Exploring the potential of infrared spectroscopy in qualitative and quantitative monitoring of ovalbumin amyloid fibrillation. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2020; 229:117882. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117882>
5. Milošević J, Janković B, Prodanović R, **Polović N**. Comparative stability of ficin and papain in acidic conditions and the presence of ethanol. *Amino Acids* 2019; 51, 829–838. <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02724-3>

