

ВЕЋУ ЗА СТУДИЈЕ ПРИ УНИВЕРЗИТЕТУ У БЕОГРАДУ

Одлуком већа за студије при Универзитету бр. 06-4107/X-2123/2-20 JKJ/ донесеној на седници одржаној 13. јула 2020. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације **„Анализа механизма физиолошке регулације излазно-исправљачке брзоинактивирајуће струје на мембрани цитоплазматских капи гљиве *Phycomyces blackesleeanus*“**, кандидаткиње Катарине Стевановић (докторске студије Биофизика).

На основу документације поднете уз пријаву теме, Комисија подноси следећи:

РЕФЕРАТ

1. Биографија кандидата

Катарина Стевановић рођена је 4. јуна 1992. године у Београду, где је завршила основну и средњу школу. Године 2011. уписала је основне студије на Биолошком факултету Универзитета у Београду, модул Молекуларна биологија и физиологија, где је дипломирала 2015. године. Мастерирала је на Биолошком факултету 2016. године на модулу Биофизика, на теми „Промене унутарћелијске концентрације калцијума у одговору на хипоосмотски стимулус код цитоплазматских капи изолованих из гљиве *Phycomyces blackesleeanus*“. Исте године уписала је докторске студије при Универзитету у Београду, модул Биофизика.

2. Библиографија кандидата (категорисано према категоризацији надлежног Министарства)

2.1. Рад у међународном часопису (M21)

Maja Karaman, Kristina Atlagić, Aleksandra Novaković, Filip Šibul, Miroslav Živić, Katarina Stevanović and Boris Pejin, Fatty Acids Predominantly Affect Anti-Hydroxyl Radical Activity and FRAP Value: The Case Study of Two Edible Mushrooms, Antioxidants 2019, 8, 480; doi:10.3390/antiox8100480;

2.2. Саопштење са скупа међународног значаја штампано у изводу (M34)

Katarina Stevanovic, Strahinja Križak, Nataša Todorovic, Miroslav Živic, Osmotically activated anionic current in *Phycomyces blakesleeanus*, biophysically similar to VRAC, is not sensitive to classic VRAC blockers, 8thRegional Biophysics Conference, Zreče, Slovenia, May 16. to May 20. 2018;

Tanja Pajic, Katarina Stevanovic, Nataša Todorovic, Aleksandar Krmpot, Mihailo Rabasovic, Vladimir Lazovic, Dejan Pantelic, Brana Jelenkovic, Miroslav Živic, Successful Ti:Sapphire laser cell surgery of *Phycomyces blakesleeanus* cell wall, 8th Regional Biophysics Conference, Zreče, Slovenia, May 16. to May 20. 2018;

T. Pajic, K. Stevanovic, N. Todorovic, A. Krmpot, M. Rabasovic, V. Lazovic, D. Pantelic, B. Jelenkovic and M. Zivic, *Phycomyces blakesleeanus* hypha cell wall surgery by Ti:Sapphire laser. The Sixth International School and Conference on Photonics, PHOTONICA2017, Book of Abstracts, August 28 – September 1. 2017., Belgrade, Serbia;

2.3 Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M64)

Katarina Stevanović, Strahinja Križak, Nataša Todorović, Miroslav Živić, Ulazno ispravljena anjonska struja u membrani citoplazmatskih kapi iz gljive *Phycomyces blakesleeanus* (Inwardly rectifying anionic current in membrane of fungus *Phycomyces blakesleeanus* cytoplasmatic droplets) Second Conference of Serbian Biologists, Kladovo, Serbia, September 25 - September 30. 2018;

Katarina Stevanović, Bogdana Čepkenović, Strahinja Križak, Nataša Todorović, Miroslav Živić, ATP Dependency of ORIC, VRAC-like current from filamentous fungus *Phycomyces blakesleeanus*, Immunology at the Confluence of Multidisciplinary Approaches, December 6th-8th, 2019, Belgrade, Serbia;

3. Предмет и циљеви докторске дисертације

3.1. Предмет докторске дисертације

Филаментозне гљиве, свеprisутни организми у природи, имају незаобилазну улогу у свим аспектима људског друштва, од њихове примене у индустрији и фармацији, до опасности коју носе као патогени људи и организама од привредног значаја. Упркос томе, њихова физиологија је област која је још увек на прагу развоја.

Техника наметнуте волтаже на делићу мембране, као једина метода којом се може директно окарактерисати јонски канал и његова улога изводљива је на сферопластима квасца, док се испитивање канала филаментозних гљива своди на хетерологну експресију канала познате секвенце (7), уз изузетак слузавог мутанта *N. Crassa* и цитоплазматских капи *P. blakesleeanus* (2). Цитоплазматске капи, регенеративне структуре пореклом из спорангиофора, имају потенцијал да се диференцирају у хифу (13). Предност коришћења овог модела огледа се у одсуству изградње ћелијског зида првих сати по формирању цитоплазматских капи, што омогућава приступ микропипете мембрани, док је у конфигурацији „цела ћелија“ могуће испитати механизме физиолошке регулације који најприближније одговарају понашању у природним условима.

Базични механизми хипоосмотске регулације први пут су окарактерисани на моделу квасца (1), чији је геном редукован и филогенетски значајно удаљенији од животиња у односу на ред *Mucorales*, којем *P. blakesleeanus* припада (11). Док у

ћелијама квасца није забележена активност јонских канала за анјоне (5), у мембрани цитоплазматских капи окарактерисана је ИРИС (излазно-исправљачка брзоинактивирајућа струја). ИРИС дели многе биофизичке особине са запремински регулисаном анјонском струјом кичмењака (енг. „*Volume regulated anionic current*, скр. *VRAC*“): секвенца проводљивости и кинетика инактивације одговарају одређеним изоформама *VRAC*-а, активира се при хипоосмотском стимулусу као и у изоосмотским условима у присуству аналога гуанозин-трифосфата, а њена амплитуда се одржава у времену у присуству унутарћелијског аденозин-трифосфата, (6,15). Са друге стране, до сада утврђена осетљивост на блокаторе ИРИС донекле одступа од оне нађене код *VRAC* (14).

Регулација запремински регулисаног анјонског канала је област која се интензивно проучава већ 30 година. Једна од водећих хипотеза је да сам канал, или друга компонента са којом је *VRAC* у комплексу, представља механосензор промена у мембрани, при чему гуанозин-трифосфат остварује дејство посредно, активирајући малу гуанозин-трифосфат-везивну киназу која покреће каскаду која доводи до реорганизације цитоскелета, док јонска јачина модулише осетљивост механосензора (8,8). Најновија истраживања микроскопијом заснованом на Форстеровом резонантном преносу енергије, истичу значај фосфорилације протеин-киназом Д у процесу активације канала, али не оспоравају неопходност интеракције канала са ћелијском мембраном (10). Аденозин-трифосфат је неопходан за одржавање активности канала, при чему има двојну улогу као супстрат за киназе и алостерички модулатор (4). Осетљивост канала на реактивне кисеоничне врсте зависи од састава субјединица и омогућава спрегу активности канала са свим факторима који утичу на оксидативни статус ћелије (12).

Пре скорашњег расветљавања молекуларне структуре *VRAC*-а (8), истраживања су се базирала на фармаколошкој анализи (3). Како структура канала *P. blackesleeianus* још увек није позната и изван је опсега нашег приступа изучавању, увиди у његове регулационе механизме ће се вршити електрофизиолошким испитивањем ефекта супстанци које делују на различите сигналне путеве.

3.2 Циљеви докторске дисертације

Циљ докторске дисертације је карактеризација механизма физиолошке регулације ИРИС, у одговору на хипоосмотске услове средине, са акцентом на:

- Механизам активације канала;
- Факторе који модулишу његов рад;
- Особине струје појединачних канала.

Идеја је пронаћи све факторе који утичу на ИРИС, а онда разлучити који су неопходни за саму активацију, а који додатно модулишу рад канала.

3.3 Хипотезе

Хипотезе које су испитане или су у плану даљег испитивања су:

1. ИРИС реагује на промене у организацији цитоскелета, па је могуће стимулисати је маханички у изоосмотским условима применом притиска;
2. Нехидролизабилни аналог гуанозин-трифосфата активира ИРИС посредством дејства на организацију цитоскелета;
3. Одржавање рада канала модулисано је фосфорилацијом;
4. Аденозин-трифосфат има улогу у одржавању активности канала као супстрат за киназе и алостерички модулатор самог канала и/или придружених протеина;
5. Екстрацелуларно додат аденозин-трифосфат има инхибиторно дејство на ИРИС, потенцијално због убрзавања инактивације на деполаризујућим потенцијалима;
6. У регулацију канала укључени су липидни секундарни гласници;
7. Реактивне кисеоничне врсте имају улогу у регулацији канала;
Двофотонска микроскопија, због смањења фототоксичности у односу на конвенционалне микроскопске технике, омогућава смањен удео артефакта услед фотоизбељивања флуоресцентног индикатора;
8. ИРИС је осетљива на промене јонске јачине;
9. Активност појединачних канала може се стимулисати хипоосмоларношћу у конфигурацији „споља-споља“ и блокирати екстраћелијским аденозин-трифосфатом.
10. Мембрана цитоплазматских капи функционално одговара ћелијској мембрани хифе.

4. План рада

Методологија истраживања у оквиру предложене докторске дисертације састојаће се од следећих корака:

1. Испитивање могућности активације ИРИС у изоосмотским условима при различитом нивоу наметнутог притиска по уласку у конфигурацију „цела ћелија“;
2. Испитивање ефекта стабилизатора актинске мреже на способност GTP-а да активира ИРИС;
3. Испитивање ефекта блокатора протеинских киназа на хипоосмотски и изоосмотски (GTP-ом) активираној ИРИС;
4. Испитивање ефекта примене нехидролизабилног аналога АТР-а изнутра на одржавање амплитуде струје;
5. Екстрацелуларно додавање АТР-а при хиперосмотској стимулацији; Одређивање промене временске константе инактивационе компоненте струје;
6. Испитивање ефекта блокатора липидних киназа на ИРИС;
7. Праћење нивоа реактивних кисеоничних врста двофотонском микроскопијом при хипоосмотској стимулацији;
По утврђивању ефикасности начина њихове инхибиције, тестирање ефекта сакупљача реактивних кисеоничних врста на активацију струје.
8. Испитивање ефекта промене јонске јачине на активацију ИРИС у изоосмотским и хипоосмотским условима;
9. Снимање струје појединачних канала у конфигурацији „споља-споља“; Испитивање ефекта екстрацелуларно додатог АТР-а на струју појединачних канала у конфигурацији „споља-споља“;
Снимање појединачних канала у конфигурацији „на ћелији“, при хипоосмотском стимулусу споља;
10. Испитивање ефекта блокатора плазмамембранске пумпе на потенцијал мембране цитоплазматских капи;

5. Методе које се користе у истраживању

Тежиште дисертације представљаће електрофизиолошка техника наметнуте волтаже на делићу мембране, у следећим режимима:

- конфигурација „цела ћелија“ методе наметнуте волтаже, за испитивање ефекта различитих инхибитора и активатора киназа, фосфатаза и других релевантних компоненти посматраних сигналних каскада;
- конфигурација „на ћелији“ и „споља-споља“ методе наметнуте волтаже, за снимање сигнала појединачних канала.

- конфигурацији „цела ћелија“ режима наметања струје, за утврђивање физиолошког идентитета мембране цитоплазматске капи и евентуалног учешћа ИРИС у одржавању мембранског потенцијала.

Метода двофотонске микроскопије уз коришћење флуоресцентних индикатора биће употребљена за испитивање учешћа реактивних кисеоничних врста у одговору на хипоосмотски стрес.

6. Мултидисциплинарност теме

Мултидисциплинарност теме огледа се у примени технике наметнуте волтаже и нелинеарне микроскопије за расветљавање физиолошких механизма код гљива.

Модел систем омогућава директно мерење електричних својстава делића и целе мембране, и олакшану примену флуоресцентних индикатора због одсуства ћелијског зида. Применом двофотонског побуђивања индикатора превазилази се проблем фототоксичности која се јавља при константном озрачивању целе ћелије краћим таласним дужинама и потенцијално може бити засебан узрочник настанка реактивних кисеоничних врста.

7. Очекивани научни доприноси

Дисертација ће допринети разјашњавању механизма одговора филаментозних гљива на хипоосмотски стрес. Због седентарног стила живота и расејавања спора на велике раздаљине, гљиве су на ћелијском нивоу развиле много моћније механизме отпорности на широк опсег спољашњих промена у односу на животиње, те је стицање прелиминарних увида у физиолошки одговор на стрес значајна основа за даља истраживања.

ИРИС ће бити прва јонска струја кончасте гљиве у потпуности окарактерисана у условима који најприближније одговарају природним условима.

Тестирањем на ИРИС присуства регулационих механизма који су већ показани за запремински регулисан анјонски канал, утврдиће се докле досеже њихова сличност. Као и у случају животиња, постоји вероватноћа да канал у основи ИРИС учествује и у другим, базичним ћелијским процесима, што би објаснило његову еволутивну очуваност.

8. Библиографски подаци релевантни за докторску дисертацију (максимално 1 страна)

1. Albertyn J.S., Hohmann S., Prior B.A. (1994) Characterization of the osmotic-stress response in *Saccharomyces cerevisiae*: osmotic stress and glucose repression regulate glycerol-3-phosphate dehydrogenase independently. *Curr Genet* 25, pp. 2-18
2. Zivić, M. *et al.* (2005) A new model system for investigation of ionic channels in filamentous fungi: evidence for existence of two K⁺-permeable ionic channels in *Phycomyces blakesleeanus*, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1048, pp. 491–5. doi: 10.1196/annals.1342.075.

3. Friard, J. *et al.* (2017) Comparative Effects of Chloride Channel Inhibitors on LRRC8/VRAC-Mediated Chloride Conductance, *Frontiers in pharmacology*, 8, p. 328. doi: 10.3389/fphar.2017.00328.;
4. Bryan-Sisneros, V. Sabanov, S.M. Thoroed, P. Doroshenko (2000), Dual role of ATP in supporting volume-regulated chloride channels in mouse fibroblasts, *Biochimica et Biophysica Acta* 1468, pp. 63 – 72;
5. Ke R, Ingram PJ, Haynes K (2013) An Integrative Model of Ion Regulation in Yeast. *PLoS Comput Biol* 9(1): e1002879. doi:10.1371/journal.pcbi.1002879;
6. Križak, S. *et al.* (2015) Osmotic swelling activates a novel anionic current with VRAC-like properties in a cytoplasmic droplet membrane from *Phycomyces blakesleeanus* sporangiophores, *Research in Microbiology*, 166(3), pp. 162–173. doi: 10.1016/j.resmic.2015.02.004.
7. Roberts, S. K. (2003) TOK homologue in *Neurospora crassa*: First cloning and functional characterization of an ion channel in a filamentous fungus, *Eukaryotic Cell*, 2(1), pp. 181–190. doi: 10.1128/EC.2.1.181-190.2003.
8. Strange, K., Yamada, T. and Denton, J. S. (2019) A 30-year journey from volume-regulated anion currents to molecular structure of the LRRC8 channel, *Journal of General Physiology*. Rockefeller University Press, pp. 100–117. doi: 10.1085/jgp.201812138.
9. Shumilina, E. V. *et al.* (2003) Non-hydrolyzable analog of GTP induces activity of Na⁺ channels via disassembly of cortical actin cytoskeleton, *FEBS Letters*. Elsevier, 547(1–3), pp. 27–31. doi: 10.1016/S0014-5793(03)00663-X.
10. König, B. *et al.* (2019) A FRET sensor of C-terminal movement reveals VRAC activation by plasma membrane DAG signaling rather than ionic strength, *eLife*, 8. doi: 10.7554/eLife.45421.
11. Spatafora, J. W. *et al.* (2017) ‘The Fungal Tree of Life: from Molecular Systematics to Genome-Scale Phylogenies.’, *Microbiology spectrum*, 5(5). doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0053-2016.
12. Gradogna, A. *et al.* (2017) ‘Subunit-dependent oxidative stress sensitivity of LRRC8 volume-regulated anion channels’, *Journal of Physiology*. Blackwell Publishing Ltd, 595(21), pp. 6719–6733. doi: 10.1113/JP274795.
13. Zaichkin, E. I., Orlova, S. A. and Fikhte, B. A. (1975) Dynamics of formation of the surface membrane in isolated microdroplets of *Phycomyces blakesleeanus* cytoplasm, *Doklady Akademii nauk SSSR*, 225(5), pp. 1187–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1212911> (Accessed: 26 August 2019).
14. Stanić, M. *et al.* (2017) Growth inhibition of fungus *Phycomyces blakesleeanus* by anion channel inhibitors anthracene-9-carboxylic and niflumic acid attained through decrease in cellular respiration and energy metabolites, *Microbiology (United Kingdom)*. Microbiology Society, 163(3), pp. 364–372. doi: 10.1099/mic.0.000429.
15. Akita, T. and Okada, Y. (2014) Characteristics and roles of the volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channel in the central nervous system., *Neuroscience*, 275, pp. 211–31. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.06.015.

9. Подаци о менторима

Име и презиме: др Мирослав Живић

Звање: ванредни професор, Биолошки факултет Универзитета у Београду (биофизика, системска биологија)

Списак радова објављених у научним часописима са Science Citation Index (SCI) листе који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Stanić M, Križak S, Jovanović M, Pajić T, Ćirić A, Žižić M, Zakrzewska J, Antić TC, Todorović N, Živić M. Growth inhibition of fungus *Phycomyces blakesleeanus* by anion channel inhibitors anthracene-9-carboxylic and niflumic acid attained through decrease in cellular respiration and energy metabolites. *Microbiology*. 2017 Mar;163(3):364-372.
2. Križak S, Nikolić L, Stanić M, Žižić M, Zakrzewska J, Živić M, Todorović N. Osmotic swelling activates a novel anionic current with VRAC-like properties in a cytoplasmic droplet membrane from *Phycomyces blakesleeanus* sporangioophores. *Res Microbiol*. 2015 Apr;166(3):162-73
3. Zivic M., Popovic M., Todorovic N., Vucinic Z. (2009): Outwardly rectifying anionic channel from plasma membrane of the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. – *Eucariotic cell*. 8(9):1439-48. doi: 10.1128/EC.00059-09
4. Žižić M, Živić M, Maksimović V, Stanić M, Križak S, Antić TC, Zakrzewska J. Vanadate influence on metabolism of sugar phosphates in fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *PLoS One*. 2014 Jul 18;9(7):e102849. doi: 10.1371/journal.pone.0102849. eCollection 2014.
5. Stanić M, Zakrzewska J, Hadžibrahimović M, Žižić M, Marković Z, Vučinić Z, Živić M. Oxygen regulation of alternative respiration in fungus *Phycomyces blakesleeanus*: connection with phosphate metabolism. *Res Microbiol*. 2013 Sep;164(7):770-8. doi: 10.1016/j.resmic.2013.03.002. Epub 2013 Mar 27.
6. Žižić M, Živić M, Spasojević I, Bogdanović Pristov J, Stanić M, Cvetić-Antić T, Zakrzewska J. The interactions of vanadium with *Phycomyces blakesleeanus* mycelium: enzymatic reduction, transport and metabolic effects. *Res Microbiol*. 2013 Jan;164(1):61-9. doi: 10.1016/j.resmic.2012.08.007. Epub 2012 Sep 5.

Име и презиме: др Наташа Тодоровић

Звање: Научни сарадник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ (област: неурофизиологија, биофизика)

Списак радова објављених у научним часописима са Science Citation Index (SCI) листе који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Stanić M, Križak S, Jovanović M, Pajić T, Ćirić A, Žižić M, Zakrzewska J, Antić TC, Todorović N, Živić M. Growth inhibition of fungus *Phycomyces blakesleeanus* by anion channel inhibitors anthracene-9-carboxylic and niflumic acid attained through decrease in cellular respiration and energy metabolites. *Microbiology*. 2017 Mar;163(3):364-372.
2. Križak S, Nikolić L, Stanić M, Žižić M, Zakrzewska J, Živić M, Todorović N. Osmotic swelling activates a novel anionic current with VRAC-like properties in a cytoplasmic droplet membrane from *Phycomyces blakesleeanus* sporangiophores. *Res Microbiol*. 2015 Apr;166(3):162-73
3. Bataveljić D, Nikolić L, Milosević M, Todorović N, Andjus PR. (2012): Changes in the astrocytic aquaporin-4 and inwardly rectifying potassium channel expression in the brain of the amyotrophic lateral sclerosis SOD1(G93A) rat model. - *Glia*. 60(12):1991-2003. doi: 10.1002/glia.22414
4. Zivic M., Popovic M., Todorovic N., Vucinic Z. (2009): Outwardly rectifying anionic channel from plasma membrane of the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. – *Eucariotic cell*. 8(9):1439-48. doi: 10.1128/EC.00059-09
5. Todorovic N, Coric T, Zhang P and Canessa C (2005): Effects of extracellular calcium on fASIC1 currents. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1048: 331-6., doi 10.1196/annals.1342.030
6. Coric T, Zhang P, Todorovic N, Canessa CM. (2003): The Extracellular Domain Determines the Kinetics of Desensitization in Acid-Sensitive Ion Channel 1. *J Biol Chem*. 278(46):45240-7 DOI: 10.1074/jbc.M304441200

10. Закључак и предлог

Комисија, на основу претходно изложеног, сматра да је тема докторске дисертације кандидаткиње Катарине Стевановић научно оправдана и актуелна. Циљеви докторске дисертације су јасно постављени а методологија адекватно одабрана.

Комисија предлаже Већу за студије при Универзитету у Београду да прихвати тему „Анализа механизма физиолошке регулације излазно-исправљачке брзоинактивирајуће струје на мембрани цитоплазматских капи гљиве *Phycomyces blakesleeanus*“ и кандидаткињи Катарини Стевановић одобри израду докторске дисертације под менторством др Мирослава Живића и др Наташе Тодоровић.

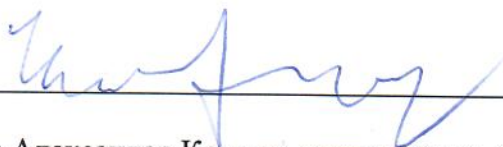
У Београду, 31. 07. 2020.



др Љиљана Николић, виши научни сарадник
Институт за Биолошка истраживања „Синиша Станковић“



др Милена Милошевић, доцент
Биолошки факултет Универзитета у Београду



др Александар Крмпот, виши научни сарадник
Институт за физику Београд