

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На IV редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 26.01.2018. године, прихваћен је извештај ментора др Мирослава Живића и др Наташе Тодоровић о урађеној докторској дисертацији **Страхиње Крижака** под насловом „**Карактеризација осмотски активираних јонских струја у мембрани цитоплазматских капи изолованих из спорангиофора гљиве *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff**” и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Мирослав Живић, ванредни професор Универзитета у Београду - Биолошког факултета, др Наташа Тодоровић, научни сарадник Универзитета у Београду - Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ и др Марина Станић, научни сарадник Универзитета у Београду - Института за мултидисциплинарна истраживања.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација докторанда **Страхиње Крижака** под насловом „**Карактеризација осмотски активираних јонских струја у мембрани цитоплазматских капи изолованих из спорангиофора гљиве *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff**” је написана према Упутствима за обликовање докторске дисертације Универзитета у Београду. Дисертација обухвата уобичајена поглавља, у оквиру којих су на одговарајућим местима приказане табеле и илустрације. На крају је наведена листа литературних навода који су цитирани у оквиру дисертације. Дисертација је написана на 116 нумерисаној страни, садржи 1 табелу, 28 слика и 310 литературна навода.

Анализа докторске дисертације:

У овој докторској дисертацији кандидат **Страхиња Крижак** је приказао резултате детаљне карактеризације излазно исправљене брзоинактивирајуће тренутне струје (ИРИС) из мембране цитоплазматских капи добијених из спорангиофора гљиве *Phycomyces blakesleeanus* коришћењем методе наметнуте волтаже на делићу мембране у конфигурацији цела ћелија.

У поглављу **УВОД**, кандидат даје опште податке о јонским каналима и њиховој улози у ћелији. Потом даје детаљан преглед општих механизма осморегулације на

ћелијском нивоу. Затим се фокусира на механосензитивне јонске канале и даје детаљан преглед њихове улоге у осморегулацији у живом свету. Највећа пажња у уводу је поклоњена детаљном опису особина, молекуларног идентитета, сигналних путева активације и физиолошког значаја анјонског канала регулисаног запремином ћелије (*VRAC*) који има кључну улогу у осморегулацији код кичмењачких ћелија. У другом делу увода кандидат се усресређује на гљиве и прво даје детаљан опис процеса осморегулације код ове групе организама са посебним нагласком на улози јонских канала. Независно се анализира осморегулација код квасаца где су механизми добро познати у односу на кончасте гљиве где је знање о процесима осморегулације далеко мање. Затим кандидат анализира специфичности испитивања активности јонских канала у ћелијској мембрани кончастих гљива које су условљене присуством хитинског ћелијског зида, дајући критички приказ свих до сада коришћених метода и модел система за њихово испитивање, као и опис неколико до сада описаних јонских канала. На крају увода кандидат се фокусира на објекат истраживања; цитоплазматске капи добијене из спорангиофора гљиве *P. blakesleeanus* дајући прво кратак преглед царства гљива и врста које су најчешће коришћене као модел системи у физиолошким истраживањима. Затим се усресређује на врсту *P. blakesleeanus* као модел систем за изучавање мембранског транспорта код кончастих гљива и даје исцрпан опис истраживања у којима је испитиван процес настанка цитоплазматских капи добијених из спорангиофора гљиве *P. blakesleeanus* и активност јонских канала у њиховој мембрани.

У оквиру поглавља **ЦИЉЕВИ РАДА** као основни задатак кандидат наводи детаљну карактеризацију осмотски активираних струја регистрованих са целе мембране цитоплазматских капи добијених из спорангиофора гљиве *P. blakesleeanus* и утврђивање њихове улоге како у одговору гљиве на осмотске изазове у спољашњој средини, тако и у процесима њеног раста и енергетског метаболизма. Овај основни циљ кандидат даље разрађује наводећи следеће специфичне циљеве: утврђивање да ли модел систем мембране цитоплазматских капи функционално одговара ћелијској мембрани спорангиофоре гљиве *P. blakesleeanus*, регистровање укупних јонских струја кроз мембрану целе цитоплазматске капи и идентификација доминантних струја, карактеризација осмотски активираних јонских струја и испитивање њихове улоге у процесима регулације запремине и раста спорангиофоре и утврђивање утицаја потврђених блокатора осмотски активираних струја на раст, дисање и фосфатни метаболизам мицелијума гљиве.

У поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** детаљно су описани услови за узгој *P. blakesleeanus* у лабораторијским условима, процедура за изолацију цитоплазматских капи из спорангиофора ове гљиве, као и основне особине овог експерименталног објекта. Највећа пажња је поклоњена опису методе наметнуте волтаже на делићу мембране у конфигурацији цела ћелија као основном методу коришћеном у овој докторској дисертацији. Детаљно су описани сви технички параметри методе, волтажни протоколи коришћени за испитивање особина регистрованих јонских струја, као и математички модели коришћени у анализи добијених података. Даље је описан метод бојења ћелијског зида гљиве помоћу боје лактофенол-плаво са циљем утврђивања природе мембране цитоплазматских капи, као и методологија за мерење њиховог пречника у

експериментима акутне промене осмотских услова са циљем утврђивања физиолошке улоге ИРИС-а. На крају су описане методе којима је испитиван утицај блокатора ИРИС-а, *A9C* и нифлумичне киселине на раст и енергетски метаболизам мицелијума *P. blakesleeanus* и то: методе за мерење приноса биомасе, оксиметрије помоћу кисеоничне електроде и ^{31}P NMR.

У одељцима **РЕЗУЛТАТИ** и **ДИСКУСИЈА** добијени подаци су приказани и анализирани у три веће целине. Детаљна анализа добијених резултата представљена је главним текстом, који на адекватан начин допуњују одговарајуће табеле и илустрације. На тај начин омогућено је лако праћење редоследа представљања резултата истраживања. Резултати су тумачени, дискутовани и поређени међусобно, као и са подацима из литературе.

У првој целини кандидат је методом бојења лактофенол – плавим испитао да ли цитоплазматске капи из спорангиофора гљиве *P. blakesleeanus* имају способност синтезе ћелијског зида како би утврдио да ли њихова мембрана функционално одговара ћелијској мембрани спорангиофоре. Показано је да је 20% цитоплазматских капи образовало ћелијски зид. Како код гљива само потпуно функционална ћелијска мембрана има способност синтезе ћелијског зида, то значи да је најмање 20% цитоплазматских капи морало бити обавијено функционалном ћелијском мембраном. Чињеница да струје кроз целу ћелију снимљене у овом раду одликује веома сличан профил у хипоосмотским условима, са ИРИС-ом као преовлађујућом струјом на деполаришућим потенцијалима указује да цитоплазматске капи које су коришћене за регистровање струја представљају хомогену групу. Имајући у виду ове чињенице, као и низ додатних доказа добијених у претходним истраживањима, које је кандидат критички приказао, изведен је закључак да се може са великом вероватноћом тврдити да мембрана цитоплазматских капи добијених из спорангиофора кончасте гљиве *P. blakesleeanus* представља функционалну ћелијску мембрану и да с тога цитоплазматске капи представљају добар модел систем за изучавање активности плазмамембранских јонских канала *in situ*.

У другој и најобимнијој целини кандидат, користећи методу наметнуте волтаже у конфигурацији цела ћелија детаљно карактерише излазно исправљену брзоинактивирајућу тренутну струју (ИРИС) из мембране цитоплазматских капи добијених из спорангиофора гљиве *P. blakesleeanus*. Експериментима приказаним у дисертацији је по први пут извршено регистровање струја методом наметнуте волтаже у конфигурацији цела ћелија на модел систему мембрана цитоплазматских капи. Овај начин снимања јонских струја даје увид у типове и особине доминантних укупних струја присутних на испитиваној мембрани. Окарактерисан је одговор мембране на хипоосмотске услове средине, изазване дијализом читаве капи хиперосмотским раствором. За разлику од фамилије струја у изоосмотским условима, којима доминирају пасивна својства мембране, мале проводљивости, у хипоосмотским условима је карактеристично доминантно присуство излазно исправљене брзоинактивирајуће тренутне струје (ИРИС), активираних на деполаришућим потенцијалима. Поред ИРИС, присутне у свакој испитиваној мембрани цитоплазматске капи (максимална густина

струја на +70 mV износила је 129 ± 14 pA/pF ($n=30$)), и 73% регистрованих одговора је била приметна и спороактивирајућа улазна струја, густине 99 ± 11 pA/pF на -150 mV ($n=22$) која није даље испитивана у оквиру ове докторске дисертације.

ИРИС је права осмотски активирана струја јер: 1. има дозно зависну осетљивост на осмотски стимулус; 2. промена средине из хипоосмотских у хиперосмотске тренутно гаси ИРИС. Према својим особинама ИРИС се јасно разликује од свих до сада описаних јонских струја код гљива, али показује веома велике сличности са запремином регулисаном ањонском струјом (*VRAC*- *volume regulated anionic channel*) код кичмењака. Ове сличности су следеће: 1. активација у условима осмотски изазваног повећања запремине; 2. умерено излазно исправљање, са наелектрисањем вратница од $z_g = 0.82 \pm 0.1$; 3. волтажно и временски зависна инактивација на позитивним потенцијалима и опоравак од инактивације на негативним потенцијалима; 4. изражена селективност за ањоне у односу на катјоне са карактеристичном секвенцом проводљивости која одговара Ајсмановој серији I ($I : Cl^- : HCO_3^- : glukonat^- : glutamat^- = 1.4 : 1 : 0.25 : 0.01 : 0.088$); 5. прогресивно смањење амплитуде струје у времену које успорава унутарћелијски *ATP*; 6. активација нехидролизујућим аналогом *GTP* у изоосмотским условима, као и код *VRAC*, указујући да се ИРИС активира путем неког *GTP*-зависног сигналног пута. 7. смањење струје у присуству јона магнезијума са унутарћелијске стране. Фармаколошка карактеризација ИРИС је показала да *DIDS*, познати блокатор ањонских канала, нема ефекта на ИРИС. ИРИС инхибирају нифлумична киселина (концентрација 0,5 mM изазива блок максималне струје од $79 \pm 5\%$ ($n=4$)) и *A9C* (концентрација 1mM *A9C* блокира $68 \pm 5\%$ максималне струје ($n=5$)). Праћењем промена величине цитоплазматских капи при хипоосмотском стимулусу од 45 *mOsm* показано је да долази до повећања пречника капи за $8 \pm 4\%$ ($n = 4$), али није примећено мерљиво регулисано опадање запремине које би било очекивано да следи, као начин адаптације, након повећања запремине у хипоосмотским условима, могуће услед недовољно интензивног стимулуса.

У трећој целини кандидат се бавио испитивањем деловања блокатора ИРИС, нифлумичне киселине и *A9C* на раст и енергетски метаболизам мицелијума гљиве у циљу даљег дефинисања физиолошке улоге ове струје. Утврђено је да блокатори ИРИС блокирају раст. Нифлумична киселина је ефикаснији инхибитор са вредностима IC_{50} за раст од 23 μM док је IC_{50} *A9C* 130 μM . Мерење дисања у присуству нифлумичне киселине и *A9C* је показало да оба блокатора снажно инхибирају дисање мицелијума (IC_{50} за нифлумичну киселину = 50 μM ; за *A9C* = 142 μM). Оба блокатора доводе до значајног смањења концентрације *ATP*, која у случају додавања 2 mM *A9C* пада за чак 91%. *A9C*, али не и НФК, доводи до закишељавања како цитоплазме, тако и вакуоле за око 0,3 pH јединице. Механизми ових процеса нису са сигурношћу утврђени, али је показано да постоји чврста веза између енергетског метаболизма ћелије и регулације активности ИРИС.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ**, кандидат сумира добијене резултате у виду закључака, где су извучене основне информације о карактеристикама излазно исправљене брзоинактивирајуће тренутне струје (ИРИС) из мембране цитоплазматских капи добијених из спорангиофора гљиве *P. blakesleeanus* и утицају њених блокатора *A9C* и нифлумичне киселине на раст, дисање и фосфатни метаболизам мицелијума гљиве *P. blakesleeanus*

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** садржи 116 библиографске јединице. Литературни извори су адекватно цитирани на одговарајућим местима у тексту докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Križak S**, Nikolić L., Stanić, M., Žižić, M, Zakrzewska J, Živić M, Todorović N (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: 162-173. **(M22)**
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250815000327?via%3Dihub>
2. Stanić M, **Križak S**, Jovanović M, Pajić T, Ćirić A, Žižić M, Zakrzewska J, Cvetic-Antić T, Todorović N, Živić M (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-SGM*, 163(3): 364-372. **(M22)**
<http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.000429#tab2>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Križak, S**, Nikolić, Lj, Todorović, N, Stanić, M, Žižić, M, Vučinić, Ž, Živić, M.: “Ion channels in cytoplasmic droplets membrane from fungus *Phycomyces blakesleeanus*” Regional Biophysics Conference 2012, 03-07 September 2012, Kladovo, Serbia, Proceedings, pp: 26-29. **(M33)**
2. **Križak, S**, Nikolić, Lj, Živić, M, Stanić, M, Vučinić, Ž, Žižić, M, Todorović, N.: “Anionic currents from the cytoplasmic droplets membrane of the fungus *Phycomyces blakesleeanus* – analysis of whole-cell steady state currents”, 1st International Conference on Plant Biology, June 4-7, 2013, Subotica, Serbia, Book of Abstracts, pp. 48. **(M34)**
3. **Križak, S**, Nikolić, Lj, Todorović, N, Vučinić, Ž, Stanić, M, Žižić, M, Živić, M.: “Characterisation of moderately rapidly inactivating anionic current in cytoplasmic droplets membrane from *Phycomyces blakesleeanus*”, 1st International Conference on Plant Biology, June 4-7, 2013, Subotica, Serbia, Book of Abstracts, pp. 49. **(M34)**
4. Pajić, T, Jovanović, M, **Križak, S**, Cvetic Antić, T, Živić, M, Stanić, M.: “Anthracene-9-carboxylic and niflumic acid inhibit growth and respiration of fungus *Phycomyces blakesleeanus*”, Regional Biophysics Conference 2016, 25-28 August 2016, Trieste, Italy, Book of Abstracts, pp. 63. **(M34)**
5. **Križak, S**, Todorović, N, Pajić, T, Živić, M.: “GTP-activated inactivating anionic current in *P. blakesleeanus*”, Regional Biophysics Conference 2016, 25-28 August 2016, Trieste, Italy, Book of Abstracts, pp. 75. **(M34)**

Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација **Страхиње Крижака** под насловом „**Карактеризација осмотски активираних јонских струја у мембрани цитоплазматских капи изолованих из спорангиофора гљиве *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff**” представља савремену физиолошку и биофизичку студију у којој је детаљно окарактерисана излазно исправљена брзоинактивирајућа тренутна струја (ИРИС) из мембране цитоплазматских капи добијених из спорангиофора гљиве *P. blakesleeanus* коришћењем методе наметнуте волтаже на делићу мембране у конфигурацији цела ћелија. По свом обиму, садржају, оригиналности добијених резултата, начину њиховог представљања и дискутовања у односу на обимну и релевантну литературу, поднети текст има све одлике докторске дисертације. Страхиња Крижак је на адекватан начин представио истраживачку област у којој је радио, и резултате до којих је дошао. Добијени резултати истраживања имају добру перспективу, нарочито имајући у виду да је ИРИС тек пета детаљно окарактерисана струја у ћелијској мембрани гљива која при том показује велику сличност са запремином регулисаном анјонском струјом (*VRAC*) која је до сада регистрована само код ћелија хордата што указује да би *VRAC* или веома сличан јонски канал могао бити присутан и далеко ниже на филогенетском стаблу. Комисија сматра да докторска дисертација **Страхиње Крижака** по свом приступу и интерпретираним резултатима представља значајан допринос познавању транспортних процеса у ћелијској мембрани гљива. Део резултата проистеклих из докторске дисертације објављен је у два истакнута међународна часописа. На основу свега изложеног, комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитиван Извештај комисије и одобри јавну одбрану ове докторске дисертације.

У Београду, 10.03.2018. године

КОМИСИЈА:

др Мирослав Живић, ванредни професор
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Наташа Тодоровић, научни сарадник
Универзитет у Београду - Институт за
биолошка истраживања Синиша Станковић

др Марина Станић, научни сарадник
Универзитет у Београду - Институт за
мултидисциплинарна истраживања
