

## **НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА**

На V редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 07.03.2022. године, на основу молбе ментора др Александре Николић, научног саветника Универзитета у Београду - Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, и др Катарине Зељић, ванредног професора Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Јоване С. Деспотовић**, истраживача-сарадника Универзитета у Београду - Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, под насловом: „Улога микроРНК укључених у регулацију TGF $\beta$  сигналног пута у метастатском колоректалном карциному - функционална анализа и одговор на терапију“, у саставу: др Драгица Радојковић, научни саветник, Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, др Сандра Драгичевић, научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, и др Марија Савић Веселиновић, доцент, Универзитет у Београду - Биолошки факултет.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

### **ИЗВЕШТАЈ**

#### **Општи подаци о докторској дисертацији**

Докторска дисертација Јоване С. Деспотовић је оригинално научно истраживање које је урађено у Лабораторији за молекуларну биологију Универзитета у Београду - Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, и у Групи за експерименталну патологију тумора, Института за патологију, Универзитетске болнице Фридрих-Александер, Универзитета Ерланген-Нирнберг којом руководи проф. др Регине Шнајдер- Шток.

Докторска дисертација садржи: насловну страну на српском и енглеском језику, податке о менторима и члановима комисије, страницу са информацијама о месту израде докторске дисертације, захвалницу, резиме на српском и енглеском језику са кључним речима, листу скраћеница, садржај, текст рада по поглављима, литературу, биографију и три изјаве. Текст дисертације (94 стране) садржи следећа поглавља: Увод (странице 1-16), Циљеви рада (страница 17), Материјал и методе (странице 18-34), Резултати (странице 35-64),

Дискусија (странице 65-76), Закључци (странице 77-78). Литература, у којој је цитирано 294 извора, је излистана на странама 79-94. Након биографије кандидаткиње, приложене су следеће изјаве: Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу. У дисертацији се налазе 33 слике и 10 табела.

## Анализа докторске дисертације

Поглавље **Увод** је подељено на четири тематске целине, и у њему је дат сажет приказ досадашњих сазнања из литературе која су непосредно везана за предмет докторске дисертације. У оквиру прве целине укратко је представљен процес колоректалне карциногенезе (КРК), док је друга тематска целина посвећена метастатском колоректалном карциному (мКРК), односно метастазама у јетри пореклом од колоректалног карцинома (МЈ-КРК). У оквиру друге целине, најпре је описана епидемиологија мКРК, а затим је дат детаљан преглед актуелних опција лечења пацијената са МЈ-КРК у виду ресекције јетре, системске хемиотерапије и доступних биолошких агенаса током прве линије лечења. У трећој тематској целини је обрађен TGF $\beta$  сигнални пут, односно дат је детаљан преглед главних учесника канонског TGF $\beta$  сигналног пута, и аналитички су представљени објављени резултати истраживања везани за улогу TGF $\beta$  сигналног пута у туморима, са посебним освртом на КРК. Такође, у једном пасусу је објашњена повезаност TGF $\beta$  сигналног пута са одговором на хемиотерапију. Четврта целина је посвећена микроРНК молекулима (миРНК). У овој тематској целини је приказан детаљан механизам процеса биојенезе миРНК, њихових познатих улога у туморима, са посебним освртом на КРК и МЈ-КРК, а посебна пажња је посвећена употреби миРНК молекула као предиктивних и прогностичких биомаркера. Најзад, с обзиром да је познато да између TGF $\beta$  сигналног пута и миРНК машинерије постоји одређена комуникација, дат је преглед повезаности TGF $\beta$  сигналног пута и миРНК молекула на различитим сигналним нивоима.

Имајући у виду повезаност TGF $\beta$  сигналног пута са молекулима миРНК и њихову значајну улогу у туморигенези и одговору на терапију, постављена је хипотеза да би молекули миРНК укључени у регулацију већег броја чланова TGF $\beta$  сигналног пута, експримирани у ткиву или као слободно циркулишући молекули, могли бити добри кандидати за предиктивне биомаркере одговора на хемиотерапију, али и потенцијални прогностички биомаркери за појаву рецидива и преживљавање пацијената са МЈ-КРК. Стога су у поглављу **Циљеви** дефинисани следећи циљеви рада:

1. Испитивање одговора одабраних миРНК које учествују у регулацији TGF $\beta$  сигналног пута на стандардну хемиотерапију за мКРК *in vitro*;

2. Испитивање транслационог потенцијала одабране миРНК као предиктивног и прогностичког биомаркера за пацијенте са МЈ-КРК у оквиру проспективне клиничке студије;
3. Функционална карактеризација одабране миРНК у процесима релевантним за колоректалну карциногенезу и одговору на терапију *in vitro* и *in vivo*.

Поглавље **Материјал и методе** је подељено је на 17 потпоглавља, написано је прегледно и садржи све информације неопходне за репродуковање експерименталних процедура. Најпре је описан поступак *in silico* анализе 10 гена који учествују у TGF $\beta$  сигналном путу, а затим су приказани услови гајења и третмана коришћених ћелијских линија - хуманих примарних аденокарцинома колона и ректума (HCT116, DLD1, SW480, SW837), метастатског аденокарцинома колона (SW620), немалигног епитела колона (HCEC и HCEC-1CT) и мишјег метастатског меланома (4C11+). Затим следе детаљне процедуре тестова у којима су ћелије третиране хемотерапеутским лековима и у којим се функционално анализира ћелијска вијабилност, ћелијска смрт, ћелијски циклус, миграција, васкуларна мимикрија, са посебним освртом на *in vivo* есеј хориоалантоисне мембране ембриона пилета који је коришћен за процену раста тумора. Затим следе методе које се односе на припрему биолошког материјала пореклом од ћелијских линија и пацијената са МЈ-КРК и обухвата изолацију нуклеинских киселина (иРНК и миРНК), и квантификацију експресије гена на нивоу иРНК (*PAI-1*, *CDH1* и *VIM* гена) и миРНК квантитативном реакцијом ланчане полимеразе у реалном времену. Последње потпоглавље се односи на статистичку обраду података.

У поглављу **Резултати**, уобличеном у 4 потпоглавља, представљени су резултати докторске дисертације, документовани сликама и табелама.

У првом потпоглављу су приказани резултати *in silico* анализе којом је идентификовано 316 миРНК које би могле да регулишу TGF $\beta$  сигнални пут, а одабрано је три за анализу у експерименталним условима: hsa-miR-17-5p, hsa-miR-93-5p (регулишу по 5 чланова сигналног пута) и hsa-miR-21-5p (регулише 4 члана сигналног пута).

У другом потпоглављу су приказани одговори одабраних миРНК и TGF $\beta$  сигналног пута на терапију која се користи за лечење мКРК, у ћелијским линијама метастатског карцинома колона (SW620) и/или немалигног епитела колона. Класични хемотерапеутски лекови примењени појединачно или у комбинацији (FOX и FIRI) су имали највећег утицаја на експресију miR-21-5p, док је најстабилнији одговор показала hsa-miR-93-5p те је само она коришћена у наредним експериментима. Невезано за промене у експресији анализираних миРНК, комбиновани хемотерапеутици су индуковали повећану експресију *PAI-1* гена што указује на активацију TGF $\beta$  сигналног пута. Примењени

хемиотерапеутици су показали позитиван ефекат смањујући вијабилност ћелија канцера и индукујући особине карактеристичне за епителне ћелије (мерених преко експресије гена *EMT*). Биолошки агенс бевацизумаб није показао ефекат на експресију *hsa-miR-93-5p* и на вијабилност ћелија, изузев у случају коришћења највише концентрације у комбинацији са комбинованим хемотерапеутским (FOX) третманом.

У трећем потпоглављу су приказани резултати анализе експресије *hsa-miR-93-5p* код 35 испитаника са метастазама јетре пореклом од колоректалног карцинома (MJ-KPK). Показано је да је експресија *hsa-miR-93-5p* већа у метастатском ткиву у поређењу са околним нетуморским ткивом јетре, да нема корелације са његовом експресијом у крвном серуму, али да постоји умерена негативна корелација са туморским маркером СЕА у серуму. Такође, показано је да неоадјуватна хемиотерапија не утиче на експресију у метастатском ткиву јетре и у серуму, да ниво експресије *hsa-miR-93-5p* није повезан са терапијским одговором испитаника као ни да ниво експресије овог гена не утиче на једногодишње преживљавање код пацијента без рецидива. Није уочена повезаност између нивоа експресије *hsa-miR-93-5p* са демографским и клиничко-патолошким карактеристикама испитаника са метастазама јетре пореклом од колоректалног карцинома. Једино је уочена веза између високе експресије анализираних миРНК са појавом раног рецидива болести.

У циљу функционалне карактеризације *hsa-miR-93-5p* у последњем потпоглављу су представљени резултати анализе експресије изабране миРНК у већем броју ћелијских линија пореклом од колоректалних карцинома и неизмењеним ћелијама колоне, на основу којих су изабране две линије – примарног и метастатског карцинома, за даље експерименте: НСТ116 у чијим ћелијама је уочена највећа експресија (и 8 пута већа осетљивост на 5-FU), односно SW620 са најмањом експресијом. У експериментима у којима је испитивана улога ове миРНК у хеморезистенцији на 5-FU није уочена разлика у експресији између оригиналних и 5-FU резистентних SW620 ћелија, а добијена разлика у експресији само код плутајућих ћелија НСТ116 (виша код третираних са 5-FU) су потврдили непостојање улоге у резистенцији, али указују на улогу у процесима одлепљивања ћелија од подлоге и утицаја на ћелијску смрт. Није уочен утицај нивоа експресије *hsa-miR-93-5p* на вијабилност ћелија, да се одупру ћелијској смрти услед немогућности да се залепе за подлогу, на миграцију ћелија и на раст тумора анализираних линија, и на дистрибуцију фаза ћелијског циклуса код SW620 ћелија. Уочен је утицај повишене експресије на вијабилност НСТ116 ћелија при котретману са 5-FU (протективни ефекат) и на стимулацију *in vitro* формирања туба код ћелија SW620 и НСТ116.

Поглавље Дискусија је подељено на 4 потпоглавља, према организацији добијених експерименталних података који су представљени у Резултатима. У овом делу дисертације се разматрају добијени резултати у поређењу са познатим литературним подацима у вези са колоректалним карциномом, али и са другим типовима карцинома у којима је анализирана

експресија истих миРНК молекула. Такође, истиче се значај сваког експерименталног дела ове докторске дисертације који доприносе тренутним научним сазнањима.

Након дискусије кандидаткиња је у поглављу Закључци сумирала добијене резултате и закључке изведене из њих за сваку експерименталну процедуру на основу којих је на крају поглавља указала на комплексност мрежа интеракције миРНК са члановима TGF $\beta$  сигналног пута. Анализирани миРНК имају другачији ниво експресије у зависности од врсте стандардних хемотерапеутика који се користе у лечењу метастатских колоректалних карцинома, те да терапија утиче на активацију TGF $\beta$  сигналног пута *in vitro* преко експресије миРНК које регулишу његове чланове. Проспективна клиничка студија је показала да експресија изабране миРНК hsa-miR-93-5p у серуму има потенцијал да се користи као неинванзивни прогностички биомаркер за појаву раног рецидива болести код пацијената. Функционална карактеризација је показала да повишена експресија hsa-miR-93-5p може утицати на ангиогенезу колоректалног тумора, али да не утиче на вијабилност, ћелијски циклус резистенцију на 5-FU, аноиксис и миграцију *in vitro*, као ни на раст тумора *in vivo*.

У поглављу **Литература** су на прегледан начин приказана 294 цитирана рада који су на адекватан начин коришћени при писању дисертације.

## **Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације**

### Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Despotovic J**, Dragicevic S, Nikolic A. Effects of Chemotherapy for Metastatic Colorectal Cancer on the TGF- $\beta$  Signaling and Related miRNAs hsa-miR-17-5p, hsa-miR-21-5p and hsa-miR-93-5p. *Cell Biochem Biophys*. 2021; 79(4):757-767. doi:10.1007/s12013-021-00980-3. (M23, IF<sub>2020</sub>=2.194, oblast: *Biochemistry & Molecular Biology*)

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33826035/>

2. **Despotović J**, Bogdanović A, Dragičević S, Galun D, Krivokapić Z, Nikolić A. Prognostic potential of circulating miR-93-5p in patients with colorectal cancer liver metastases. *Neoplasma*. 2022; Online ahead of print. doi: 10.4149/neo\_2021\_210603N749 (M23, IF<sub>2020</sub>=2.575, oblast: *Oncology*)

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35037761/>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Despotović J**, Urošević J, Gomis R.R, Nikolić A. Altered miR-17-5p expression pattern in response to chemotherapeutic drugs for metastatic colorectal cancer. 18<sup>th</sup> Young Scientists' Forum and 43<sup>rd</sup> FEBS Congress. Prague, Czech Republic, 2018. (M34)
2. **Despotović J**, Urošević J, Gomis R.R, Nikolić A. Changes in miR-17-5p and -93-5p gene expression following exposure to metastatic colorectal cancer chemotherapeutic drugs. 2<sup>nd</sup> European PhD & Postdoc Symposium, Copenhagen, Denmark, 2018. (M34)
3. **Despotovic J**, Nikolic A. Metastatic colorectal cancer chemotherapeutic drugs alter the expression of TGFβ signaling -related miR-17-5p, miR-21-5p and miR-93-5p in vitro. European Society for Human Genetics Conference 2019, Gothenburg, Sweden, 2019. (M34)
4. **Despotović J**, Bogdanović A, Dragičević S, Galun D, Krivokapić Z, Nikolić A. Prognostic potential of circulating miR-93-5p in patients with colorectal liver metastases. EACR 2021 Virtual Congress - Innovative Cancer Science: Better Outcomes Through Research. Virtual event, 2021. (M34)

Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **Despotović J**, Krivokapić Z, Nikolić A. MiR-93-5p expression in response to the systemic, targeted, and combinational therapy for metastatic colorectal cancer and therapy resistance: in vitro analysis. 5<sup>th</sup> Congress of the Serbian Association for Cancer Research - Translational potential of cancer research in Serbia, Belgrade, Serbia, 2021. (M64)

## Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата Јоване С. Деспотовић број индекса: М3003/2015 послата је дана **27.01.2022. године** на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности је достављен ментору **14.02.2022. године**.

На основу извршене анализе од стране Универзитетске библиотеке Светозар Марковић коришћењем програма iThenticate, утврђен је проценат подударности од 11%. Увидом у Извештај утврђено је подударање са 33 сумарна извора. Детаљном анализом добијеног Извештаја и поклапања по сегментима, уочено је да је подударање са једним извором било 3%, једним извором - 2%, четири извора -1% и у свим преосталим случајевима мање од 1%. Поклапања су превасходно потицала од уобичајено коришћених изјава у оквиру докторске дисертације (изјава о ауторству, истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и коришћењу), присутних термина на енглеском језику, општих места и података и уобичајених фраза карактеристичних за тематику докторске дисертације.

Када се све изнето узме у обзир, извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата Јоване С. Деспотовић, под насловом ”Улога микроРНК укључених у регулацију TGF $\beta$  сигналног пута у метастатском колоректалном карциному – функционална анализа и одговор на терапију“, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

## Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација Јоване С. Деспотовић, истраживача-сарадника Универзитета у Београду - Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство представља оригиналан научно-истраживачки рад који значајно доприноси разумевању молекуларно-генетичке основе колоректалног карцинома. Кандидаткиња је постављене циљеве ове дисертације реализовала адекватним биоинформатичким и великим бројем експерименталних анализа којима је испитивала улогу миРНК које учествују у регулацији TGF $\beta$  сигналног пута, првенствено у метастатском ректалном карциному у јетри. Значајност ове студије огледа се у анализи експресије миРНК коришћењем и различитих тренутно доступних терапеутика на које пацијенти могу развити резистентност, те осим разумевања молекуларне основе карциногенезе ова теза доприноси расветљавању прогресије која је прилично учестала за ово обољење. Резултати ове дисертације су објављени у два научна рада (категорије M23) у којима је Јована Деспотовић први аутор. Адекватно представљени и критички протумачени добијени резултати овог научног рада показују зрелост кандидаткиње и њену способност за успешну реализацију научних истраживања.

На основу наведеног именована Комисија предлаже Наставно-Научном Већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену докторске дисертације кандидаткиње **Јоване С. Деспотовић** под називом „Улога микроРНК укључених у регулацију TGF $\beta$  сигналног пута у метастатском колоректалном карциному - функционална анализа и одговор на терапију“ и тиме омогући кандидаткињи јавну одбрану дисертације.

У Београду, 09.03.2022. године

### КОМИСИЈА:

---

др Драгица Радојковић, научни саветник  
Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство

---

др Сандра Драгичевић, научни сарадник  
Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство

---

др Марија Савић Веселиновић, доцент  
Универзитет у Београду - Биолошки факултет