

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 Dragane Robajac, istraživača saradnika Instituta za primenu nuklearne energije-INEP u Zemunu, pod naslovom: “**N-glikom membranskih proteina i receptora za insulin i faktore rasta slične insulinu, izolovanih iz humane placentu u različitim (pato)fiziološkim stanjima**”.

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

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja disertacije

Doktorska disertacija Dragane Robajac, napisana je na 161 strani A4 formata (i sadrži 45 slika i 13 tabela. Rad obuhvata sledeća poglavlja: Uvod (2 strane), Pregled literature (40 strana), Materijal i metode (16 strana), Rezultati i diskusija (74 strana), Zaključci (1 strana) i Literatura (22 strane, 273 citata). Pored navedenog, disertacija sadrži Izvod na srpskom i engleskom jeziku (po 3 strane), Sadržaj, Listu skraćenica i Biografiju kandidata.

U **Uvodu** je istaknut značaj ispitivanja N-glikozilacije membranskih proteina, odnosno sadržaja N-glikana vezanih za receptore za insulin (IR) i faktore rasta slične insulinu (IGF1R i IGF2R), i istaknuti su ciljevi teze: a) profilisanje membranskog N-glikoma humane placentu (ispitivanje tipova i zastupljenosti N-glikana koji su vezani za membranske glikoproteine, ispitivanje uticaja starosne dobi trudnica, gestacijske starosti i patoloških stanja, *diabetes mellitus*-a i preeklampsije, na tip i zastupljenost N-glikana), i b) ispitivanje N-glikoma receptora IGF sistema (IR, IGF1R i IGF2R) izolovanih iz humanih placentu (uticaj starosne dobi trudnica, gestacijske starosti, dijabetesa i preeklampsije na tip i zastupljenost N-glikana vezanih za IR, IGF1R i IGF2R).

Pregled literature obuhvata četiri celine. Prva celina sadrži prikaz sistema faktora rasta sličnih insulinu (IGF sistem), strukturne karakteristike njegovih činilaca: IGF ligand (IGF-I i IGF-II), IGF vezujućih proteina (IGFBP-1 do IGFBP-6) i receptora (IGF1R, IGF2R, IR), kao i njihovu fiziološku ulogu. U drugoj celini opisane su uloge činilaca IGF sistema u rastu, razviću i određenim patološkim stanjima (dijabetes i preeklampsija sa zastojem rasta fetusa *in utero*). U trećoj celini detaljno je opisana glikozilacija proteina. Dati su pregledno tipovi glikozilacije proteina, posebno N-glikozilacija. Detaljno je opisan proces biosinteze N-glikana, regulacija biosinteze N-glikana, kao i uloga N-glikana u različitim biološkim procesima. U četvrtoj celini dat je kratak pregled biljnih lektina korišćenih u ovoj tezi, sa naglaskom na njihovu saharidnu specifičnost.

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

U poglavlju **Rezultati i diskusija** prikazani su i prodiskutovani rezultati na način koji prati ciljeve istaknute u Uvodu. Rezultati su podjeljeni u dve celine. U prvoj celini prikazani su rezultati dobijeni pri ispitivanju membranskog N-glikoma humane placente (pomoću elektroforetskog razdvajanja fluorescentno-obebeženih ugljenih hidrata na DNK sekvenatoru (DSA-FACE) i metodom lektinskog blota), kao i rezultati dobijeni pri ispitivanju uticaja starosti žena, gestacijske starosti placenti i patoloških stanja (dijabetesa i preeklampsije) na membranski N-glikom. Opisane su i metode kojima je testirana specifičnost primenjenih lektina.

Druga celina odnosi se na prikaz i tumačenje rezultata dobijenih prilikom ispitivanja N-glikana kovalentno vezanih za IR, IGF1R i IGF2R. Za svaki receptor pojedinačno ispitivan je uticaj starosne dobi žena, gestacijske starosti placente i patoloških stanja na tip i zastupljenost N-glikana prisutnih na pomenutim receptorima. Za ova ispitivanja primenjene su lektinska afinitetna hromatografija (LAH), testovi vezivanja u epruveti i Western imunoblot. Prikazani su i rezultati ispitivanja uticaja ^{125}I -insulina na vezivanje kompleksa ^{125}I -insulin-IR za SNA.

U **Zaključku** je Kandidatkinja sumirala dobijene rezultate.

U poglavlju **Literatura** navedeni su radovi iz oblasti istraživanja, koji iscrpno pokrivaju sve delove disertacije, kao i internet stranice sa kojih je kandidat preuzimao i prerađivao neke od slika priloženih u tezi.

B. Kratak prikaz rezultata

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitani su N-glikani membranskih proteina humane placente (N-glikom), N-glikani IR, IGF1R i IGF2R, kao uticaj starosti žena, gestacijske starosti placente i patoloških stanja na tip i zastupljenost ispitivanih N-glikana.

Membranski proteini su iz humanih placenti (210 uzoraka) izolovani metodom diferencijalnog centrifugovanja. N-glikani, oslobođeni sa membranskih glikoproteina, su obeleženi fluorescentnom bojom i enzimski desijalinizovani, a potom analizirani elektroforezom prilagođenom za rad na sekvenatoru DNK. Utvrđeno je prisustvo jedanaest frakcija N-glikana, a tip (struktura) najzastupljenijeg N-glikana u svakoj od frakcija identifikovan je poređenjem položaja njegovog elucionog maksimuma sa odgovarajućim elucionim maksimumom frakcija N-glikana iz kontrolnih uzoraka. Kao kontrolni uzorci upotrebljeni su N-glikani oslobođeni sa glikoproteina iz humanog seruma, kao i oni iz ribonukleaze B, čija je struktura poznata (M5 ($\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$), M6 ($\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$), M7 ($\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$), M8 ($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$) i M9 ($\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$)). Potom je, metodama DSA-FACE i lektinskog blota, ispitivan uticaj starosti žena na sadržaj N-glikana membranskog N-glikoma. Kandidatkinja je pokazala da starost žena ne utiče na N-glikom desijalinizovanih membranskih proteina placente. Lektinski blot je primenjen za dopunu i proveru rezultata dobijenih DSA-FACE metodom, kojom se ispituju samo desijalinizovani uzorci (zbog čega se gubi informacija o sadržaju sialinske kiseline, Sia u N-glikanima). U ovom delu Kandidatkinja je detaljno ispitala i specifičnost lektinskog blota kao

metode, upotrebom odgovarajućih saharida i/ili pojedinačnih glikoproteina, čiji su N-glikani ispitani i literaturno dostupni. Lektinskim blotom utvrđeno je da starost žena nema uticaja na membranski N-glikom iz humane placente. Pokazano je da je membranski N-glikom placente bogat različitim N-glikanskim strukturama, od kojih su najzastupljenije: biantenarni N-glikani: bigalaktozilovani glikan bez fukoze (Fuc) u jezgru-NA2, bigalaktozilovani glikan sa Fuc u jezgru NA2F, bigalaktozilovani glikan sa Fuc u jezgru i sa umetnutim ostatkom N-acetilglukozamina (GlcNAc) - NA2FB, agalakto glikan sa Fuc u jezgru NGA2, triantenarni N-glikani sa antenarnom Fuc (Na3Fb), triantenarni N-glikani sa Fuc u jezgru (NA3F) i tetraantenarni N-glikani sa antenarnom Fuc (Na4Fb). Strukture preostalih N-glikana koji se eluiraju na pozicijama max1, max2 i max6 pretpostavljene su na osnovu retencionih vremena RNaze B, dok struktura max4 nije mogla biti identifikovana na osnovu korišćenog standarda (RNaze B) i kontrole (humani serum). Na ovaj način dobijene su informacije o membranskom N-glikomu humane placente, što je prvi literaturni podatak ovakve vrste.

Kandidat je potom (primenom DSA-FACE i lektinskog blota) ispitao uticaj gestacijske starosti placenti na membranski N-glikom, podelivši uzorke na prvi i treći trimestar gestacije. Iz obe grupe uzoraka izdvojeno je jedanaest N-glikanskih frakcija (istih elucionih maksimuma), ali je njihova zastupljenost različita. Najzastupljeniji N-glikan u obe grupe uzoraka je NA2F. Statistički značajna razlika u sadržaju N-glikana između ispitivanih uzoraka, utvrđena je za devet od jedanaest N-glikanskih frakcija. Tokom gestacije sadržaj paucimanoznih, NA2F i NA3F N-glikana se povećava, dok se sadržaj NGA2, max4, NA2, max6 i NA2FB smanjuje. Primenom lektinskog blota Kandidatkinja je potvrdila uočene razlike i, sumirajući rezultate, zaključila da tokom gestacije dolazi do značajnih promena membranskog N-glikoma humane placente. Ispitivanjem uticaja patoloških stanja na membranski N-glikom utvrđeno je da preeklampsija dovodi do značajnog povećanja zastupljenosti manjih N-glikana (paucimanozne strukture, NGA2 i max4) i smanjenja zastupljenosti većih N-glikana (NA2, max6 i NA3F). Sa druge strane, u slučaju dijabetesa nađeno je da razlike postoje, mada nije ustanovljena statistička značajnost.

Kandidatkinja je zatim ispitala da li se promene na nivou ukupnog membranskog N-glikoma mogu detekovati i na pojedinačnim membranskim glikoproteinima, komponentama IGF sistema (IR, IGF1R i IGF2R). U tu svrhu primenjene su metode lektinske afinitetne hromatografije i imunoblota. Na osnovu rezultata ispitivanja uticaja starosti žena, gestacijske starosti placente i patoloških stanja na tip i zastupljenost N-glikana prisutnih na IR zaključeno je: (a) da starost žena ne utiče na tip i zastupljenost N-glikana prisutnih na IR, (b) da se tokom gestacije smanjuje sadržaj N-glikana koji nose ostatke L-Fuc, zatim biantenarnih N-glikana, i N-glikana koji se završavaju ostacima α 2,6-Sia, (c) da dijabetes i preeklampsija ne dovode do promena tipa i sadržaja N-glikana. Prilikom ispitivanja uticaja starosti žena, gestacijske starosti i patoloških stanja na tip i zastupljenost N-glikana prisutnih na IGF1R zaključeno je da: (a) sa starošću žena, u prvom trimestru trudnoće, dolazi do smanjenja sadržaja biantenarnih N-glikana, i povećanja sadržaja tri- i tetraantenarnih N-glikana, (b) tokom gestacije na IGF1R smanjuje se sadržaj fukozilovanih i N-glikana koji se završavaju ostacima α 2,6-Sia, dok se povećava zastupljenost N-glikana sa jezgarnom Fuc, (c) dijabetes ne dovodi do promena tipa i zastupljenosti N-glikana. Prilikom ispitivanja uticaja starosti žena, gestacijske starosti i

patoloških stanja na tip i zastupljenost N-glikana prisutnih na IGF2R zaključeno je da: (a) starost žena ne utiče na tip i zastupljenost N-glikana, (b) tokom gestacije se povećava zastupljenost fukozilovanih N-glikana, (c) dijabetes ne utiče na tip i zastupljenost N-glikana.

Opšti zaključak Kandidatkinje je da je N-glikozilacija proteina regulisana tokom razvoja, kao i da trend promena membranskog N-glikoma nije praćen istim trendom promena na nivou N-glikana membranskih receptora odgovornih za rast/proliferaciju/diferencijaciju (IR, IGF1R i IGF2R).

C. Usporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature

Novija istraživanja ukazuju da različiti činioci, kao što su (biološka) starost, pol, hormonski status, kao i određene životne navike (pušenje, alkohol, ishrana), utiču na tip i zastupljenost N-glikana vezanih za serumske proteine. Smatra se da neke od promena u N-glikomu mogu prouzrokovati promene u funkcionisanju nekih ključnih glikoproteina, a time, verovatno, i nastanak nekih bolesti. Ovome u prilog govore i podaci o izmeni strukture N-glikana proteina izolovanih iz pacijenata obolelih od nekih bolesti poput kancera, Alchajmerove bolesti, ciroze jetre itd.

Preeklampsija je oboljenje nepoznate etiologije, koje se karakteriše pojavom povišenog krvnog pritiska i prisustvom proteina u urinu kod žena posle 20. nedelje gestacije. Jedan od mogućih uzroka nastanka ove bolesti je plitka implantacija embriona, što za posledicu ima manje razvijenu mrežu krvnih sudova placente, a time i neadekvatno snabdevanje fetusa kiseonikom i nutrijentima, što negativno utiče na njegov rast i razvoj. Primećeno je da novorođenčad, kod čijih je majki dijagnostifikovana preeklampsija, često imaju manju telesnu masu. Kao poseban, i najteži oblik preeklampsije, javlja se i zastoj u rastu fetusa, a kod majke se može javiti hemoliza i povećana koncentracija enzima jetre uz smanjen broj trombocita. Pojedini autori smatraju da se preeklampsija može dovesti u vezu sa promenama strukture glikana na placentnim proteinima. Patologija preeklampsije može biti ili uzrok ili posledica promene u gliko-komponenti proteina. IGF sistem ima veliki značaj u pravilnom rastu i razvoju fetusa. Imajući u vidu da su receptori IGF sistema obilno N-glikozilovani, od interesa je ispitati da li dolazi do promena u glikozilaciji ovih receptora, kao i uticaj potencijalnih izmena u N-glikanima na promene u funkcionisanju placente, kao i povezanost N-glikoma IGF receptora iz placenti žena sa preeklampsijom.

Diabetes mellitus je vrlo često oboljenje koje, ukoliko se ne kontroliše, može dovesti do izuzetno povišenih koncentracija glukoze u krvi. Glukoza se vezuje za mnoge dostupne proteine, što za posledicu može imati izmenu njihove funkcije. Kontrolisanje nivoa glukoze izuzetno je važno za žene u trudnoći. Gestacijski dijabetes se karakteriše pojavom bolesti u toku trudnoće, i majke sa ovom komplikacijom često rađaju bebe sa povećanom telesnom masom. *Diabetes mellitus* tipa 1 je oboljenje najčešće prisutno i pre trudnoće. U literaturi postoje podaci o izmenama strukture glikana nekih placentnih proteina kod trudnica sa tipom 1 dijabetesa. Sa druge strane, nema mnogo podataka o glikozilaciji proteina IGF sistema. Bolest kao takva može biti, i često i jeste, od velikog uticaja na fetus. Sa druge strane, ukoliko je bolest kontrolisana stepen oštećenja može biti manji.

Ispitivanje uticaja starosti majke na tip i zastupljenost N-glikana membranskih glikoproteina placente od važnosti je za razumevanje samog procesa implantacije i placentacije, kao i kasnijeg rasta i razvoja fetusa. Takođe, od interesa je utvrditi uticaj glikana vezanih za membranske proteine zadužene upravo za rast i razvoj, a to su receptori IGF sistema. Ispitivanje uticaja patologija poput preeklampsije i dijabetesa može omogućiti razumevanje nastanka bolesti i mogućnost kontrole stepena oštećenja izazvanih oboljenjima.

Rezultati ove doktorske disertacije su, na modelu humane placente, pružili informacije o tipu i sastavu N-glikana membranskih proteina. Pokazano je da kompleksni membranski N-glikom čini jedanaest najzastupljenijih tipova N-glikana. Nađeno je da starost ne utiče na sadržaj N-glikana membranskog N-glikoma, što nije bilo očekivano s obzirom na literaturne podatke objavljene od strane grupa koje se bave ispitivanjem uticaja starosti na serumski N-glikom. Time je utvrđeno da se membranski i serumski N-glikom ne razlikuju samo po tipu najzastupljenijih N-glikana. U ovoj tezi je, takođe, pokazano da je membranski N-glikom, na neki način, povezan sa razvićem, imajući u vidu da tokom gestacije dolazi do značajnih promena membranskog N-glikoma (menja se zastupljenost čak 9 od jedanaest najzastupljenijih N-glikana, tj. 82%). Ovaj rezultat, ne samo da je prvi literaturni podatak takve vrste, već je postavio temelje i narednim istraživačkim pitanjima. Ispitivanje uticaja patoloških stanja na membranski N-glikom je pokazalo da patološka stanja dovode do promena membranskog N-glikoma. Kandidatkinja nalazi da su to preliminarni rezultati, koji otvaraju put daljim istraživanjima na većem broju detaljno opisanih uzoraka.

Na pitanje da li N-glikani IGF receptora, koji imaju bitnu ulogu u rastu i razvoju placente, prate šemu koja je uočena za ukupni N-glikom, Kandidatkinja nalazi da to zavisi od samog receptora. Bez obzira što dva (IR i IGF1R) od tri receptora IGF sistema pripadaju istoj familiji, i što imaju slične proteinske strukture, njihov N-glikom se različito menja u ispitivanim (pato)fiziološkim stanjima. Dok je za IR i IGF2R utvrđeno da starost nema uticaja na tip i zastupljenost njihovih N-glikana, za IGF1R je nađeno da starost može biti od uticaja na tip i zastupljenost N-glikana. I na nivou receptora zaključeno je da gestacija igra važnu ulogu u tipu i zastupljenosti N-glikana, dok nije nađeno da dijabetes i/ili preeklampsija utiču na sadržaj N-glikana receptora IGF sistema. Ipak, ovde je dobijen odgovor na pitanje sa početka ovog paragrafa, a to je, da pojedinačni glikoproteini mogu, ali ne moraju da prate opšti trend promena N-glikozilacije utvrđen kod membranskog N-glikoma.

D. Objavljeni radovi i saopštenja koji čine deo disertacije

(i) Objavljeni radovi

1. **Robajac D.**, Masnikosa R., Vanhooren V., Libert C., Miković Ž., Nedić O., The N-glycan profile of placental membrane glycoproteins alters during gestation and aging. *Mechanisms of Ageing and Development* 138 (2014) 1-9. (IF 3,397, Kategorija: Ćelijska biologija 88/184 u 2014. godini i Kategorija: Gerijatrija i gerontologija 13/50 u 2014. godini, M₂₁).

2. **Robajac D.**, Vanhooren V., Masnikosa R., Miković Ž., Mandić V., Libert C., Nedić O., Preeclampsia transforms membrane N-glycome in human placenta. *Experimental and Molecular Pathology*, 100 (2016) 26-30. (IF 2,706, Kategorija: Patologija 22/76 u 2014. godini, **M₂₁**).

3. **Robajac D.**, Masnikosa R., Filimonović D., Miković Ž., Nedić O., N-Glycosylation pattern of human placental insulin-like growth factor and insulin receptors in well-controlled pregestational diabetes mellitus. *Journal of Medical Biochemistry*, 31 (2012)205-210. (IF 1,084, Kategorija: Biohemija i molekularna biologija 254/290 u 2012. godini, **M₂₃**).

(ii) Objavljena saopštenja

1. Masnikosa R., **Robajac D.**, Miljuš G., Nedić O., IGF and insulin receptors from healthy human placenta are differently glycosylated – assessment by lectin chromatography. 5th Glycan forum, Berlin, Germany, 2011, Book of Abstracts p. 34.

2. **Robajac D.**, Masnikosa R., Vanhooren V., Libert C., Miković Ž., Nedić O., N-glycan profile of placental membrane glycoproteins changes during gestation and ageing. 38th FEBS Meeting, St Peterburg, Russia, last minute abstracts, p. 2.

3. **Robajac D.**, Masnikosa R., Miković Ž., Nedić O., N-glycosylation of insulin receptor and insulin-like growth factors receptors changes during gestation. 13th Bratislava Symposium on saccharides “Recent advances in Glycomics”, Smolenice, Slovakia, 2014. Book of Abstracts p.128.

4. **Robajac D.**, N-glycome of membrane proteins and receptors for insulin an insulin-like growth factors, isolated from human placenta from different (patho)physiological conditions. 5th Conference of the Serbian Biochemical Society Proceedings p.131-133.

E. Zaključak

Na osnovu svega izloženog može se zaključiti da je u podnetoj disertaciji, pod naslovom “**N-glikom membranskih proteina i receptora za insulin i faktore rasta slične insulinu, izolovanih iz humane placente u različitim (pato)fiziološkim stanjima**”, kandidatkinja Dragana Robajac uspešno odgovorila na sve postavljene zadatke koji se odnose na ispitivanje membranskog N-glikoma i N-glikana receptora IGF sistema. Pokazano je da kompleksni membranski N-glikom čini jedanaest najzastupljenijih tipova N-glikana, da starost ne utiče na sadržaj N-glikana, da tokom gestacije dolazi do značajnih promena membranskog N-glikoma (menja se zastupljenost čak 9 od jedanaest najzastupljenijih N-glikana, tj. 82%) i da patološka stanja (preeklampsija i dijabetes) dovode do promena membranskog N-glikoma. N-glikom IGF receptora se različito menja u ispitivanim (pato)fiziološkim stanjima. Starost ne utiče na tip i zastupljenost N-glikana vezanih za IR i IGF2R, dok je kod IGF1R uticaj utvrđen. Gestacija igra važnu ulogu u tipu i zastupljenosti N-glikana receptora, dok dijabetes i/ili preeklampsija ne utiču na njihov sadržaj. Rezultati istraživanja, proistekli iz ove doktorske disertacije, objavljeni su u dva rada štampana u vrhunskim međunarodnim časopisima kategorije **M₂₁** i jednom radu

štampanom u međunarodnom časopisu kategorije M₂₃, i u formi saopštenja na četiri skupa. Na sva tri objavljena rada Dragana Robajac je 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 Dragane Robajac pod naslovom **”N-glikom membranskih proteina i receptora za insulin i faktore rasta slične insulinu, izolovanih iz humane placentu u različitim (pato)fiziološkim stanjima”** prihvati i odobri njenu odbranu za sticanje akademskog zvanja doktora biohemijskih nauka.

U Beogradu,
18.12.2015.

Komisija:

dr Ljuba Mandić, redovni profesor
Hemijski fakultet
Univerzitet u Beogradu

dr Romana Masnikosa, viši naučni saradnik
Institut za nuklearne nauke „Vinča“
Univerzitet u Beogradu

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