

Биолошки факултет
Број захтева: 15/217-1
Датум: 06.04.2012.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на предлог теме докторске дисертације

Молимо да, сходно члану 46. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду («Гласник Универзитета», број 131/06), дате сагласност на предлог теме докторске дисертације:

„Ефекат цисплатина на механосензорне јонске канале и Na^+/H^+ измењивач 1 (NHE1). Биохемијска карактеризација, унутарћелијска локализација и биолошка функција NHE7“.

НАУЧНА ОБЛАСТ: Биологија, Молекуларна и ћелијска биологија.

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име, име једног родитеља и презиме кандидата:

Нина Љ. Милосављевић

2. Назив и седиште факултета на коме је стекао високо образовање:

Биолошки факултет, Универзитет у Београду.

3. Година дипломирања: 2009.

4. Назив магистарске тезе кандидата: /

5. Назив факултета на коме је магистарска теза одбрањена: /

6. Година одбране магистарске тезе: /

7. Година и назив факултета на коме је кандидат уписао докторске студије:

2009 - Биолошки факултет, докторски програм/модул: Анимална и хумана физиологија.

Обавештамо Вас да је Наставно- научно веће Биолошког факултета Универзитета у Београду, на VI редовној седници одржаној 06.04.2012. год. размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић- Вукчевић

Прилог:

1. Предлог теме докторске дисертације са образложењем.

2. Акт надлежног тела факултета о подобности теме за израду докторске дисертације.

3. Подаци о ментору:



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 16
11000 БЕОГРАД
Република СРБИЈА
Тел: +381 11 2186 635
Факс: +381 11 2638 500
Е-пошта: dekanat@bio.bg.ac.rs

15/217-06.04.2012.

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 59. став 1. тачка 12. Статута Биолошког факултета Универзитета у Београду, Наставно-научно веће Факултета, на VI редовној седници одржаној 06.04.2012. године, донело је

О Д Л У К У

Прихвата се Извештај Комисије за оцену испуњености услова и научне заснованости теме докторске дисертације кандидата:

Нине Љ. Милосављевић, дипломираног молекуларног биолога и физиолога, студента докторских студија, студијског програма: Анимална и хумана физиологија, под насловом:

„Ефекат цисплатина на механосензорне јонске канале и Na^+/H^+ измењивач 1 (NHE1). Биохемијска карактеризација, унутарћелијска локализација и биолошка функција NHE7“.

За менторе се именују:

1. Др Јелена Ђорђевић, ванредни професор, Биолошког факултета Универзитета у Београду;
2. Др Laurent Counillon, професор Универзитет у Ници, Француска (Université de Nice – Sophia Antipolis).

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић- Вукчевић

Доставити:

- Универзитету у Београду,
- докторанту,
- ментору;
- Стручној служби Факултета.

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

А. Име и презиме ментора: **др Laurent Counillon,**

Звање: **професор Универзитет у Ници (Université de Nice – Sophia Antipolis)**

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1	C. Sardet, L. Counillon , A. Franchi and J. Pouyssegur. Growth factors induce phosphorylation of the Na ⁺ /H ⁺ antiporter, a glycoprotein of 110kD. Science vol 247, pp. 723-726, 1990
2	L. Counillon , A. Franchi and J. Pouyssegur. A point mutation of the Na ⁺ /H ⁺ exchanger gene (NHE-1) confers amiloride resistance upon chronic acidosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol 90, pp. 4508-4512, 1993
3	M. Poët, M. Tauc, E. Lingueglia, P. Cance, P. Poujeol, M. Lazdunski and L. Counillon . Exploration of the Pore structure of a peptide-gated Na ⁺ channel. EMBO Journal vol 20, pp. 5595-602, 2001
4	J. Lacroix, M. Poët, C. Maehrel and L. Counillon . A mechanism for the activation of the Na/H exchanger NHE1 by intracellular acidifications and mitogens. EMBO Reports. Vol 5 pp. 91-96, 2004
5	Milosavljevic N, Duranton C, Djerbi N, Puech PH, Gounon P, Lagadic-Gossmann D, Dimanche-Boitrel MT, Rauch C, Tauc M, Counillon L and Poët M. Nongenomic Effects of Cisplatin: Acute Inhibition of Mechanosensitive Transporters and Channels without Actin Remodeling. Cancer Res. vol 70 pp. 7514-22, 2010

Б. Име и презиме ментора: **др Јелена Ђорђевић**

Звање: **ванредни професор, Универзитет у Београду- Биолошки факултет**

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1	P. Vujovic, I. Lakic, D. Laketa, N. Jasnic, S. F. Djurasevic, G. Cvijic, J. Djordjevic . Time-Dependent Effects of Starvation on Serum, Pituitary and Hypothalamic Leptin Levels in Rats. Physiol. Res. 60 (1): S165-S170, 2011
2	A. Perovic, T. Vuckovic, G. Cvijic, J. Djordjevic , V. Davidovic. Involvement of Nitric Oxide in Noradrenaline-induced Changes In the Activity of Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Rat Brown Adipose Tissue and Heart. Physiological Research. 57: 95-100, 2008
3	Djordjevic Jelena , Vuckovic Tamara, Jasnic Nebojsa, Cvijic Gordana. Effect of various stressors on the blood ACTH and corticosterone concentration in normotensive Wistar and spontaneously hypertensive Wistar-Kyoto rats. General and comparative endocrinology. 153: 217-220, 2007
4	Djordjevic Jelena , Cvijic Gordana, Petrovic Natasa and Davidovic Vukosava. Effect of the acute crowding stress on the rat brown adipose metabolic function. Comparative Biochemistry and Physiology, part A; Vol 142, Issue 4 : 433-438, 2005
5	J. Djordjevic , G. Cvijic, T. Vuckovic, V. Davidovic. Effect of heat and cold exposure on the rat brain monoamine oxidase and antioxidative enzyme activities. Journal of Thermal Biology; Vol. 29, Issues 7-8: 861-864, 2004

Заокружити одговарајућу опцију (А, Б, В, или Г):

А) У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији техничко-технолошких, природно-математичких и медицинских наука ментор треба да има најмање три рада са SCI, SSCI, AHCI или SCIE листе, као и Math-Net.Ru листе.

Б) У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији друштвено-хуманистичких наука ментор треба да има најмање три рада са релеватне листе научних часописа (Релевантна листа научних часописа обухвата SCI, SSCI, AHCI и SCIE листе, као и ERIH листу, листу часописа које је Министарство за науку класификовало као M24 и додатну листу часописа, коју ће на предлог Универзитета донети Национални савет за високо образовање. Посебно се вреднују и монографије које Министарство науке класификује као M11, M12, M13, M14, M41, и M51.)

В) У случају израде докторске дисертације према ранијим прописима за кандидате који су стекли академски магистра наука ментор треба да има пет радова (референци) које га, по оцени Већа научних области, квалификују за ментора односне дисертације.

Г) У случају да у ужуј научној области нема квалификованих наставника, приложити одлуку Већа докторских студија о именовању редовног професора за ментора.

Декан Биолошког факултета

Датум: 06.04.2012.

Проф. др Јелена Кнежевић- Вукчевић

НАСТАВНО–НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На V редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду одржаној 09.03.2012. године, одређени смо у Комисију за оцену испуњености услова и научне заснованости предложене теме за израду докторске дисертације Нине Милосављевић, под насловом: “Ефекат цисплатина на Na^+/H^+ измењивач 1 (NHE1). Биохемијска карактеризација, унутарћелијска локализација и биолошка функција NHE7”.

На основу поднете документације и увида у досадашњи рад **Нине Милосављевић**, Комисија подноси Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду следећи:

ИЗВЕШТАЈ

А. Биографија:

Општи подаци:

Име, средње слово и презиме: Нина Ј. Милосављевић

Датум и место рођења: 18.07.1985. Београд, Србија

Образовање:

2009. Дипломирани молекуларни биолог и физиолог

2009. Докторске студије на Универзитету у Ници (Université de Nice – Sophia Antipolis) и Универзитету у Београду

Запослење:

2009. Докторант на Универзитету у Ници (PhD student at Université de Nice – Sophia Antipolis
Ion Transport Normal and Pathological Aspects UMR 6097 – TIANP –

Курсеви:

2006 Универзитет у Ници (Université de Nice – Sophia Antipolis)
Flow cytometry – проточна цитометрија

Пројекти:

Национални пројекти:

година	назив
--------	-------

Међународни пројекти:

година	назив
2009-2012	CNRS - Ion Transport Normal and Pathological Aspects Руководилац: Dr Laurent Counillon

Чланство у научним друштвима:

International Society for Proton Dynamics in Cancer (ISPDC)

Страни језици:

енглески језик виши ниво, руски и француски језик нижи ниво

Посебне активности и награде:

1. Стипендија за докторске студије, новембар 2009. – јун 2011. Erasmus Mundus EMECW BASILEUS пројекат размене између Универзитета у Београду и Универзитета у Ници, финансиран од стране Европске Уније.
2. Стипендија за годину дана додипломских студија у Америци, Georgia State University у Атланти, академска година 2007./08. - FORECAST exchange program, финансиран од стране USAID (United States Agency for International Development).
3. Студентске стипендије од Владе Србије за академску годину 2005.-2006, 2006.-2007. и 2008.-2009.
4. DAAD стипендија Немачке владе за летњу праксу на Универзитету у Готингену (Georg-August-Universitat Gottingen) на Институту за Хуману генетику јун - август 2009.

Б. Библиографија:**Радови и конгресна саопштења из уже научне области:**

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Milosavljevic N**, Duranton C, Djerbi N, Puech PH, Gounon P, Lagadic-Gossmann D, Dimanche-Boitrel MT, Rauch C, Tauc M, Counillon L, Poët M. Non-genomic effects of cisplatin: acute inhibition of mechanosensitive transporters and channels without actin remodelling. **Cancer Res**: 2010;70:7514-22
2. **Milosavljevic N**, Blanchard A, Wahl ML, Harguindey S, Poet M, Counillon L, Rauch C. Teaching new dogs old tricks: Membrane biophysical properties in drug delivery and resistance. **Recent Pat Anticancer Drug Discov** 2011;6:334-46
3. Lacroix, J, **Milosavljevic N**, Counillon L, and Poët M. The pH of intracellular compartments and disease. In Proton homeostasis cell death and cancer. D. Lagadic Editor. **Research Signpost**, In press

Б2. Радови у часописима домаћег значаја

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

4. Jhala S, **Milosavljevic N**, Lillvis JL, Sakurai A, and Katz PS, Preliminary Identification of Serotonin and FMRFamide-like immunopositive neurons in the Aplysia CNS - 23rd South East Nerve Net, 28-29. март 2008. у Атланти, САД
5. **Milosavljevic N**, Duranton C, Djerbi N, Puech PH, Gounon P, Lagadic-Gossmann D,

- Dimanche-Boitrel MT, Rauch C, Tauc M, Counillon L, Poët M. Non-genomic effects of cisplatin: acute inhibition of mechanosensitive transporters and channels without actin remodeling - 21st Ion Channel Meeting 12-15. септембар 2010. Гиенс полуострво, Француска
6. **Milosavljevic N**, Counillon L, and Poet M, The Na⁺/H⁺ exchanger NHE7, biochemical features, intracellular localization and biological function - 8th EBSA (European Biophysics Congress), 23-27. август 2011, Будимпешта, Мађарска
 7. **Milosavljevic N**, Monet M, Counillon L, and Poet M, The Na⁺/H⁺ exchanger NHE7, biochemical features, intracellular localization and biological function - 22nd Ion Channel Meeting, 25-28. септембар 2011. Гиенс полуострво, Француска

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

- 1.
- 2.

В. Тема докторске дисертације:

Наслов дисертације:

“Ефекат цисплатина на Na⁺/H⁺ измењивач 1 (NHE1). Биохемијска карактеризација, унутарћелијска локализација и биолошка функција NHE7”.

Полазне основе:

Na⁺/H⁺ измењивачи (NHEs, Na⁺/H⁺ exchangers; SLC9A, SoLute Carrier family 9A) представљају групу мембранских протеина присутних код готово свих живих организама. Код сисара, ови транспортери представљају главне катализаторе електронеутралне размене Na⁺ и H⁺ и круцијални су за велики број физиолошких процеса, као што су фина контрола унутарћелијског рН и ћелијског волумена, регулација ацидо-базне равнотеже, као и хомеостазе електролита. NHE такође утичу на ћелијске процесе као што су адхезија, миграција и пролиферација. До сада је изоловано десет NHE изоформи (NHE1/SLC9A1-NHE10/SLC9A10). Функционални гени кодирају протеине чије примарне секвенце деле различити ниво хомологије (од 25 до 70%). Амино крај чине 12 конзервираних трансмембранских домена, док је карбоксилни крај, који је оријентисан ка цитосолу, дивергентнији. Ови транспортери имају хетерогену ткивну специфичност и мембранску локализацију. NHE1 је изоформа експримирана на мембранама ћелија свих ткива, док су NHE6, 7, 8 и 9 изоформе експримиране у мембранама ћелијских органела. Функционалне студије појединих NHE изоформи показале су разлике у њиховим кинетичким параметрима и сензитивности на фармаколошке антагонисте. Такође, разликују се и у начину на који их регулишу хормони и механички стимулуси. Измењена активност NHE може бити узрок настанка патолошких стања и болести као што су хипертензија, дијабетес, ткивна оштећења услед исхемије, аутизам, неуролошки синдроми итд.

Цисплатин је хемотерапијски лек, који се успешно користи за лечење више врста малигних тумора, пре свега јајника, тестиса, бубрега, езофагуса, бронхија итд. Међутим,

због своје цитотоксичности често доводи до лакших или тежих пратећих појава, које у одређеном броју случајева захтевају прекид терапије. Цисплатин формира пурин-пурин адукте, који као такви активирају путеве за оштећење генома што коначно доводи до ћелијске смрти. Међутим, цисплатин делује и акутно, будући да се већ након пет до 15 минута по апликацији код пацијената често јавља спектар краткорочних споредних ефеката као што су звоњење у ушима, мучнина, повраћање, поремећај баланса воде и електролита, трњење око места инфузије, алодинија, хиперсензитивност на хладноћу, што се не може објаснити утицајем овог лека на геном. У литератури такође постоје подаци и о утицају цисплатина на цитоскелет (микротубуле и актин) као и фосфолипиде, што може бити укључено у поменуте краткорочне пратеће појаве.

NHE7 је органеларна изоформа Na^+/H^+ измењивача, клонирана пре десетак година. Како је до сада документовано, NHE7 је локализован у транс-Голџи мрежи (енгл. TGN - trans Golgi network) и раним ендозоима готово свих хуманих ћелија са различитим нивоом експресије. Мембранске органеле, укључујући Голџи апарат, ране и касне ендозоми, секреторне везикуле, лизозоме и синаптичке везикуле имају карактеристичан рН круцијалан за извршавање њихових функција. Лумен ових органела углавном је киселији од цитоплазме тако да се њихов рН мора прецизно одржавати због читавог низа ћелијских процеса, као што су пост-транслациона матурација протеина, сортирање новосинтетисаних протеина и липида, деградација, рециклирање и десензитизација рецептора, формирање синаптичких везикула са неуротрансмитерима итд. Познато је да NHE7 учествује у регулацији рН раних ендозома и TGN, међутим његова јонска селективност као и фармаколошки профил недовољно су изучавани.

Предмет докторске дисертације:

А. Утицај цисплатина на механосензорне јонске канале и транспортере

Први део докторске дисертације бавиће се изучавањем ефекта цисплатина на механосензорне јонске канале и транспортере, са посебним акцентом на NHE1. За њих се зна да су укључени у програме ћелијског преживљавања/смрти и експримирани су управо у механосензорним органима као што су унутрашње ухо или периферни нервни систем, на које делује цисплатин. Претходни резултати ове лабораторије показали су да цисплатин мења „флуидност“ мембране тако што активира сфингомијелиназу (енгл. ASM acid sphingomyelinase), која катализује одвајање церамида од сфингомијелина. Церамид је проапоптотски молекул и један од сигналних молекула за пролиферацију, диференцијацију итд. Међутим, не зна се какав ефекат цисплатин има на механосензорне мембранске протеине осетљиве на промене флуидности мембране. Стога је предмет ове дисертације изучавање ефекта овог хемотерапијског лека на механосензорни транспортер NHE1, као и механосензорни канал за Cl^- са излазном ректификацијом (енгл. VSORC - Volume-sensitive organic anion channel) и канал за K^+ са парном петљом поре (енгл. TREK-1 - two-pore domain potassium channel). Као контролни немеханосензорни канали били би коришћени канал за Cl^- (енгл. CFTR - Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), канал за K^+ са парном петљом поре (енгл. TASK1 - Potassium channel subfamily K member 3, acid-sensitive potassium channel), као и Na^+ - глукозни котранспортер. Механосензорни транспортери и канали изабрани су због

секундарних ефеката цисплатина, као што су зујање у ушима, хиперсензитивност на хладноћу, поремећај баланса бодe и електролита итд, симптоме везане за механорецепторе коже и унутрашњег уха. Уколико се установи да цисплатин има утицаја на предложене јонске транспортере и канале, студија ће се даље наставити изучавањем механизма директног утицаја на мембрану и/или пак посредног утицаја преко актина, како је предложено у литератури.

Б. NHE7 – биохемијска карактеризација, унутарћелијска локализација и биолошка функција

Обзиром на локализацију NHE7 изузетно је тешко изучавати његове биохемијске карактеристике са довољном прецизношћу а самим тим и утврдити његову биолошку функцију. Други део тезе бавиће се развијањем и коришћењем ћелијских генетичких техника које омогућују селекцију ћелија резистентних на H^+ убиства (H^+ killing) услед форсиране експресије NHE7 на плазма мембрани. Овако добијене ћелије користиће се за мерење јонске селективности и константе афинитета за сваки јон, брзине (V_{max}) и утврђивање механизма по ком NHE7 функционише. Такође, помоћу флуоресцентне микроскопије и проточне цитометрије, са рН-сензитивним маркерима развијаће се технике за праћење рН *in situ* у ендозоима. Тиме ће се *in situ* добити увид у карактеристике NHE7, а праћење његове активности омогућиће изучавање његове биолошке функције. Обзиром да је установљено да су мутације на NHE7 везане за менталне ретардације, неуромишићна обољења, неке случајеве шизофреније, аутизма, као и дијабетеса типа 1, изучавање фармаколошког профила и функције NHE7 може бити од велике користи при дизајнирању будућих терапија.

Научни циљ докторске дисертације:

А. Утицај цисплатина на механосензорне јонске канале и транспортере

Цисплатин је хемотерапијски лек, који узрокује ћелијску смрт формирањем ДНК адукта, али доводи до читавог спектра пратећих појава код пацијената, највише неуролошких, које се не могу објаснити његовим деловањем на геном. Обзиром да је показано да цисплатин може модификовати плазма мембране, активацијом киселе сфингомијелиназе која катализује раздвајање церамида од сфингомијелина при интеракцији са фосфолипидима, постављена је хипотеза да цисплатин може утицати и на механосензорне јонске транспортере и канале чија је активност директно условљена структуром и флуидношћу мембране. Механосензорни јонски транспортери и канали које предлагемо да изучавамо су механосензорни транспортер NHE1, као и механосензорни канали за Cl^- (VSORC) и K^+ (TREK-1), који су експримирани у ткивима и органима, на које цисплатин делује, и испољава поменуте пратеће ефекте. Верујемо да овом студијом можемо допринети бољем разумевању механизма настанка секундарних ефеката цисплатина.

Б. NHE7 – биохемијска карактеризација, унутарћелијска локализација и биолошка функција

До сада су регистроване мутације на NHE7 гену у случајевима неких неуролошких синдрома код људи (менталне ретардације, еуромишићна обољења, у неким случајевима шизофреније, аутизма итд). Обзиром да до сада није утврђена његова јонска селективност и фармаколошки профил тешко је спекулисати о његовој биолошкој функцији и уделу у поменутим патолошким стањима. Овај део докторске дисертације има за циљ утврђивање биохемијске карактеризације NHE7 као и изучавање његове биолошке функције, што ће омогућити сагледавање његове улоге и у патолошким стањима. Установљен фармаколошки профил овог измењивача може отворити нова врата за развој нових терапија у лечењу патолошких стања у која је укључен.

Материјал и методе:

А. Утицај цисплатина на механосензорне јонске канале и транспортере

Ћелијске линије које ће бити коришћене су: PS120 ћелијске линије фибробласта, који немају експримирану ниједну изоформу NHE, PS120 линије трансфектоване са дивљим типом NHE1 или мутираним R327E; тубулоците дисталних тубула нефрона и имортилизоване COS ћелије бубрега афричког зеленог мајмуна.

Мерење иницијалне брзине NHE1 применом јонских флуксева

Ефекат цисплатина на активност **NHE1** одређиваће се мерењем брзине преузимања литијума. Ћелије PS120 које експримирају NHE1 (или мутант NHE1 - R327E) биће инкубиране у дефинисаним кратким интервалима (1 минут) у медијуму са LiCl, након чега ће се мерити концентрације Li **атомском спектрометријом**. Десет минута пре почетка флукса ћелије ће бити инкубиране са различитим дозама цисплатина (5, 10, 30, 60 и 120 µg/ml). Добијени резултати биће обрађени коришћењем програма SigmaPlot 2001. Истим програмом ће се утврђивати константа инхибиције, доза-зависност, као и механизам инхибиције, уколико се покаже да цисплатин инхибира овај измењивач.

Ефекат цисплатина на кинетику Na^+ - глюкозног котранспортера

Ефекат цисплатина на кинетику Na^+ - глюкозног котранспортера биће одређивана мерењем брзине преузимања трицијумом обележене деоксиглукозе ([^3H]DOG) у PS120 ћелије, употребом сцинтилационог бројача.

Електрофизиолошка мерења

Методом наметнуте волтаже на делићу мембране у конфигурацији цела ћелија (**Patch**

clamp whole-cell recording), биће мерени мембрански потенцијал ћелије и струје кроз јонске канале. Као механосензорни јонски канали користиће се канал за Cl^- са излазном ректификацијом (VSORC) и канал за K^+ са парном петљом поре (TREK-1), а као немеханосензорни канал за Cl^- - CFTR и TASK1. Електрофизиолошка мерења вршиће се на каналима за Cl^- експримираним у тубулоцима, док ће K^+ струје канала TREK-1 и TASK-1 бити мерене на трансфектованим COS ћелијама.

Ефекат цисплатина на ћелијску мембрану и актин

Морфолошке промене ћелијске мембране пратиће се **скенирајућом електронском микроскопијом** (SEM) на PS120 ћелијама третираним различитим дозама цисплатина (30, 60, 120 $\mu\text{g/ml}$), као и контролним нетретираним ћелијама. Ремоделовање актина испитиваће се методом атомске микроскопије (енгл. AFM - **Atomic force microscopy**) на PS120 ћелијама третираним различитим дозама цисплатина, као и контролним ћелијама. Промене у Јанговом модулу ћелија указују на ремоделовање актина, а уколико нема промена у еластичности сматра се да нема промена ни на актину. Такође, користиће се и **LifeAct техника** за праћење ремоделовања актина. PS120 ћелије третиране цисплатином биће трансфектоване pEGFP-LifeAct плазмидом и пратиће се ремоделовање актина коришћењем флуоресцентног микроскопа.

Б. NHE7 – биохемијска карактеризација, унутарћелијска локализација и биолошка функција

Клонирање NHE7 и његова експресија у PS120 ћелијама

NHE7 најпре ће бити клониран у pGEM-T Easy вектор а затим у експресивни pIRESHyg3 вектор, уз коришћење стандардних техника клонирања (**PCR, RT-PCR**, увођење нових рестрикционих места PCR-ом, лигацијом). Провера успешности клонирања биће вршена методом секвенцирања. Затим, ће се извршити две трансфекције PS120 ћелија, које немају ниједну од изоформи NHE, са pIRESHyg3 вектором који има уграђен NHE7 ген, као и празан pIRESHyg3 вектор као контрола, после чега ће се користити антибиотска селекција хигромицином.

Соматско-генетичка селекција варијантних ћелија које експримирају NHE7 на ћелијској мембрани

Део PS120 ћелија са стабилно експримираним NHE7 биће подвргнуте UV зрачењу како би се повећала мутабилност, а затим ће се излагати дугорочним селекцијама уз H^+ убиства (H^+ killing) све док се не добију резистентни клонови који имају форсирану плазма-мембранску експресију NHE7. Потом ће бити неопходно извршити секвенцирање NHE7 гена и уколико се детектује wt секвенца гена пројекат ће бити настављен мерењем јонске селективности и фармаколошког профила транспортера.

Одређивање кинетике NHE7 применом јонских флуксева

Ћелије PS120 које експримирају NHE7 на ћелијској мембрани биће кратко инкубиране са LiCl, након чега ће се мерити концентрације Li **атомском спектрометријом**. Добијени резултати биће обрађени коришћењем програма SigmaPlot 12, којим ће се установити механизам кинетике NHE7 као и константе афинитета за Li^+ и H^+ . Исти принцип користиће се за добијање фармаколошког профила у односу на већ установљене инхибиторе NHE фамилије као што су амилорид, карипорид, EIPA и одређивање инхибиторних константи и механизма инхибиције. Такође, развијаће се технике за мерење транспорта других јона као што су Na^+ и K^+ .

Мерење pH *in situ* у ендозоима

Ендоцитоза посредовама рецепторима биће праћена ендоцитозом трансферина, обзиром да је показана колокализација трансферин-рецептора и NHE7. Користиће се трансферин куплован са pH-сензитивним маркером (Transferrin-Fluorescein) као и трансферин куплован са pH-несензитивним маркером (Transferrin-Tetramethylrhodamine). Ћелије са NHE7 и ћелије без NHE7 гена биће гајене на покровним плочицама прилагођеним микроскопији тако да ће се по инкубацији са трансферином, ендоцитоза пратити *in situ* помоћу **флуоресцентног микроскопа**. Биће потребно развити технику калибрације и тако установити тачне pH вредности у ендозоима оба типа ћелија. Такође, исти принцип ће се користити за мерење pH на основу квантификовања флуоресценције мерене **проточном цитометријом**.

Имунофлуоресценција са нативним анти-телом за NHE7 ће се користити за детектовање локализације NHE7 у ћелијама уз колокализацију са маркерима органела (Rab-5, Rab-11, TGN38).

Најважнији литературни подаци који подржавају тему (до 10 референци):

1. Fliegel L. The Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1. Int J Biochem Cell Biol. 2005;37:33-7.
2. Lacroix J, Poet M, Huc L, et al. Kinetic analysis of the regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE-1 by osmotic shocks. Biochemistry 2008;47:13674–85.
3. Lacroix J, Poet M, Maehrel C, Counillon L. A mechanism for the activation of the Na/H

exchanger NHE-1 by cytoplasmic acidification and mitogens. EMBO Rep 2004;5:91–6.

4. Taylor KD, Goel R, Shirazi FH, et al. Pressure tuning infrared spectroscopic study of cisplatin-induced structural changes in a phosphatidylserine model membrane. Br J Cancer 1995;72:1400–5.

5. Rebillard A, Tekpli X, Meurette O, et al. Cisplatin-induced apoptosis involves membrane fluidification via inhibition of NHE1 in human colon cancer cells. Cancer Res 2007;67:7865–74.

6. Numata M, and Orlowski J. Molecular Cloning and Characterization of a Novel (Na⁺,K⁺)/H⁺ Exchanger Localized to the *trans*-Golgi Network. J. Biol. Chem. 2001;276:17387–94.

7. Thiselton DL, McDowall J, Brandau O, Ramser J, d'Esposito F, Bhattacharya SS, Ross MT, Hardcastle AJ, Meindl A. An integrated, functionally annotated gene map of the DXS8026–ELK1 interval on human Xp11.3–Xp11.23: potential hotspot for neurogenetic disorders. Genomics. 2002;79:891.

8. Casey JR, Grinstein S, Orlowski J. Sensors and regulators of intracellular pH. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2010;11:50-61.

9. Jankowski A, Kim JH, Collins RF, Daneman R, Walton P, Grinstein S. In situ measurements of the pH of mammalian peroxisomes the fluorescent protein pHluorin. J Biol Chem. 2001;276:48748-53.

10. D'Souza S, Garcia-Cabado A, Yu F, Teter K, Lukacs G, Skorecki K, Moore HP, Orlowski J, Grinstein S. The epithelial sodium-hydrogen antiporter Na⁺/H⁺ exchanger 3 accumulates and is functional in recycling endosomes. J Biol Chem. 1998;273:2035-43.

Г. Закључак и предлог:

На основу увида у релевантну литературу, Комисија закључује да је изучавање ефеката цисплатина на механосензорне протеине мембране, посебно NHE1, актуелно и да би могло да допринесе објашњењу акутних споредних ефеката овог хемотерапијског лека. Комисија такође сматра изузетно значајним што ће се, по први пут пут, биохемијски окарактерисати и одредити фармаколошки профил NHE7, а што ће свакако утицати на измену терапије патолошких стања у која је укључен овај измењивач.

Полазећи од изложеног извештаја, Комисија констатује да је предложена тема докторске дисертације Нине Милосављевић под нешто измењеним насловом „**Ефекат цисплатина на механосензорне јонске канале и Na^+/H^+ измењивач 1 (NHE1). Биохемијска карактеризација, унутарћелијска локализација и биолошка функција NHE7**“ научно заснована, предложена методологија адекватна и да ће из ње произићи релевантни резултати значајни за област којој тематика припада, те предлаже Научно-наставном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да је прихвати и одобри кандидату њену израду.

Београд, 21.03.2012. године

Комисија:

др Јелена Ђорђевић, ванредни професор
(Универзитет у Београду, Биолошки
факултет)

др Мирослав Живић, доцент
(Универзитет у Београду, Биолошки
факултет)

др Наташа Тодоровић, научни сарадник
(Универзитет у Београду, Институт за
биолошка истраживања "Синиша
Станковић")