

## NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU HEMIJSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na redovnoj sednici Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj 11.09.2014. godine, određeni smo za članove Komisije za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije diplomiranog hemičara-biohemičara Gorana Miljuša, istraživača saradnika Instituta za primenu nuklearne energije-INEP u Zemunu, pod naslovom:

### **“Izolovanje, karakterizacija i uloga kompleksa transferina sa vezujućim proteinom 3 za faktore rasta slične insulinu”**

Pošto smo podnetu disertaciju pregledali, podnosimo Nastavno-naučnom veću sledeći

### IZVEŠTAJ

#### **A. Prikaz sadržaja disertacije**

Doktorska disertacija Gorana Miljuša, napisana je na 134 strane A4 formata (prored 1,5) i sadrži 32 slike i 9 tabela. Rad obuhvata sledeća poglavlja: Uvod (3 strane), Pregled literature (23 strane), Materijal i metode (20 strana), Cilj istraživanja (2 strane), Rezultati i diskusija (36 strana), Zaključci (3 strane) i Literatura (39 strana, 432 citata). Pored navedenog, disertacija sadrži Izvod na srpskom i engleskom jeziku (po 2 strane), Listu skraćenica, Sadržaj i Biografiju kandidata (1 strana).

U **Uvodu** je istaknut značaj ispitivanja kompleksa koji nastaju između vezujućeg proteina 3 za faktore rasta slične insulinu (IGFBP-3) i transferina (Tf), povezanost ovih kompleksa sa metabolizmom gvožđa, kao i značaj ispitivanja interakcije kompleksa sa transferinskim receptorom (TfR) u tkivu debelog creva, a u cilju razjašnjavanja uloge IGFBP-3/Tf kompleksa kod zdravih osoba, osoba sa povećanom potrebom za gvožđem, pacijenata sa nepravilnim metabolizmom gvožđa i pacijenata sa tumorom debelog creva kod kojih postoji neželjeno nakupljanje gvožđa u ćelijama.

**Pregled literature** obuhvata četiti predmetne celine. Prva celina sadrži opšte informacije vezane za sistem faktora rasta sličnih insulinu (IGF sistem), strukturne karakteristike njegovih činilaca: IGF liganda (IGF-I i IGF-II), receptora (IGF-1R i IGF-2R), vezujućih proteina (IGFBP-1 do IGFBP-6) i IGFBP proteaza, kao i njihovu fiziološku ulogu. Takođe, nabrojane su post-translacione modifikacije IGFBP i njihove interakcije sa drugim fiziološkim molekulima. U drugoj celini je detaljno opisan molekul IGFBP-3. Navedene su njegove strukturne karakteristike, post-translacione modifikacije i partneri sa kojima gradi komplekse pod fiziološkim uslovima. Opisane su njegove funkcije u organizmu, one koje su u okviru IGF sistema i one u kojima deluje nezavisno. Posebno su istaknuti domeni IGFBP-3 koji omogućavaju određenu interakciju i ispoljavanje specifične uloge. U trećoj celini je

opisan molekul Tf. Navedena su saznanja o njegovoj strukturi, ulozi u transportu jona gvožđa i interakciji sa TfR u cilju unutarćelijskog prenosa gvožđa. Opisan je mehanizam oslobađanja jona gvožđa u ćeliji i povratka molekula Tf na površinu ćelije. Četvrta celina se odnosi na povezanost metaboličkih puteva u kojima učestvuju IGFBP-3 i Tf. Ukratko su razmotrene nezavisne uloge IGFBP-3 i Tf u podsticanju rasta i anabolizma, kao i detalji o samom metabolizmu gvožđa kod zdravih osoba i osoba sa izmenama u njegovom metabolizmu. Sagledana su pitanja na koja se traže odgovori: (a) u kojim procesima bi kompleks IGFBP-3/Tf mogao učestvovati, (b) na koji način bi on mogao doprineti metabolizmu, a da to već ne čine IGFBP-3 i Tf pojedinačno, (c) da li je neka specifičnost u metabolizmu gvožđa razlog za ovo udruživanje, (d) ima li razlike u zastupljenosti i karakteristikama kompleksa u stanjima izmenjenog metabolizma gvožđa i (e) kolika je uloga TfR u vezivanju i internalizaciji u odnosu na druge vezujuće strukture za IGFBP-3 na površini ćelija.

**Materijali i metode** sadrže detaljan opis eksperimentalnih procedura i uzoraka korišćenih u okviru doktorske disertacije.

U poglavlju **Cilj istraživanja**, kandidat je definisao zadatke doktorske disertacije: (a) da se ispita prisustvo kompleksa IGFBP-3/Tf u cirkulaciji ljudi, (b) da se odredi koncentracija kompleksa i utvrdi na koji način ona zavisi od koncentracije polaznih komponenti, (c) da se ispita značaj prisustva (i vrste) metalnog jona za formiranje kompleksa, (d) da se analizira uticaj promene u metabolizmu gvožđa na stepen stvaranja kompleksa, (e) da se utvrdi reaktivnost kompleksa sa TfR na membrani ćelija debelog creva, zdravog tkiva i tumora (kao model sistemu), (f) da se analizira stepen kolokalizacije IGFBP-3 i Tf u i na ćelijama debelog creva, (g) da se ispituju strukturne karakteristike kompleksa IGFBP-3/Tf i njihove promene sa (pato)fiziološkim promenama u metabolizmu gvožđa, odnosno pojavom tumora i (h) da se, na kraju, predloži moguća uloga ovih kompleksa u organizmu.

U delu **Rezultati i diskusija**, kandidat je prikazao i komentarisao dobijene rezultate u šest celina. Prva celina ovog poglavlja se odnosi na optimizaciju postupka za izolovanje kompleksa IGFBP-3/Tf iz seruma zdravih odraslih ljudi. Pre samog izolovanja, analizirana je specifičnost i osetljivost anti-IGFBP-3 i anti-Tf antitela koja su korišćena za identifikaciju IGFBP-3, odnosno Tf. Za izolovanje IGFBP-3/Tf kompleksa ispitani su veći broj fizičko-hemijskih metoda, pre svega afinitetne hromatografije: sa imobilizovanim metalnim jonima, lektinska i imunoafinitetna hromatografija. Ukratko je obrazložena specifičnost pomenutih metoda i, nakon hromatografskog razdvajanja i detekcije IGFBP-3 i Tf na imunoblotu, komentarisana je efikasnost svake metode. Na osnovu dobijenih rezultata, zaključeno je da samo imunoafinitetni pristup ima potencijal da dobro razdvoji komplekse od ostalih proteina, te su dodatno testirane još dve srodne tehnike: imunoelektroforeza i imunoprecipitacija. Za svaki postupak prikazani su blotovi (elektroforetski ili dot, imuno ili lektinski), kojim su dokumentovani rezultati. Pokazano je da samo metoda imunoprecipitacije u dva koraka, uz nezavisnu upotrebu anti-IGFBP-3 i anti-Tf antitela, obezbeđuje razdvajanje kompleksa IGFBP-3/Tf, kako od monomernih podjedinica, tako i od drugih proteina. Druga celina se odnosi na ispitivanje strukturnih karakteristika kompleksa i značaja metalnog jona za njegovo

stvaranje. Ispitan je značaj prisustva nekoliko različitih metalnih jona, analiziran je ugljenohidratni sadržaj molekula, prisustvo karbonilnih grupa, kao i prisustvo naelektrisanih i hidrofobnih domena u izolovanim kompleksima IGFBP-3/Tf. Rezultati su prikazani u imunoblotovima i SELDI-TOF MS spektrima. U trećoj celini je opisan postupak određivanja koncentracije IGFBP-3/Tf kompleksa u serumu zdravih odraslih osoba. Kompleksi su izolovani dvostrukom imunoprecipitacijom, a zatim je koncentracija IGFBP-3 u njima merena u ELISA-IGFBP-3 testu. Četvrti deo se bavi ispitivanjem uticaja intenzivne fizičke aktivnosti, kada je povećana potreba za kiseonikom, hemoglobinom i gvožđem, na koncentraciju kompleksa IGFBP-3/Tf u serumu sportista. Peta celina se odnosi na ispitivanje fiziološke uloge kompleksa IGFBP-3/Tf, odnosno interakcije kompleksa sa TfR na ćelijskim membranama tkiva debelog creva. Da bi se ispitala ova interakcija, primenjena su dva pristupa: imunoprecipitacija sa imobilizovanim anti-TfR antitelom i dvostepeno imunohistohemijsko bojenje tkivnih isečaka koristeći primarna anti-IGFBP-3 i anti-TfR antitela i dva sekundarna antitela konjugovana sa različitim fluoroforima. Rezultati su prikazani u imunoblotovima i mikroskopskim snimcima. U poslednjoj, šestoj, celini su analizirane promene IGFBP-3/Tf kompleksa kod osoba sa poremećajem u metabolizmu gvožđa. Metodom dvostruke imunoprecipitacije, imunoblota i ELISA-IGFBP-3 testa, ispitane su razlike u koncentraciji kompleksa u serumu, kao i drugih proteina važnih za metabolizam gvožđa (Tf, hemoglobin, feritin, IGFBP-3, ukupni proteini). Ujedno je urađena karakterizacija kompleksa izolovanih iz pacijenata, kao što je gore opisano za zdrave osobe. Rezultati su prikazani tabelarno. U nastavku rada je ispitano prisustvo i distribucija kompleksa IGFBP-3/Tf u tumorskom tkivu debelog creva i interakcija sa TfR na isti način kao kod netumorskog uzorka: imunoblotom, imunoprecipitacijom sa anti-TfR antitelom i imunohistohemijski.

U **Zaključku** je kandidat sumirao i prodiskutovao dobijene rezultate.

U poglavlju **Literatura** (432 citata) navedeni su radovi iz oblasti istraživanja koji iscrpno pokrivaju sve delove disertacije.

## **B. Kratak prikaz rezultata**

U ovoj doktorskoj disertaciji su ispitani proteinski kompleksi koje IGFBP-3 gradi sa transferinom, kao i moguća povezanost kompleksa sa metabolizmom gvožđa u određenim (pato)fiziološkim stanjima kod čoveka. Određena je koncentracija i ispitane su strukturne karakteristike kompleksa kod zdravih osoba i promene koje nastaju kod stanja izmenjenog metabolizma gvožđa: višak gvožđa, anemija, tumor debelog creva i profesionalno bavljenje sportom. Dalje je analizirana interakcija IGFBP-3/Tf kompleksa sa receptorom TfR u tkivu debelog creva, netumorskog i tumorskog, kao i ćelijska lokalizacija, u cilju razumevanja puta transporta kompleksa u ćeliju.

U prvom koraku je razrađen postupak izolovanja IGFBP-3/Tf iz seruma zdravih ljudi, nakon što je konstatovano da je stvaranje stabilnih kompleksa u cirkulaciji univerzalna pojava (u radu je analizirano više od 300 uzoraka seruma). Ovaj kompleks spada u proteine čija je koncentracija u serumu mala, te se standardni fizičko-hemijski postupci za izolovanje proteina

nisu pokazali uspešnim. Primenom nekoliko imunoafinitetnih metoda dalje je testirana mogućnost izolovanja i pokazalo se da dvostruka imunoprecipitacija, uz nezavisnu upotrebu anti-Tf i anti-IGFBP-3 antitela, obezbeđuje odvajanje kompleksa od drugih proteina iz seruma i samih monomernih podjedinica. Ujedno je testiran kvalitet antitela, pre svega sposobnost da detektuju IGFBP-3 i Tf u kompleksima. Od dva testirana anti-IGFBP-3 antitela, izvršen je izbor antitela koje je više odgovaralo za detekciju u imunoblotu i antitela koje se pokazalo boljim za imunoprecipitaciju.

Nakon izolovanja kompleksa IGFBP-3/Tf određena je njihova koncentracija i urađena je delimična strukturna karakterizacija. Fiziološka koncentracija IGFBP-3 naspram koncentracije Tf je hiljadu puta manja (radi lakšeg poređenja uzete su koncentracije mM naspram M). Izračunato je da je relativni odnos koncentracija IGFBP-3 i Tf u cirkulaciji  $2,3 \pm 0,56$  mM/M, što je značilo da koncentraciju kompleksa treba određivati preko koncentracije IGFBP-3 u njemu. Shodno tome, primenom ELISA-IGFBP-3 testa je određena koncentracija kompleksa (nakon imunoprecipitacije) i ona je iznosila  $241 \pm 62$  µg/L, odnosno  $5,4 \pm 1,02$  nM, što čini 5-7 % ukupnog IGFBP-3 u cirkulaciji zdravih ljudi. Ovaj udeo nije zanemarljiv kad se govori o fiziološkim uslovima, što opravdava njegovo dalje istraživanje.

Da bi se stekao uvid u značaj metalnog jona, kako za samu interakciju IGFBP-3 i Tf, tako i za interakciju već formiranog kompleksa, urađena je serija eksperimenata koristeći različite metalne jone. Ispitivan je uticaj jona  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ , kao osnovnog fiziološkog liganda molekula Tf,  $Cu^{2+}$  i  $Ni^{2+}$ , za koje je utvrđeno da se u značajnoj meri vezuju za Tf, kao i  $Mg^{2+}$  i  $Zn^{2+}$ , koji su uobičajeni kofaktori proteina i samim tim prisutni u organizmu u velikim koncentracijama. Nakon uklanjanja IGFBP-3/Tf kompleksa iz seruma i dodatka metalnog jona u višku, monomerne jedinice su iskazale sposobnost formiranja novih kompleksa. Najviše kompleksa je nastalo u prisustvu  $Fe^{3+}$ , čime je dokazano da je metalni jon, a posebno  $Fe^{3+}$ , ključan element za stvaranje kompleksa.

Primenom afinitetne hromatografije sa imobilizovanim metalnim jonima i SELDI-TOF MS čipova sa istim imobilizovanim jonima je pokazano da i izolovani kompleksi IGFBP-3/Tf interaguju sa metalima i da je najspecifičnija interakcija sa jonom gvožđa. Takođe, upotrebom jonskih i hidrofobnih SELDI-TOF MS čipova su definisani pozitivno i negativno naelektrisani domeni, kao i hidrofobni domeni. Afinitetnom hromatografijom sa lektinom je utvrđeno da su dominantni ugljeni hidrati u kompleksima Galβ4GlcNAc ostaci i terminalna sijalinska kiselina.

Kandidat je dalje analizirao promene IGFBP-3/Tf kompleksa kod osoba sa izrazito malom ili velikom koncentracijom gvožđa u serumu, kao i kod sportista sa izmenjenom potrebom za gvožđem. Rezultati su pokazali: (a) da su kod osoba sa povećanom koncentracijom gvožđa (a bez patologije) povećane koncentracije IGFBP-3 i kompleksa IGFBP-3/Tf, (b) da nije promenjena koncentracija kompleksa kod sportista, (c) da je kod pacijenata sa anemijom koncentracija kompleksa smanjena iako je koncentracija IGFBP-3 nepromenjena i (d) da su kod pacijenata sa tumorom debelog creva (kod kojih je anemija deo patologije), smanjene koncentracije kompleksa i IGFBP-3, a povećana koncentracija feritina.

Iz svega navedenog, kandidat je zaključio da formiranje IGFBP-3/Tf kompleksa zavisi primarno od koncentracije jona gvožđa, zatim od koncentracije IGFBP-3, ali i od drugih molekula koji vezuju gvožđe, kao što je feritin. Kompleksi u cirkulaciji pacijenata sa tumorom debelog creva imaju izmenjenu strukturu: povećan je stepen glikozilovanja i oksidacije, jača je interakcija sa metalnim jonima i izmenjen je raspored i/ili broj naelektrisanih grupa. Reaktivnost IGFBP-3 kod ovih pacijenata, prema ligandu IGF-I, je bila devet puta manja nego kod zdravih ljudi, te je zaključeno da strukturne modifikacije (mimo pada koncentracije) znatno menjaju funkciju IGFBP-3, te vrlo verovatno i kompleksa u čijem je sastavu.

Dalje je u radu ispitana interakcija IGFBP-3/Tf kompleksa sa TfR na tkivu debelog creva. Pretpostavka je da se IGFBP-3 za obavljanje svoje osnovne nezavisne uloge (mimo IGF sistema), koja je pro-apoptotska, doprema u ćeliju iz okoline. Ujedno je poznato da se na površini ćelija mogu naći različiti molekuli sposobni da vežu IGFBP-3, te se deo eksperimenata i rezultata odnosi na ispitivanje interakcije kompleksa sa TfR i važnosti ovog puta internalizacije. Rezultati su pokazali: (a) da su kompleksi prisutni u membranskoj i citosolnoj frakciji, netumorskog i tumorskog tkiva, u koncentraciji znatno manjoj nego u cirkulaciji, (b) da je neuporedivo više TfR na membrani nego u citosolu (frakcija internalizovanih TfR), ali je njihovo zasićenje sa Tf manje nego citosolnih TfR (internalizuju se receptori tek po vezivanju Tf) i da je u oba slučaja prisutan IGFBP-3 (znatno više u citosolu, u kompleksu sa Tf), (c) da je u citosolnoj frakciji tumorskog tkiva sličan relativni odnos IGFBP-3:Tf:TfR kao kod netumorskog, dok je na membranama tumorskog tkiva veći stepen zasićenja receptora samim Tf, ali ne i kompleksima IGFBP-3/Tf, (d) da je visoki stepen kolokalizacije IGFBP-3, Tf i TfR u obe vrste tkiva i (e) da je kod tumorskog tkiva kompleks u većoj meri lokalizovan na ćelijskim membranama, dok je kod netumorskog tkiva lokalizacija difuznog tipa, uključujući i jedro. Iz svega nabrojanog, kandidat je zaključio da se put internalizacije vanćelijskog IGFBP-3 pretežno odvija preko kompleksa IGFBP-3/Tf, odnosno IGFBP-3/Tf/TfR, a ne preko drugih struktura koje prepoznaju IGFBP-3, kao i da je povećana ekspresija TfR na površini tumorskih ćelija potencijalna kompenzacija za smanjenu koncentraciju IGFBP-3/Tf kompleksa u cirkulaciji.

Pošto se od egzogeno unetog IGFBP-3 očekuje da učestvuje u pro-apoptotskim procesima, od kojih se neki odvijaju u jedru, kandidat je, analizom svih dobijenih rezultata, pretpostavio da jon gvožđa vezan za IGFBP-3 dospeva do ćelijskih odeljaka ili učestvuje u ćelijskim procesima u kojima ne bi bio prisutan kada je vezan samo za Tf. Takođe, nedovoljno prisustvo IGFBP-3, a posebno u jedru, bi mogao biti jedan od razloga koji omogućava duži opstanak tumorskih ćelija.

### **C. Uporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature**

Vezujući proteini za faktore rasta slične insulinu se intenzivno istražuju u poslednjih dvadesetak godina. Oni su deo IGF sistema čija je osnovna funkcija regulacija ćelijskog rasta, razvoja i diferencijacije, počev od fetalnog perioda sve do kraja života. U različitim periodima života njihova uloga se u izvesnoj meri menja i modifikuje potrebama organizma. IGF peptidi

u periodu rasta organizma su jaki mitogeni, tokom odraslog doba igraju važnu ulogu u oporavku tkiva od povreda, a u starijem dobu se njihova funkcija postepeno smanjuje. Preterana aktivnost IGF molekula kod odraslih osoba je često povezana sa nekontrolisanim rastom ćelija karakterističnim za nastanak i razvoj tumora. IGFBP molekuli regulišu aktivnost IGF i njihovu distribuciju u organizmu. U zavisnosti od toga za koji je IGFBP vezan IGF, krajnji ishod može biti zadržavanje u cirkulaciji (depo) ili transport do tkiva, podsticanje vezivanja za receptore ili inhibicija. Dokle god je konstanta afiniteta određenog IGFBP za IGF veća od konstante afiniteta receptora i dok ne dođe do proteolize IGFBP, inhibirano je dejstvo IGF. Na konstante afiniteta znatno utiču post-translacione modifikacije IGFBP i IGF receptora, a u slučaju IGFBP to su glikozilovanje, fosforilovanje, oksidacija, proteoliza, metilovanje, transglutaminovanje i acilovanje. Za očekivati je da i sve interakcije IGFBP sa drugim biomolekulima mogu uticati na afinitet prema IGF, odnosno na njihovo dejstvo. Na osnovu svega iznetog može se zaključiti da je izučavanje post-translacionih modifikacija i kompleksa IGFBP sa drugim biomolekulima od velikog značaja za razumevanje rasta i razvoja koje kontrolišu IGF.

Pored ove osnovne funkcije, većina IGFBP ispoljava i dejstva nezavisna od IGF sistema. Ova dejstva ne isključuju interakciju IGF-IGFBP, ali ne dolazi do vezivanja IGF za receptore i nema signalne transdukcije ovim putem. IGFBP se direktno vezuju za molekule na ćelijskim membranama. U nekim slučajevima se IGFBP dalje internalizuje ili interaguje sa drugim molekulom na površini ćelije, a za mnoge interakcije se ne zna gde dalje vode. O fiziološkoj ulozi ovih pojava ili o njihovoj kontroli se još manje zna.

IGFBP-3 je glavni vezujući protein IGF sistema u cirkulaciji i vezuje 70-80 % ukupnih IGF molekula. Formira tercijarne komplekse sa IGF ligandom i proteinom pod nazivom podjedinica nestabilna u kiselj sredini („acid-labile subunit“, ALS). Masa ovog kompleksa je 150 kDa, što ga čini dovoljno velikim da ostane u krvnim sudovima kao depo IGF. Proteinski deo IGFBP-3 je mase od 29 kDa, a post-translaciono fiziološki podleže proteolizi, glikozilovanju i fosforilovanju, dajući dve izoforme masa 40 i 45 kDa u približnom odnosu 1:1. Takođe, IGFBP-3 podleže i drugim modifikacijama, od kojih neke dovode do promene afiniteta prema IGF. Kombinacija smanjene koncentracije IGFBP-3 i povećane koncentracije IGF-I smatra se prognostičkim faktorom rizika za razvoj i napredovanje tumora. U tom svetlu, izučavanje modifikacija i interakcija IGFBP-3 sa drugim biomolekulima se može smatrati vrlo aktuelnom problematikom sa stanovišta biohemije i metabolizma.

Do pre dvadesetak godina o IGFBP-3 se govorilo samo kao o nosaču IGF, a zatim se otvorilo novo polje koje je otkrivalo sve više samostalnih uloga IGFBP-3 i sve veći broj interakcija sa drugim proteinima. IGFBP-3 može interagovati sa fibrinogenom, fibrinom, transferinom, heparinom, kolagenom, fibronektinom, vitronektinom, plazminogenom, laktoferinom, kaveolinom i drugim molekulima. U većini slučajeva, osim konstatacija ovih interakcija, nije se otišlo dalje u upoznavanju njihove tačne uloge niti mehanizma kontrole njihovog nastajanja. Prilikom izbora teme za ovu doktorsku disertaciju uzeta je u obzir činjenica da IGFBP-3 ispoljava više različitih dejstava nezavisno od IGF liganada. Smatra se

da je osnovna samostalna uloga pro-apoptotska, mada ima rezultata koji idu u prilog mitogene i anaboličke uloge IGFBP-3. Velika je nepoznanica šta je „prekidač“ koji usmerava njegovu aktivnost ka proliferaciji, odnosno ka apoptozi ćelija. Osim specifičnog receptora za IGFBP-3, otkriveni su i drugi molekuli na ćelijama koji vezuju IGFBP-3.

Jedan od kompleksa koje formira IGFBP-3 je sa transferinom, glavnim transportnim proteinom jona gvožđa i drugih metala u cirkulaciji. Tf predaje metalne jone ćeliji nakon interakcije sa TfR i internalizacije. Sam IGFBP-3 poseduje domen koji može vezati metalni jon („metal-binding domain“, MBD), a koji je sakriven u unutrašnjosti tercijarne strukture i pod fiziološkim uslovima ovaj domen ne nosi metalni jon. Ranije je konstatovano da izolovani MBD može vezati metalne jone, da može interagovati sa Tf i da takav kompleks prepoznaje TfR. U okviru ove doktorske disertacije je pokazano da monomeri IGFBP-3 i Tf mogu formirati komplekse u prisustvu različitih metalnih jona, ali da ih najviše nastaje u prisustvu  $Fe^{3+}$ . Takođe je dokumentovano da je postojanje kompleksa IGFBP-3/Tf u plazmi (serumu) opšta pojava i da se radi o relativno stabilnoj asocijaciji, koja se može izolovati primenom dvostruke imunoprecipitacije (sa anti-Tf i anti-IGFBP-3 antitelima). U ovom radu je određena koncentracija kompleksa, što do sada nije bilo poznato.

Da bi se utvrdilo od čega zavisi stvaranje kompleksa, analizirani su uzorci dobijeni od osoba sa povećanom potrebom za gvožđem ili sa poremećajem u metabolizmu gvožđa. Pokazano je da koncentracija kompleksa zavisi, pre svega, od koncentracije jona gvožđa, a u manjoj meri od IGFBP-3. Ovim rezultatom se stiglo do potvrde postojanja novog učesnika u homeostazi gvožđa i spoznaje da je kompleks IGFBP-3/Tf deo transportnog sistema metalnih jona. Posebno interesantan za ispitivanje kao model sistem je bio serum pacijenata sa tumorom debelog creva. Za ove pacijente se zna da osnovnu bolest često prati anemija, kao posledica krvarenja, loše apsorpcije, loše ishrane usled tegoba pri jelu ili gubitka apetita. Analizom uzoraka ovih pacijenata, kandidat je došao do saznanja da povećana koncentracija feritina, molekula koji može vezati do 4500 jona gvožđa, ometa stvaranje IGFBP-3/Tf kompleksa, ukazujući na kompetitivni odnos između ova dva nosača gvožđa.

Radeći sa tkivom debelog creva, kandidat je došao do spoznaje da je TfR glavna vezujuća struktura na membrani ovih ćelija za IGFBP-3, što je važno u sagledavanju puta njegove internalizacije. Imunoprecipitacijom sa anti-TfR antitelom i imunofluorescentnim bojenjem tkivnih isečaka konstatovan je veliki stepen kolokalizacije IGFBP-3 i TfR, čime je dodatno potvrđeno da je osnovni put ulaska IGFBP-3 u ćeliju preko kompleksa sa Tf (IGFBP-3 ne može sam interagovati sa TfR, mimo Tf). U radu je konstatovana povećana ekspresija TfR na membrani tumorskih ćelija, što bi se moglo tumačiti kao kompenzatorni mehanizam za smanjenje koncentracije IGFBP-3/Tf kompleksa, kao i samog Tf u cirkulaciji pacijenata.

IGFBP-3 poseduje i domen odgovoran za njegovo usmeravanje u jedro („nuclear-localisation sequence“, NLS). Prema literaturnim podacima, jedan od puteva kojima IGFBP-3 indukuje apoptozu jeste delujući na transkripciju nakon translokacije u jedro. U ovom momentu se još uvek ne mogu do kraja povezati prisustvo i uloge IGFBP-3, Tf, TfR i gvožđa u zajednički mehanizam kojim učestvuju u opstanku zdravih i tumorskih ćelija, ali je izvesno

da je reč o procesima koji obuhvataju metabolizam gvožđa. U tumorskim ćelijama debelog creva nađena je povećana koncentracija gvožđa, a zna se da je gvožđe uzročnik stvaranja slobodnih radikala i oksidativnih promena fizioloških makromolekula. Moguće je da, nakon internalizacije, jon gvožđa u kompleksu sa IGFBP-3 dospeva do ćelijskih odeljaka ili učestvuje u ćelijskim procesima u kojima ne bi bio prisutan kada je vezan samo za Tf.

#### **D. Objavljeni radovi i saopštenja koji čine deo disertacije**

##### **Radovi u istaknutim međunarodnim časopisima M<sub>21</sub>**

1. Nedić O., Robajac D., Šunderić M., Miljuš G., Đukanović B., Malenković V., Detection and identification of oxidized insulin-like growth factor-binding proteins and receptors in patients with colorectal carcinoma. *Free Radical Biology and Medicine*, 65 (2013) 1195-1200 (IF 5,710, Kategorija Biohemija i molekularna biologija 45/291 u 2013).

2. Miljuš G., Malenković V., Nedić O., The importance of metal ions for the formation and isolation of insulin-like growth factor-binding protein 3–transferrin (IGFBP-3–Tf) complexes, and the analysis of their physiological involvement. *Metallomics*, 5 (2013) 251-258 (IF 3,978, Kategorija Biohemija i molekularna biologija 86/291 u 2013).

3. Miljuš G., Malenković V., Đukanović B., Kolundžić N., Nedić O., IGFBP-3/transferrin/transferrin receptor 1 complexes as principal mediators of IGFBP-3 delivery to colon cells in non-cancer and cancer tissue. *Experimental and Molecular Pathology*, 98 (2015) 431-438 (IF 2,706, Kategorija Patologija 22/75 u 2014).

##### **Rad u međunarodnom časopisu M<sub>23</sub>**

1. Miljuš G., Petrović M., Nedić O., Isolation of complexes formed between insulin-like growth factor-binding protein-3 and transferrin from human serum. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 77 (2012) 607-617.

##### **Radovi saopšteni na skupovima međunarodnog značaja štampani u izvodu M<sub>34</sub>**

1. Miljuš G., Petrović M., Nedić O., Isolation of the insulin-like growth factor-binding protein-3/transferrin complex from the human serum. Euroanalysis XVI, Beograd, 2011, Book of Abstracts, BC19.

2. Miljuš G., Malenković V., Nedić O., Metal-binding characteristics of the transferrin/IGFBP-3 complexes. 22<sup>nd</sup> IUBMB & 37<sup>th</sup> FEBS Congress, Sevilja, Španija, 2012, *FEBS Journal*, 279 Suppl 1 str. 276.



## E. Zaključak

Na osnovu svega izloženog, može se zaključiti da je u podnetoj disertaciji pod naslovom: "Izolovanje, karakterizacija i uloga kompleksa transferina sa vezujućim proteinom 3 za faktore rasta slične insulinu", kandidat Goran Miljuš uspešno odgovorio na sve postavljene zadatke koji se odnose na ispitivanje kompleksa koji nastaju između IGFBP-3 i Tf. Rezultati istraživanja, proistekli iz ove doktorske disertacije, objavljeni su u tri rada štampana u vrhunskim međunarodnim časopisima kategorije M<sub>21</sub>, jednom radu štampanom u međunarodnom časopisu kategorije M<sub>23</sub> i saopšteni su na dva skupa međunarodnog značaja. Od četiri štampana rada, na tri je Goran Miljuš prvi autor. Rezultati ove disertacije imaju fundamentalni biohemijski značaj.

Na osnovu svega izloženog, Komisija sa zadovoljstvom predlaže Nastavno-naučnom veću Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, da podnetu doktorsku disertaciju Gorana Miljuša pod naslovom: "**Izolovanje, karakterizacija i uloga kompleksa transferina sa vezujućim proteinom 3 za faktore rasta slične insulinu**" prihvati i odobri njenu odbranu za sticanje akademskog zvanja doktora biohemijskih nauka.

U Beogradu,  
02.09.2015.

Komisija:

dr Marija Gavrović-Jankulović, redovni profesor  
Hemijski fakultet  
Univerzitet u Beogradu

dr Olgica Nedić, naučni savetnik  
Institut za primenu nuklearne energije (INEP)  
Univerzitet u Beogradu

dr Milan Nikolić, docent  
Hemijski fakultet  
Univerzitet u Beogradu