

Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Nastavno-naučno veće

Predmet: Izveštaj komisije za pregled i ocenu doktorske disertacije Marije Nišavić, diplomiranog biohemičara

Na redovnoj sednici Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, održanoj 09.05.2016. godine, određeni smo za članove Komisije za pregled i ocenu doktorske disertacije Marije Nišavić, prijavljene pod naslovom:

„Ispitivanje interakcija terpiridinskih kompleksa rutenijuma(II) sa transportnim proteinima seruma“

"Investigation of interactions of ruthenium(II) complexes with serum transport proteins"

Nakon pregleda doktorske disertacije, podnosimo Veću sledeći

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja disertacije

Doktorska disertacija Marije Nišavić pod navedenim naslovom napisana je na 118 strana A4 formata (prored 1,5), sadrži 48 slika, 11 tabela i 1 shemu. Pored toga, teza sadrži i Prilog od 6 strana, sa 6 slika i 2 tabele. Teza obuhvata sledeća poglavlja: Uvod, Opšti deo, Naši radovi, Eksperimentalni deo i Literatura. Disertacija sadrži i sažetak na srpskom i engleskom jeziku, sadržaj, zahvalnicu i biografiju kandidata sa bibliografijom.

U **Uvodu** je dat kratak osvrt na aktuelnost i značaj teme istraživanja. Zbog svog antitumorskog dejstva, kompleksi rutenijuma su izuzetno značajni kako za ispitivanja, tako i za moguću primenu u kliničkoj praksi. Za razliku od platinskih hemoterapeutika

koji su u standardnoj kliničkoj upotrebi, kompleksi rutenijuma pokazuju povećanu selektivnost prema kancerskim ćelijama, izraženo antimetastatsko dejstvo i nisku opštu toksičnost. Iz navedenih razloga, već je nekoliko kompleksa rutenijuma ušlo u klinička ispitivanja, a konstantno se sintetišu nova jedinjenja na bazi ovog metala. Ispitivanje citotoksičnosti i interakcija sa biološkim molekulima je prvi korak u proceni njihovog potencijala za upotrebu u antitumorskoj terapiji. U okviru toga, ispitivanje interakcije sa proteinima seruma je od izuzetnog značaja, budući da se hemoterapeutici na bazi metala unose intravenozno i da proteini seruma učestvuju u njihovom transportu i biodistribuciji. Uprkos tome, u literaturi nema mnogo radova koji se bave detaljnom strukturnom karakterizacijom proizvoda interakcije između kompleksa i proteina. Pokazano je da metode masene spektrometrije mogu dati veliki broj relevantnih informacija, ali se u tu svrhu ne koriste rutinski. Shodno navedenom, postavljeni ciljevi ove teze uključuju detaljno ispitivanje interakcija tri odabrana kompleksa Ru(II) sa transportnim proteinima seruma: humanim serum albuminom (HSA) i transferinom (Tf). Odabrani kompleksi pripadaju novoj klasi monofunkcionalnih terpiridinskih jedinjenja meridionalne geometrije koja pokazuju visoku rastvorljivost u vodi i sposobnost za vezivanje DNK molekula, što upućuje na njihovo antitumorsko dejstvo. Interakcije ovih kompleksa sa proteinima do sada nisu bile ispitane. Takođe, za cilj je postavljeno i poboljšanje postojećih maseno-spektrometrijskih metoda za detaljnu strukturnu karakterizaciju proizvoda interakcije između proteina i kompleksa metala.

U **Opštem delu**, kandidatkinja daje pregled literature u skladu sa temom. Najpre su opisane osobine kompleksa rutenijuma, a zatim i pojedinačne klase ovih jedinjenja sa akcentom na najznačajnijim predstavnicima - kompleksima koji su ušli u klinička ispitivanja i onim koji su do sada pokazali obećavajuće dejstvo. Nakon toga, opisane su struktura i funkcija humanog serum albumina i transferina, kao i značaj ovih proteina za transport i selektivnost u dostavi kompleksa rutenijuma do tumorskih ćelija i tkiva. U poslednjoj celini su navedene maseno-spektrometrijske metode koje se koriste za ispitivanje interakcija kompleksa metala sa proteinima. U okviru toga, objašnjen je princip rada tzv. „mekih“ jonizacionih tehnika koje su u ovoj tezi korišćene za strukturnu karakterizaciju proizvoda interakcije odabranih kompleksa sa HSA i Tf.

Poglavlje **Naši radovi** se sastoji od devet celina. U prvoj celini su prikazani rezultati citotoksičnosti ispitivanih kompleksa i cisplatine na tri kancerske ćelijske linije. U drugoj je predstavljena karakterizacija kompleksa upotrebom matriksom-pomognute laserske desorpcije i jonizacije (*engl.* matrix-assisted laser desorption and ionization, MALDI) masene spektrometrije (MS), a u trećoj ispitivanje vezivanja kompleksa za cele proteine upotrebom navedene metode. Četvrto poglavlje opisuje određivanje stehiometrije vezivanja, dok se peto i šesto bave određivanjem afiniteta vezivanja i ispitivanjem uticaja vezivanja na nativnu strukturu odabranih proteina, respektivno. Sedmo poglavlje opisuje optimizaciju i upotrebu metoda tečne hromatografije i masene spektrometrije za strukturnu karakterizaciju proizvoda interakcije između kompleksa i proteina. U osmom poglavlju su prikazani rezultati teorijskog predviđanja mesta i oblika u kom se kompleksi vezuju za protein koji je definisan kao glavni vezivni partner, kao i njihova usporedba sa eksperimentalno dobijenim rezultatima. U devetoj celini su izvedeni zaključci istraživanja.

U **Eksperimentalnom delu** kandidatkinja opisuje eksperimentalne procedure za pripremu uzoraka, kao i instrumentalne uslove korišćene u svakom setu eksperimenata koji je urađen u okviru ove disertacije.

B. Kratak prikaz rezultata disertacije

U disertaciji su izloženi rezultati dobijeni ispitivanjem interakcija između tri kompleksa opšte formule $mer-[Ru(Cl-tpy)(N-N)Cl]Cl$ (Cl-tpy - 4'-hloro-2,2':6',2''-terpiridin; N-N - 1,2-diaminoetan (en), 1,2-diaminocikloheksan (dach) ili 2,2'-bipiridine (bipy)) i transportnih proteina seruma, humanog serum albumina (HSA) i transferina (Tf).

Citotoksičnost kompleksa je ispitana na tri kancerske ćelijske linije: HeLa (kancer grlića materice), A375 (melanom) i SKBR3 (kancer dojke). Kompleksi su pokazali slabo do umereno citotoksično dejstvo, sa većim IC_{50} vrednostima od cisplatine koja je, radi poređenja, ispitana pod istim uslovima. Uočljive su i međusobne razlike u efikasnosti između kompleksa, pri čemu su kompleksi sa en i dach ligandima pokazali veću aktivnost od bipy kompleksa. Najniža IC_{50} vrednost od 35 μM je određena po tretmanu HeLa ćelija en kompleksom, nakon 48 h inkubacije (39.2 μM nakon 24 h).

Rezultati ispitivanja interakcija sa odabranim proteinima su pokazali da kompleksi sa en i dach ligandima koji poseduju sposobnost građenja jakih vodoničnih veza imaju značajno veći afinitet za vezivanje za odabrane proteine. Konstante vezivanja ovih kompleksa su reda veličine 10^4 - 10^5 M^{-1} za HSA i 10^1 - 10^2 M^{-1} za Tf, dok su vrednosti konstanti za bipy kompleks gotovo zanemarljive. Pokazano je da se sva tri kompleksa u većoj meri vezuju za HSA u poređenju sa Tf, kao i da oba proteina imaju najveći vezivni kapacitet za kompleks sa dach ligandom: nakon 24 h inkubacije pri molarnom odnosu proteina prema kompleksu od 1:10, jedan molekul HSA u proseku vezuje 8.35 ± 0.25 molekula, dok Tf vezuje 3.36 ± 0.10 molekula ovog kompleksa. Vezivanje ispitivanih kompleksa ne dovodi do značajnih promena u sekundarnoj strukturi proteina, dok se u tercijarnoj strukturi uočavaju diskretne promene koje su izraženije kod Tf.

Mesta za vezivanje kompleksa na Tf su određena proteomskim *engl.* “*bottom-up*” pristupom uz pomoć metoda tečne hromatografije visokih performansi (*engl.* high performance liquid chromatography, HPLC) i MALDI MS. Metoda je testirana na goveđem serum albuminu, a zatim je iskorišćena za detaljno određivanje vezivnih mesta na Tf. Nađeno je da se kompleksi sa en i dach ligandima za protein vezuju koordinacijom ostataka histidina. Od pet identifikovanih ostataka, His585 ulazi u vezivno mesto za gvožđe, dok su preostali ostaci histidina locirani na površini proteina. Ciljni amino-kiselinski ostaci su određeni rešavanjem tandem masenih spektara ciljnih peptidnih sekvencija. Tokom analize uzorka u α -cijano-4-hidroksicimetnoj kiselini kao matrici (koja se koristi za efikasnu jonizaciju peptida) je došlo do fragmentacije helatnih liganada kompleksa, ali je veza između metala i peptida ostala očuvana. Od nekoliko ispitanih matrica, jedino ditranol nije doveo do fragmentacije kompleksa u izvoru masenog spektrometra, pri relativnom intenzitetu lasera od 50%. Vezivna mesta kompleksa sa bipy ligandom nisu mogla biti određena na ovaj način, te se pretpostavlja da se ovaj kompleks za Tf vezuje u maloj meri, najverovatnije preko nekovalentnih interakcija (što je u skladu sa prethodno opisanim rezultatima).

Mesta vezivanja kompleksa na HSA su određena nano-LC/nano-elektrosprej masenom spektrometrijom (ESI MS) u pozitivnom i negativnom jonskom modu. Efikasna jonizacija peptida u negativnom jonskom modu je postignuta dodatkom

rastvora formaldehida u izopropanolu, nakon hromatografskog razdvajanja peptida. Optimalna određena koncentracija formaldehida iznosi 5 mM. U ovim eksperimentima, identifikovano je šest peptidnih sekvencija (od čega pet softverski i jedna ručno) na kojima se kompleksi sa en i dach ligandima vezuju za ostatke histidina (5) i asparaginske kiseline (1). Prema rezultatima dokinga, ove amino kiseline ulaze u sastav pet vezivnih mesta na proteinu. Od identifikovanih amino kiselina, tri ostatka histidina i asparaginska kiselina su mete za vezivanje kompleksa sa bipy ligandom i ulaze u sastav dva vezivna mesta. Pored navedenog, pokazano je i da odabir mesta za vezivanje kompleksa na proteinu zavisi od oblika u kom se kompleks nalazi (hloro, akva ili hidrokso). U tom kontekstu, teorijski izračunate energije vezivanja su najniže za hloro oblik kompleksa. Osim u slučaju kompleksa sa en ligandom kod kog su vrednosti energije vezivanja slične za hidrokso i akva oblik, akva oblici se najslabije vezuju i to pretežno za mesta na površini proteina.

C. Uporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature

Budući da kompleksi rutenijuma poseduju potencijal za upotrebu u antikancerskoj terapiji, veliki broj strukturno raznovrsnih jedinjenja se sintetiše sa ciljem pronalaska što efikasnijih kompleksa koji će biti kandidati za klinička ispitivanja. Ispitivanje interakcija novosintetisanih jedinjenja sa biološkim molekulima pomaže u razumevanju veze između njihove strukture i funkcije. U skladu sa strukturnom raznovrsnošću i posledičnim razlikama u mehanizmu dejstva, kompleksi rutenijuma pokazuju različitu citotoksičnost. Literaturni podaci o IC_{50} vrednostima za različite tumorske ćelijske linije se najčešće kreću od 1 μ M do $\leq 200 \mu$ M, što komplekse ispitane u ovoj disertaciji stavlja u red umereno citotoksičnih jedinjenja. Takođe, treba imati u vidu da neki kompleksi rutenijuma pokazuju izraženu selektivnost prema određenoj kancerskoj ćelijskoj liniji, dok drugi pokazuju opšte citotoksično dejstvo. U tom kontekstu se mogu videti razlike između dejstva odabranih kompleksa na ispitane ćelijske linije: npr. nakon 24 h inkubacije, kompleks sa en ligandom pokazuje minimum 2,5 puta veću citotoksičnost prema HeLa ćelijskoj liniji u poređenju sa A375 i SKBR3 ćelijskim linijama.

U literaturi je pokazano da se većina kompleksa rutenijuma, uključujući i klinički relevantne kandidate, nakon 24 h inkubacije gotovo u celosti vezuje za proteine

seruma (>90%). Formiranje stabilnih adukata sa HSA i Tf je pokazano za komplekse NAMI, KP i RAPTA tipa. Iako se konstante i stehiometrija vezivanja međusobno razlikuju za različite komplekse rutenijuma, većina preferira vezivanje za HSA u poređenju sa Tf, kao što je i slučaj sa kompleksima ispitanim u ovoj disertaciji. Konstante vezivanja ispitanih en/dach kompleksa za HSA su slične kao i kod arenjskih Ru(II) jedinjenja, dok je stehiometrija vezivanja, u poređenju sa npr. arenjskim kompleksima koji sadrže en ligand, trostruko veća. Razlike između ispitanih kompleksa sa en/dach ligandima i kompleksa sa bipy ligandom su posledica sposobnosti bidentatnog helatnog liganda da gradi jake vodonične veze sa akceptorskim amino-kiselinskim ostacima na proteinima i u saglasnosti su sa literaturnim podacima u kojima se ističe pozitivna korelacija ove osobine helatnih liganada sa brzinom hidrolize, kinetikom i afinitetom za vezivanje bioloških molekula te, posledično, antitumorskom aktivnošću. Uprkos visokom vezivnom kapacitetu odabranih proteina za ispitivane komplekse, efekat vezivanja na sekundarnu strukturu HSA i Tf je minimalan, što je od ključnog značaja za očuvanje funkcije proteina. U literaturi je pokazano da po vezivanju četiri ekvivalenta klinički relevantnog KP1019, helikalna struktura HSA biva delimično narušena.

Određivanje mesta za vezivanje ispitivanih en/dach kompleksa na Tf je pokazalo da se kompleksi za protein mogu vezati specifično, za mesto za vezivanje Fe³⁺, i nespecifično, za površinske ostatke histidina. U literaturi su navedeni slični rezultati ispitivanja vezivnih mesta klinički relevantnog KP1019 na laktotransferinu, dobijeni rendgenskom kristalografijom. Pored toga, literaturni podaci ukazuju na vezivanje arenjskih Ru(II) kompleksa za Tf preko koordinacije površinskih ostataka histidina, među kojima je His273 identifikovan i kao ciljna amino-kiselina za vezivanje en/dach kompleksa. Osim navedenog, u literaturi se ne mogu naći dodatne informacije o vezivanju kompleksa Ru(II) za Tf. Posebno je značajno to da je za ispitivanja korišćen MALDI MS, čija je upotreba za određivanje vezivnih mesta kompleksa metala na proteinima je opisana tek u nekolicini naučnih radova.

Određivanje mesta za vezivanje ispitivanih kompleksa na HSA je pokazalo da sva tri kompleksa pokazuju najveći afinitet za vezivanje za mesta koja su u literaturi definisana kao N-terminalno mesto za vezivanje metala i A mesto za vezivanje metala.

Pored toga, literaturni podaci dobijeni rendgenskom kristalografskom analizom adukta HSA sa KP1019 ukazuju na vezivanje kompleksa za His146 koji je identifikovan i kao meta za vezivanje en/dach kompleksa. Pored pet ostataka histidina (tri za bipy), pokazano je da se kompleksi koordinativno kovalentno vezuju i za jedan ostatak asparaginske kiseline, koja je u literaturi opisana kao mesto za vezivanje kompleksa rutenijuma na različitim model proteinima. Takođe, poznato je da se ostaci histidina i asparaginske kiseline nalaze u aktivnim mestima mnogih enzima, što ukazuje na potencijal ispitivanih kompleksa za menjanje enzimske aktivnosti, što može biti od interesa za njihov mehanizam dejstva.

Pored toga što MALDI MS nije često korišćen za ispitivanje interakcija kompleksa metala sa proteinima, analiza peptida i metalo-peptida upotrebom nano-LC/nano-ESI MS je do sada rađena isključivo u pozitivnom jonskom modu. U ovoj tezi je opisan metodološki pristup koji omogućava efikasnu jonizaciju (metalo)peptida i u negativnom jonskom modu, a koji je omogućen post-kolonskim dodatkom formaldehida u izopropanolu. U literaturi je opisan pozitivan efekat izopropanola na poboljšanje negativne jonizacije, u kontekstu režima rada pri nižim vrednostima električnog napona što posledično smanjuje mogućnost električnog pražnjenja i povećava stabilnost elektrospreja. Upotreba formaldehida kao poboljšivača negativne jonizacije je opisana u jednom naučnom radu koji se bavi analizom modulatora androgenih receptora. Pristup koji je opisan u ovoj tezi ima potencijal za širu upotrebu u proteomici. U analizi vezivanja kompleksa metala za proteine se pokazao korisnim u kontekstu redukcije naelektrisanja detektovanih jona što olakšava identifikaciju ciljnih sekvencija, te se može koristiti kao komplement ili alternativa standardno korišćenoj analizi u pozitivnom jonskom modu.

D. Objavljeni i saopšteni radovi koji čine deo disertacije

1.Radovi saopšteni u međunarodnim časopisima:

M21a:

Marija Nišavić, Amela Hozic, Zdenko Hameršak, Martina Radić, Ana Butorac, Marija Duvnjak, Mario Cindrić. High-efficiency microflow and nanoflow negative electrospray ionization of peptides induced by gas-phase proton transfer reactions, *Analytical Chemistry*, 89 (2017) pp. 4847-4854.

M21:

Marija Nišavić, Milovan Stoiljković, Ivo Crnolatac, Maja Milošević, Ana Rilak, Romana Masnikosa. Highly water-soluble ruthenium(II) terpyridine coordination compounds form stable adducts with blood-borne metal transporting proteins, *Arabian Journal of Chemistry*, In press, DOI: 10.1016/j.arabjc.2016.07.021, (2016).

Marija Nišavić, Romana Masnikosa, Ana Butorac, Kristina Perica, Ana Rilak, Lela Korićanac, Amela Hozic, Marijana Petković, Mario Cindrić. Elucidation of the binding sites of two novel Ru(II) complexes on bovine serum albumin, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 159 (2016), pp. 89–95.

2.Radovi saopštteni na skupu međunarodnog značaja štampani u izvodu (M34)

Marija Nišavić, Amela Hozic, Iva Popović, Marijana Petković and Mario Cindrić. Positive/negative ion mode nano-electrospray ionization mass spectrometry of metallated peptides, 13th International school of biophysics, Croatia (2016), pp125.

Marija Nišavić, Romana Masnikosa, Petković Marijana, Cindrić Mario. HPLC, ESI qTOF and MALDI TOFTOF reveal target sequence and binding stoichiometry of novel Ru (II) complexes to serum albumin, FEBS3+ Meeting Molecules of Life, Portorož, Slovenia (2015), PI-26, p 148.

Romana Masnikosa, Marija Nišavić, Ana Rilak, Marija Matković, Ivo Crnolatac. The binding of novel water-soluble terpyridine complexes with anticancer activity to human serum transport proteins as seen through spectroscopy and calorimetry, 9th Summer Course for Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine, CAAS Dubrovnik, Croatia (2015), P31, p 75.

E. Zaključak

Na osnovu svega navedenog, zaključujemo da je u podnetoj disertaciji pod naslovom “Ispitivanje interakcija terpiridinskih kompleksa rutenijuma(II) sa transportnim proteinima seruma” kandidatkinja, Marija Nišavić, uspešno odgovorila na sve postavljene zadatke i ciljeve koji se tiču ispitivanja interakcija odabranih kompleksa, kao i strukturne karakterizacije proizvoda interakcija koje ostvaruju sa transportnim proteinima seruma. Upotrebom spektroskopskih metoda, određeni su stehiometrija, afinitet, kao i uticaj vezivanja na nativnu strukturu proteina. Korišćenjem maseno-spektrometrijskih metoda, kandidatkinja je odredila mesta za vezivanje ispitivanih Ru(II) kompleksa na proteinima. U okviru toga, po prvi put je opisana metoda negativne jonizacije metalo-peptida upotrebom nano-LC/nano-ESI MS, sa potencijalom za širu upotrebu u ispitivanju vezivanja kompleksa metala za biološke molekule. Dobijeni rezultati za komplekse sa en/dach ligandima pokazuju određene sličnosti sa nekim klinički relevantnim kompleksima rutenijuma, što ukazuje na pogodnost ovih kompleksa za dalja ispitivanja. Rezultati istraživanja prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji su objavljeni u okviru tri naučna rada od kojih je jedan štampan u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (M21a), a dva u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21). Pored toga, rezultati iz ove teze su saopšteni i na tri skupa međunarodnog značaja (M34). Ostatak rezultata će biti publikovan u još dva rada. Komisija smatra da rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji nesumnjivo predstavljaju značajan naučni doprinos u razumevanju interakcija između kompleksa Ru(II) i proteina, koji obuhvata i metodološki doprinos u ispitivanju vezivanja kompleksa metala za biološke molekule. Komisija smatra i da se disertacija uklapa u savremene trendove u oblasti biohemije.

Na osnovu svega izloženog, komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, da podnetu doktorsku disertaciju Marije Nišavić prihvati i odobri njenu odbranu.

**Beograd,
14.08.2017.**

Komisija

dr Zoran Vujčić, redovni profesor
Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

dr Mario Cindrić, viši znanstveni
suradnik Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu

dr Marijana Petković, naučni savetnik
Instituta za nuklearne nauke "Vinča",
Univerziteta u Beogradu

dr Vladimir Beškoski, docent
Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu