

РЕФЕРАТ

О ЗАВРШЕНОЈ ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ КАНДИДАТКИЊЕ КАТАРИНЕ С. СТЕВАНОВИЋ

Веће за студије при Универзитету у Београду, на седници одржаној 10. 7. 2023. године именовало нас је у комисију за преглед и оцену докторске дисертације под насловом „Доминантне струје ћелијске мембране хифа и мембране цитоплазматских капи пореклом из спорангиофора гљиве *Phycomyces blakesleeanus*. Карактеризација излазно-исправљачке инактивирајуће струје цитоплазматских капи“, кандидаткиње Катарине С. Стевановић (докторске студије при Универзитету, модул: биофизика). Након прегледа и анализе приложене докторске дисертације, подносимо Већу следећи извештај:

1. Основни подаци о кандидату и дисертацији

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. Мастер студије је успешно завршила 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 blakesleeanus*“. Исте године уписала је докторске студије при Универзитету у Београду, модул Биофизика.

Током израде дисертације, кандидаткиња се бавила претежно техником наметања волтаже на делићу мембране. Обучавала је неколико студената основних и Мастер студија и учествовала у настави у оквиру методских предмета Биолошког факултета. Похађала је неколико интернационалних курсева на тему микроскопије и електрофизиологије. Учествовала је у Еразмус+ размени студената у оквиру које је 3 месеца боравила у Центру за молекуларну медицину Каролинска Института у Стокхолму, где се бавила флуоресцентном корелационом спектроскопијом. Наставне обавезе у оквиру студијског модула завршила је са просечном оценом 10. Учествовала је на бројним конференцијама на којима је приказивала резултате свог рада, а из дисертације су до сада произашле две публикације у међународним часописима категорије M21.

Публиковани научни радови који су проистекли из докторске дисертације:

Stevanović KS, Čepkenović B, Križak S, Pajić T, Todorović NV, Živić MŽ. ATP modulation of osmotically activated anionic current in the membrane of *Phycomyces blakesleeanus* sporangiophore. Sci Rep. 2023 Jul 24; 13(1):11897.

doi: 10.1038/s41598-023-39021-9. PMID: 37488205; PMCID: PMC10366193.

(M21, ИФ 4.6)

Stevanović KS, Čepkenović B, Križak S, Živić MŽ, Todorović NV. Osmotically Activated Anion Current of *Phycomyces blakesleeanus*-Filamentous Fungi Counterpart to Vertebrate Volume Regulated Anion Current. J Fungi (Basel). 2023 May 31; 9(6):637.

doi: 10.3390/jof9060637. PMID: 37367573; PMCID: PMC10301571.

(M21, ИФ 4.7)

Публикована саопштења на међународним конференцијама произашла из дисертације (M34):

K. Stevanović, M. Živić, N. Todorović, Identification of Outwardly Rectified Inactivating Current of *P. blakesleeanus* in excised patches, EMBO&FEBS lecture course, Ion channels and transporters: From molecule to human. 5-11 May, Erice Italy/Virtual;

Stevanović K., Živić M., Todorović N., Inactivation properties of ORIC, VRAC-like current of filamentous fungus *P. blakesleeanus*: the role of ATP and the first glimpse of the single channel behavior, IUPAB Congress, 45th Annual Meeting of SBBf, 50th Annual Meeting of SBBq, October 4-6 2021, Virtual meeting;

K. Stevanović, T. Pajić, N. Todorović, A. Krmpot, M. Živić, M. Rabasović. Laser Microsurgery of Filamentous Fungi: The Latest Protocol Enabling Patch-Clamp Amenable Protoplasts. VIII International School and Conference on Photonics PHOTONICA 2021 & HEMMAGINERO workshop, 23 August – 27 August 2021, Belgrade, Serbia.

Stevanović K, Čepkenović B, Križak S, Todorović N, Živić M, 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;

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, 8th Regional Biophysics Conference, Zreče, Slovenia, May 16. to May 20. 2018;

Пуликована саопштења на домаћим конференцијама произашла из дисертације (М64):

Катарина Стевановић, Мирослав Живић, Наташа Тодоровић, Биофизички профил процеса инактивације излазно-ректификујуће инактивирајуће струје гљиве *Phycomyces blakesleeanus*. Трећи конгрес биолога Србије 21-25 септембар 2022., Златибор, Србија.

2. Предмет и циљ дисертације

Предмет дисертације је електрофизиолошка карактеризација мембранских јонских канала на два типа модела система кончасте гљиве из класе *Mucoromycetes*, *Phycomyces blakesleeanus*. Цитоплазматске капи *P. blakesleeanus* су регенеративне структуре које се спонтано формирају ослобађањем садржаја спорангионосних хифа сечењем и примењене су као модел систем за регистрацију јонских струја техником наметања волтаже на делићу мембране. Излазно-исправљачка (ректификујућа) брзоинактивирајућа анијонска струја (ИРИС, енг. *outwardly rectifying inactivating current*, *ORIC*) је доминантна струја цитоплазматских капи у хипоосмотским условима. Дели многе биофизичке карактеристике са запремински-регулисаном струјом кичмењака, међу којима је и модулација унутарћелијским АТП. Други тип модел система за регистрацију јонских струја је протопласт мембране хифа мицелијума. Применом прецизне, неинвазивне ћелијске микрохирургије фемтосекундним ласером у склопу нелинеарног микроскопског система, успостављен је протокол за добијање протопласта хифе мицелијума, уклањањем ћелијског зида. Тако је дисертација подељена на два основна циља, из којих произилази неколико потциљева:

Први основни циљ је биофизичка карактеризација излазно-исправљачке брзоинактивирајуће тренутне струје (ИРИС) у моделу цитоплазматских капи (ЦК). У оквиру овог циља је испитивање модулаторног ефекта цитоплазматског АТП на биофизичке особине ИРИС, првенствено на њену динамику инактивације. Задатак је био и испитати да ли мембрана цитоплазматских капи функционално одговара ћелијској мембрани спорангиофора и да ли ЦК продукују АТП. Затим, потциљ је проширивање фармаколошког профила ИРИС са акцентом на познате инхибиторе запремински-регулисаног канала кичмењака, међу којима је и екстрацелуларни АТП. На крају, циљ је била детекција и идентификација активности појединачних канала у основи ИРИС у истргнутој мембрани, у конфигурацији „споља споља“.

Други основни циљ је електрофизиолошка регистрација и типизација мембранских струја протопласта хифа, ослобођених ћелијском микрохирургијом. Први потциљ је описивање ефикасности регистрације јонских струја са мембране протопласта добијених ћелијском хирургијом и поређење са цитоплазматским капима; надаље је задатак био прелиминарни

преглед активности јонских струја у мембрани хифа мицелијума и поређење доминантних јонских струја са доминантним струјама мембране спорангиофора.

Основне хипотезе од којих се полазило у истраживању:

1. АТП има улогу у одлагању инактивације ИРИС као супстрат за киназе и/или алостерички модулатор самог канала и/или придружених протеина;
 - a. У присуству АТП-а инактивација на деполаришућим потенцијалима је реверзибилна и волтажно и временски зависна;
 - b. Уклањање АТП-а не утиче на активацију канала, већ стабилизује и промовише инактивирано стање/прелазак из инактивираног у затворено стање.
2. ИРИС је осетљива на агенсе који инхибирају запремински регулисан канал кичмењака:
 - a. флавоноиде
 - b. карбеноксолон;
 - c. венћелијски додат АТП .
3. Активност појединачних канала у основи ИРИС може се идентификовати у истргнутом делићу мембране у конфигурацији „споља-споља“ након осмотске стимулације целе цитоплазматске капи.
4. Мембрански потенцијал цитоплазматских капи одржава плазмамембранска протонска пумпа и ИРИС утиче на мембрански потенцијал у хипоосмотским условима.
5. Анјонске струје су доминантне у ћелијској мембрани хифа *P. blakesleeanus* добијеној ћелијском хирургијом.
 - a. Снимањем у истим условима примењеним након ћелијске хирургије (јонски састав, рН, температура, примењена сукција) могу се регистровати доминантне струје оба типа мембране – цитоплазматских капи пореклом из спорангиофора и протопласта хифа.
 - b. ИРИС се може регистровати и са мембране протопласта из хифе, добијених микрохирургијом ћелијског зида.

3. Кратак опис садржаја дисертације

Дисертација је структурирана кроз поглавља: Увод (стр. 1-16), Циљеви (17-18), Материјал и Методе (19-30), Резултати (31-63), Дискусија (64-70), Закључци (71-72) и Литература, (укупно 170 библиографских јединица).

Поглавље Увод састоји се из секција: 1.1 Јонски канали и ћелијске функције, 1.2 Физиологија кончастих гљива и улога ћелијске мембране, 1.3 Јонски канали кончастих

гљива и изазови њихове регистрације, 1.4 Цитоплазматске капи спорангиофора и протопласти хифа *P. blakesleeanus*, 1.5 Осмотски стрес и јонски канали, која се састоји из субсекција : 1.5.1 Запремински регулисан канал кичмењака, 1.5.2 Реакција гљива на осмотске промене и 1.5.3 ORIC – ИРИС, 1.6 Јонски канали и метаболизам, 1.7 Фармакологија осмотски активираних јонских канала.

У секцији Материјал и методе описани су протоколи за гајење модел система и добијање два типа мембрана за регистрацију јонских струја, експериментални протоколи и принцип анализе и статистичке обраде резултата.

У секцији Резултати јасно и концизно је изнето 16 целина, које су адекватно илустроване (укупно 34 слике). Најважнији резултати су сумирани приликом навођења закључака изведених из дисертације.

У поглављу Дискусија изнет је критички осврт на добијене резултате и направљена паралела са познатим подацима из литературе на тему електрфизиологије гљива и механизма активације осмотски регулисаних канала, као и модулаторне улоге АТП-а. Последње поглавље су Закључци изведени из дисертације :

- Цитоплазматске капи су метаболички активне структуре, чија мембрана којом су обухваћене одговара ћелијској мембрани спорангиофора.
- АТП модулише ИРИС следећим механизмима:
 - АТП остварује ефекат на брзину инактивације ИРИС, стабилишући отворено стање у односу на инактивирано.
 - Механизам деловања АТП-а не захтева његову хидролизу и вероватно не делује на део канала који одређује струјно-волтажну зависност. Резултати сугеришу могућност постојања АТП-везивног места на самом каналу.
 - АТП не игра улогу у активацији ИРИС, јер смањен ниво АТП-а у ЦК не доводи до пада амплитуде ИРИС, већ само до убрзавања инактивације,
 - Деполаризацијом-изазвана инактивација у присуству унутарћелијског АТП је реверзибилна, при чему је опоравак волтажно и временски зависан, а брзина опоравка расте са повећањем хиперполаризације током опоравка. Убрзавање инактивације прати пад амплитуде ИРИС.
- Сви познати блокатори запремински-регулисаног канала кичмењака који су испитани остварили су ефекат на ИРИС:
- Флавоноиди остварују инхибиторно дејство на канал у основи ИРИС. Утврђено је да се дејство остварује са цитоплазматске стране, највероватније антагонизујући стабилишући ефекат АТП-а. У случају постојања конкуренције за везивно место, флавоноиди имају значајно већи афинитет везивања од АТП.
- ИРИС је блокирана ванћелијским АТП. Динамика дозне зависности указује да не долази до кооперативног везивања молекула АТП.
- ИРИС је осетљива на карбеноксолон, што указује на потенцијално постојање домена који је у одређеном нивоу структурне организације сличан доменима

панексина или запремински регулисаног канала кичмењака, упркос одсуству хомологије примарне структуре.

- ИРИС је осмотски-осетљива струја која се може активирати и у одсуству осмотске разлике, још увек неразјашњеним механизмом.
- ИРИС проводи нитратне али не и фосфатне јоне. Проводљивост за нитрате се не разликује од проводљивости за хлор, док је инактивација на деполаришућим потенцијалима значајно убрзана.
- ИРИС је могуће регистровати у истргнутој мембрани у виду степенчастог обрасца инактивације (СОИ).
 - СОИ представља активност канала у основи ИРИС, на шта указује блок ванћелијским АТП-ом и опоравак од инактивације који је временски и волтажно-зависан.
 - Канали у основи ИРИС заступљени су у великом броју у мембрани ЦК, док је кондуктивност канала релативно мала и на потенцијалима од 50 – 90 mV износи око 14 pS. Струјно-напонски дијаграм амплитуда појединачних канала сугерише постојање исправљања на нивоу поре.
- Протопласти добијени микрохирургијом хифа мицелијума *P. blakesleanus* представљају модел систем погодан за регистрацију јонских струја нативне мембране хифе.
 - Тренутни ниво оптимизације добијања протопласта омогућава успешност регистрације јонских струја мању од успешности која се остварује на ЦК, чинећи цитоплазматске капи још увек најоптималнијим моделом за регистрацију јонских струја директно са ћелијске мембране гљиве.
 - Укупне струје снимљене са протопласта хифа добијених ћелијском хирургијом се разликују од доминантних струја са цитоплазматских капи добијених из спорангиофора.
 - Доминантна струја у условима снимања у протопластима хифа након ћелијске хирургије је улазно-исправљена инактивирајућа струја, која је ношена анјонима или калцијумом. Слична струја је присутна у мембрани ЦК у условима повећане концентрације калцијума.
 - Струје појединачних канала са протопласта добијених ћелијском хирургијом су доминантно анјонске. Међу њима је најчешће регистрована струја кроз хлор-селективан канал проводљивости око 20 pS, која је била присутна у свим регионима хифе изузев вршном.
- ИРИС је активна у мембрани ЦК сниманим у растворима коришћеним за регистрацију струја протопласта након микрохирургије, док при истим условима одсуствује у мембрани протопласта мицелијума. Закључено је да је у свим примењеним условима снимања ИРИС струја специфична за мембрану спорангиофора код *P. blakesleanus*.

4. Остварени резултати и научни допринос дисертације

Резултати ове дисертације дају значајан допринос фундаменталном разумевању физиологије кончастих гљива. Испитивање јонских канала у њиховој нативној мембрани је нужно како за откривање нових јонских канала, потенцијално специфичних за кончасте гљиве, тако и за испитивање регулације познатих канала у адекватном физиолошком окружењу.

Резултати дају механистички увид у понашање канала доминантне анјонске струје у мембрани спорангиофора *P. blakesleeanus*. У оквиру дисертације активност појединачних јонских канала у основи ИРИС је први пут регистрована и идентификована у истргнутој мембрани, и уједно је први пут изведена регистрација у конфигурацији „споља споља“ на цитоплазматским капима. Темељно је биофизички окарактерисан модулаторни ефекат цитоплазматског АТП на ИРИС и ближе је уопштљив њен фармаколошки профил. ИРИС је тренутно функционално најтемељније окарактерисана јонска струја нативне мембране неке кончасте гљиве.

Преглед јонских струја нативне мембране протопласта мицелијума добијених ћелијском хирургијом даје значајан основ за даљу локализовану карактеризацију канала специфичних за плазмемембрану хифа *P. blakesleeanus* и утврђивање сличности са другим окарактерисаним јонским струјама кончастих гљива.

P. blakesleeanus је представник класе Mucoromycetes, којој припадају бројни патогени људи и организама од привредног значаја, стога је увид у њихову физиологију од великог значаја за будуће студије усмерене на њихову контролу. Надаље, истраживање у којем је кандидаткиња учествовала отвара могућност за испитивање јонских канала и других група кончастих гљива, те представља темељ за даља истраживања.

5. Закључак

Докторска дисертација Катарине С. Стевановић представља оригиналан научно-истраживачки рад који значајно доприноси разумевању физиолошких процеса који се одвијају у кончастим гљивама. Окосницу ове студије чини карактеризација мембранских јонских струја у цитоплазматским капима и протопластима гљиве *Phycomyces blakesleeanus*, применом методе наметнуте волтаже на делићу мембране што је водило детаљном опису јонске струје ИРИС и ефекту АТП на њену биофизичку карактеризацију.

Резултати добијени експерименталним радом који су представљени у овој докторској дисертацији су оригинални, значајни, адекватно представљени, анализирани и протумачени.

На основу претходно наведеног, предлажемо Већу за студије при Универзитету да прихвати позитивну оцену докторске дисертације кандидаткиње Катарине Стевановић под насловом „Доминантне струје ћелијске мембране хифа и мембране цитоплазматских капи пореклом из спорангиофора гљиве *Phycomyces blakesleeanus*. Карактеризација излазно-исправљачке инактивирајуће струје цитоплазматских капи“ и одобри јавну одбрану.

У Београду, 5.8.2023.

Чланови комисије:

Др Александар Крмпот, научни саветник,
Институт за Физику, Универзитет у Београду

Др Љиљана Николић, виши научни сарадник,
Институт за Биолошка Истраживања „Синиша Станковић“,
Институт од националног значаја за Републику Србију,
Универзитет у Београду

Др Данијела Батавељић, виши научни сарадник,
Биолошки факултет Универзитета у Београду

Др Кристина Атлагић, научни сарадник, Биолошки
Факултет Универзитета у Београду

Већу за студије при Универзитету у Београду

ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду извршена је софтверска провера оригиналности докторске дисертације „Доминантне струје ћелијске мембране хифа и мембране цитоплазматских капи пореклом из спорангиофора гљиве *Phycomyces blakesleeanus*. Карактеризација излазно-исправљачке инактивирајуће струје цитоплазматских капи“, кандидаткиње Катарине С. Стевановић коришћењем програма iThenticate. Увидом у извештај утврђена је подударност од 3%. Подударање са једним извором износило је 1% и односи се претежно на дефинисање модел система и хемијских супстанци у студији на коју се ова дисертација надовезује. Подударање са осталим изворима износи мање од 1% и односи се на генералне фразе и навођење литературе. Када се изнето узме у обзир, извештај потврђује оригиналност докторске дисертације кандидаткиње Катарине С. Стевановић, под насловом „Доминантне струје ћелијске мембране хифа и мембране цитоплазматских капи пореклом из спорангиофора гљиве *Phycomyces blakesleeanus*. Карактеризација излазно-исправљачке инактивирајуће струје цитоплазматских капи“, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

У Београду, 28. 8. 2023.

Ментори:

Др Мирослав Живић, ванредни професор,
Универзитет у Београду, Биолошки факултет

Др Наташа Тодоровић, научни сарадник,
Универзитет у Београду, Институт
за биолошка истраживања „Синиша Станковић“