

Предмет: Пријава теме докторске дисертације Немање Аксића, мастер хемичара, дипломираног инжењера електротехнике и рачунарства, докторанда Хемијског факултета, Универзитета у Београду, истраживача приправника, запосленог на Институту за хемију технологију и металургију, Универзитета у Београду – Институт од националног значаја за Републику Србију

Образложење теме

Назив теме: **Анализа интеракција новог лектина изолованог из *Savalia savaglia* са гликанима и протеинима**

Научна област: **Хемија**

Ужа научна област: **Биоаналитичка хемија**

1. Предмет научног истраживања

Планирани предмет ове докторске дисертације су испитивања интеракција новог антивирусног лектина, изолованог из златног корала *Savalia savaglia*, са гликанима, гликопротеинима и протеинима из крвне плазме, моноклеарних ћелија периферне крви (*Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)*), и других ћелијских култура, попут: људских вагиналних епителијалних ћелија (*Human Vaginal Epithelial Cells*), људских ендотелијалних ћелија црева (*Human Colon Endothelial Cells*) и људских назалних епителијалних ћелија (*Human Nasal Epithelial Cells*).

Развијањем нових технологија и њеним сталним усавршавањем масена спектрометрија постаје златни стандард за испитивање протеин-протеин интеракција у студијама људских обољења [1]. Сходно томе, протеин-протеин интеракције ће бити анализирани масеном спектрометријом са такозваним *shotgun* протеомским приступом. Детекција се примарно заснива на идентификацији и релативној квантификацији протеина користећи масену спектрометрију. Валидација добијених резултата биће потврђена техникама Вестерн блот или ортогоналном техником циљане масено спектрометријске анализе.

Нови протеин који специфично везује угљене хидрате, ЦБП (*Carbohydrate-binding proteins, CBP*), лектин савалицин (*eng. Savalithsin*), добио је назив по врсти златног корала који је пореклом из северосточног Атланског океана и Средоземног мора из кога је и изолован. Савалицин је нов биолошки кандидат за лек, протеин, за који је потврђено да снажно инхибира патогене вирусе са омотачем: ХИВ-1, ХСВ-1, ХСВ-2, Инфленца А и САРС-КоВ-2. Као такав он представља биолошки антивирусни лек широког спектра и испитивање његових биолошких

ефеката на људски организам, један је од кључних корака развоја овог лека у претклиничкој фази. Откривен је вишегодишњим истраживањем научника са Института за хемију, технологију и металургију и Хемијског факултета, Универзитета у Београду уз сарадњу са партнерима из реномираних научних установа из Словеније, Немачке, Хрватске и Црне Горе. Имајући у виду да је савалицин кандидат за биолошки лек као топикални антивирусни микробицид у раној фази развоја, тренутна истраживања и развој усмерени су на подизање нивоа технолошке спремности.

Важност и иновативност савалицина огледа се у механизму антивирусног дејства. За разлику од вакцина, малих органских молекула, пептиде и др. [2] савалицин се везује за гликане ХИВ гликопротеина и тиме омета интеракцију гликопротеина вирусног омотача и одговарајућег рецептора на површини ћелије. Овако се повећава ефикасност и селективност инхибиције вируса у односу на тренутно доступне лекове, који делују тек када вируси уђу у ћелију [3].

Тренутно, у литератури се помиње Грифицин (*eng. Griffithsin*), као кандидат за лек који се везује за гликане на површини различитих вирусних гликопротеина, попут ХИВ гликопротеина 120 и САРС-КоВ спајк гликопротеина. Грифицин се уз вишегодишње истраживање успешно показао и прошао прву фазу клиничких испитивања као гел и раствор за превенцију преношења ХИВ и сличних вируса са омотачем [4].

2. Основе хипотезе

Као што је наведено у уводном делу, савалицин показује јаку антивирусну, али и одређену антигуморску и антимикробну активност. Да би се разумела основа његове биолошке активности и безбедности за употребу, једно од питања је да ли у људској плазми и другим људским ћелијама има протеина који могу интераговати са савалицином и какве су биолошке последице интеракција.

Познато је да ЦБП поседују многе биолошке активности као што су биолошка сигнализација, антивирусна и антимикробна активност, имуномодулаторна активност, цитотоксична активност, митогена активност итд [5]. Један од најјачих протеинских отрова је управо лектин рицин. Обим и тип биолошке активности зависе од интеракције између ЦБП и специфичне глико компоненте гликопротеина укључених у биолошке процесе преноса сигнала. Уобичајена класификација ЦБП је према специфичности моносахарида (специфична за фукозу, специфичну за манозу, специфичну за галактозу, специфичну за Н-ацетилглукозамин итд.). Ипак, због конвергентне еволуције ЦБП-а, сваки ЦБП има јединствену гликанску специфичност. Зато је за разјашњавање биолошке активности појединачног ЦБП важно анализирати интеракције са појединачним протеинима, гликопротеинима и гликанима. Сходно томе, различити приступи детекције интеракција угљених хидрата и ЦБП биће истражени [6].

Желимо потврдити резултате досадашњих основних ин витро анализа токсичности који су показали да савалицин не показује нежељен биолошки одговор. Експерименти усмерени на утврђивање цитокинског профила основни су део преклиничких студија којима се проверава да ли примена кандидата за лек у терапеутским концентрацијама неће изазвати негативан цитокински одговор, односно активацију ПБМЦ и других ћелија у ћелијским културама, као ни цитотоксичне ефекте на ћелије, као што је то случај са грифицином [7].

3. Циљ истраживања и очекивани резултати

Протеомика заснована на масеној спектрометрији је метода избора за идентификацију протеин-протеин и протеин-гликан интеракција. Велики изазов је да се идентификују протеини који специфично интерагују са протеином мамаца у односу на протеине који су идентификовани као резултат примењене експерименталне процедуре. Да бисмо одговорили на овај изазов и пронашли најприкладнију врсту експерименталне припреме узорака за савалицин, истражићемо неколико експерименталних процедура: хроматографски приступ коришћењем имобилизованог савалицина на различитим чврстим хроматографским фазама, приступ обележавања савалицина у раствору, као и имунопреципитацијске методе са необележеним савалицином. Приступ динамичког унакрсног везивања би могао бити још један од приступа испитивања интеракције савалицина са протеинима [8]. За сваки од ових приступа примениће се одговарајуће контроле и тестираће се различите хроматографске стратегије.

Резултати добијени планираним експериментима даће нам одговор какав је интерактом новог антивирусног лектина са протеомом и гликомом крвне плазме и других ћелијских линија, како бисмо разумели биолошке ефекте које проузрокује. Проналажење потенцијално интерагујућих партнера са савалицином идентификовали бисмо биохемијске процесе и добили информације о њиховој улози. Претпоставка је да ће резултати добијени израдом ове докторске дисертације, која представља део не-ГМП претклиничких испитивања, трасирати пут у фазу претклиничких ГМП испитивања савалицина.

Квантификација цитокина помоћу масене спектрометрије је изазован задатак због јако мале количине цитокина и високог динамичког опсега протеина у матриксу плазме и присуства протеина медијума у ћелијским културама, као и због контаминације протеинима ћелија током раста и припреме узорка.

Један од циљева је да анализирамо одговор горе наведених ћелијских линија на третман савалицином. Да бисмо квантификовали секрецију цитокина, биће развијени циљани СРМ или ПРМ квантитативни масено спектрометријски есеји и валидирани комерцијалним елиза тестовима.

4. Методе истраживања

У изради докторске дисертације биће коришћене стандардне биоаналитичке методе као и следеће методе испитивања [9]:

- 1) Течна хроматографија са масеном спектрометријом, нЛЦ-ТИМС-ТОФ МС (*nano Liquid Chromatography - Trapped Ion Mobility Spectrometry - Time of Flight Mass Spectrometry*) – хроматографско раздвајање протеина и њихова идентификација користећи напредне софтвере за постпроцесирање добијених података
- 2) Методе припреме узорака за анализу на нЛЦ-ТИМС-ТОФ, попут дигестије у раствору, дигестије у гелу итд.
- 3) Ензимски имуносорбент есеји, ЕЛИСА (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) – испитивање активности лектина везивањем за одређене имобилизирајуће гликопротеине
- 4) Цитокински есеји из ПБМЦ фракције користећи ЛЦ-МС или ЕЛИСА антитета тестове

- 5) Вертикална електрофореза – квалитативна идентификација протеина, одређивање чистоће протеина, припрема узорака за ЛЦ-МС
- 6) Капиларна електрофореза – одређивање гликанског профила
- 7) Вестерн блот техника – детекција протеина у различитим узорцима, као валидационог метода спрам течне хроматографије са месеном спектрометријом
- 8) Флуоресцентна микроскопија – праћења везивања савалицина са протеинима из ћелијских култура
- 9) Основни лабораторијски експерименти попут: ћелијске културе, гајење ћелија, цитотоксичности, вијабилност ћелија, бројање ћелија итд.
- 10) Проточна цитометрија (*Flow Cytometry*) у циљу одређивања пролиферације ћелија и испитивања митогеног ефекта
- 11) Анализа транскриптома.
- 12) Афинитативна хроматографија – изоловање и пречишћавање лектина из корала
- 13) Имунопреципитативне хроматографије и протоколи за обележавање, везивање и елуцију протеина од интереса
- 14) Нано спектрофотометрија.
- 15) Имуноесеји са микрочипом – одређивање концентрације протеина и испитивање активности лектина везивањем за одређене гликопротеине и гликане
- 16) Антивирусна активност савалицина
- 17) Статистичке анализе података

Додатне анализе које би се накнадно утврдиле као неопходне биле би урађене у сарадњи са иностраним и домаћим партнерима.

5. Литература

- [1] A. L. Richards, M. Eckhardt, and N. J. Krogan, “Mass spectrometry-based protein–protein interaction networks for the study of human diseases,” *Mol. Syst. Biol.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–18, 2021, doi: 10.15252/msb.20188792.
- [2] V. Marković, A. Szczepańska, and Ł. Berlicki, “Antiviral Protein-Protein Interaction Inhibitors,” *J. Med. Chem.*, vol. 67, no. 5, pp. 3205–3231, 2024, doi: 10.1021/acs.jmedchem.3c01543.
- [3] J. P. Moore and M. Stevenson, “New targets for inhibitors of HIV-1 replication,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 1, no. 1, pp. 40–49, 2000, doi: 10.1038/35036060.
- [4] G. Li and E. De Clercq, “Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV),” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 19, no. 3, pp. 149–150, 2020, doi: 10.1038/d41573-020-00016-0.
- [5] S. Zhang, K. Y. Chen, and X. Zou, “Carbohydrate-protein interactions: advances and challenges,” *Commun. Inf. Syst.*, vol. 21, no. 1, pp. 147–163, 2021, doi: 10.4310/cis.2021.v21.n1.a7.
- [6] K. Yamamoto and N. Kawasaki, *Detection of weak-binding sugar activity using membrane-based carbohydrates*, 1st ed., vol. 478, no. C. Elsevier Inc., 2010.
- [7] B. Hoorelbeke, J. Xue, P. J. LiWang, and J. Balzarini, “Role of the Carbohydrate-Binding Sites of Griffithsin in the Prevention of DC-SIGN-Mediated Capture and Transmission of HIV-1,” *PLoS One*, vol. 8, no. 5, pp. 1–10, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0064132.
- [8] S. Lenz, L. R. Sinn, F. J. O’Reilly, L. Fischer, F. Wegner, and J. Rappsilber, “Reliable identification of protein-protein interactions by crosslinking mass spectrometry,” *Nat. Commun.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–11, 2021, doi: 10.1038/s41467-021-23666-z.

- [9] J. C. Kouokam *et al.*, “Investigation of Griffithsin’s interactions with human cells confirms its outstanding safety and efficacy profile as a microbicide candidate,” *PLoS One*, vol. 6, no. 8, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0022635.