

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

На VII редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду – Биолошког факултета, одржаној 13. 5. 2024. године, на основу молбе ментора, др Ивана Јовановића, вишег научног сарадника, Универзитета у Београду, Института за нуклеарне науке “Винча” – Институт од националног значаја за Републику Србију и проф. др Катарине Зељић, ванредног професора, Универзитета у Београду – Биолошки факултет, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Кристине М. Митровић**, истраживача сарадника, Универзитета у Београду, Института за нуклеарне науке “Винча” – Институт од националног значаја за Републику Србију под насловом: **„Идентификација микро РНК у регионима генома са ретким структурним варијантама као потенцијалних генетичких узрочника за настанак урођених анормалија бубрега и уринарног тракта човека“**, у саставу: др Александра Станковић, научни саветник, Универзитета у Београду, Института за нуклеарне науке „Винча“ – Институт од националног значаја за Републику Србију; др Маја Живковић, научни саветник, Универзитета у Београду, Института за нуклеарне науке „Винча“ – Институт од националног значаја за Републику Србију; др Марија Савић Веселиновић, ванредни професор Универзитета у Београду на Биолошком факултету.

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

### **ИЗВЕШТАЈ**

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

Веће научних области природних наука је на седници одржаној 24. 6. 2021. године донело одлуку да даје сагласност на предлог теме докторске дисертације Кристине М. Митровић под насловом: „Идентификација микро РНК у регионима генома са ретким структурним варијантама као потенцијалних генетичких узрочника за настанак урођених анормалија бубрега и уринарног тракта човека“.

Експериментални део докторске дисертације Кристине М. Митровић урађен је у Лабораторији за радиобиологију и молекуларну генетику Института за нуклеарне науке „Винча“ – Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду.

Докторска дисертација је написана на укупно 88 страна. Теза је уређена према упутству за техничко обликовање докторских дисертација које је прописано на Универзитету у Београду. У оквиру тезе се налазе сви неопходни делови: насловна страна на српском и енглеском језику, подаци о менторима и одређеној комисији за преглед и

оцену докторске дисертације (1 страна), сажетак на српском и енглеском језику са кључним речима (2 стране), листа скраћеница (3 стране), садржај (2 стране), увод (12 страна: стр. 1-12), циљеве рада (1 страна: стр. 13), материјал и методе (13 страна: стр. 14-26), резултате (26 страна: стр. 27-52), дискусија (12 страна: стр. 53-64), закључци (1 страна: стр. 65), литература (16 страна: стр. 66-81), биографија аутора (1 страна), изјава о ауторству (1 страна), изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада (1 страна) и изјава о коришћењу (2 стране). У оквиру докторске дисертације се налази 19 слика. Преузете и модификоване слике су у уводу правилно цитиране према основном извору за који је рађена модификација. Дисертација садржи укупно 17 табела. У попису литературе се налази 282 цитирана литературна извора. Све референце у попису су дате у униформном цитатном стилу.

### **Анализа докторске дисертације**

Кандидаткиња Кристина М. Митровић се у докторској дисертацији бавила идентификацијом и функционалном интерпретацијом микро РНК које су локализоване у регионима генома са ретким структурним варијантама (енгл. *Copy Number Variation - CNV*) који су асоцирани са урођеним аномалијама бубрега и уринарног тракта човека (енгл. *Congenital anomalies of the kidney and urinary tract - CAKUT*).

Поглавље **Увод** (стр. 1-12) је организовано у 8 одвојених целина које су од кључног значаја за научну тематику докторске дисертације. У првом делу *Молекуларна основа развића бубрега и уринарног система* (стр. 1-2), кандидаткиња даје најважније информације о кључним молекуларним факторима и њиховим интеракцијама које имају улогу у ембрионалном развићу бубрега и уринарног тракта. Посебна пажња је посвећена пројектима попут GUDMAP и EJP RD који се фокусирају на разумевање генетичких механизма укључених у ембрионални развој бубрега и уринарног тракта и развој САКУТ-а. У оквиру друге целине *Урођене аномалије бубрега и уринарног тракта* (стр. 2-4), кандидаткиња даје информације о епидемиологији САКУТ-а и клиничким проблемима губитка функције бубрега са којима се сусрећу пацијенти са САКУТ-ом. Под посебним поднасловом кандидаткиња је на прегледан и систематичан начин описала клиничке карактеристике САКУТ-а. У оквиру треће целине *Генетичка основа настанка САКУТ-а* (стр. 5), даје осврт на генетичке факторе који доводе до настанка САКУТ-а. У оквиру четврте, *Варијације у броју копија* (стр. 5-7) и пете целине *CNV региони који су асоцирани са САКУТ-ом* (стр. 8), дате су опште информације о варијацијама у броју копија, као и механизмима њиховог настанка. Кандидаткиња је укратко приказала и литературне податке о асоцијацији ових региона са настанком САКУТ-а и истакла значај проучавања не само протеин кодирајућих гена који су локализовани у овим регионима, већ и гена за некодирајуће транскрипте, попут миРНК. У шестој целини уводног дела *Биогенеза и функција миРНК* (стр. 8-10) дате су информације о биогенези и функцији миРНК. У оквиру седме целине уводног дела *Манипулација нивоа миРНК коришћењем миРНК*

*мимика* (стр. 11) истакнута је кључна улога физиолошких промена у експресији миРНК, као и њихова улога у патолошким процесима и болестима, са нагласком на терапијски потенцијал миРНК кроз манипулацију њиховог нивоа, док је последњи део увода *МикроРНК у САКУТ-у* (стр. 11-12) посвећен истраживањима миРНК у САКУТ-у. Истакнута је важност идентификовања нових миРНК као потенцијалних молекула за предикцију, дијагностику и лечење САКУТ-а, што може допринети превенцији губитка функције бубрега код деце и одраслих са САКУТ-ом.

У уводу се налазе сликовни прикази у виду 3 слике. Увод је јасно и концизно обликован и садржи све неопходне информације за потпуно разумевање изучаване проблематике. Кандидаткиња прецизно издваја најважније литературне податке од значаја за изучавану проблематику, које правилно цитира уједначеним стилем, тако да се стиче јасан утисак важности проучавања микро РНК у регионима генома са ретким структурним варијантама као потенцијалних генетичких узрочника за настанак урођених анормалија бубрега и уринарног тракта човека.

**Циљеви** докторске дисертације су јасно и таксативно наведени и приказујемо их у целисти (преузето из докторске дисертације):

1. Генерисање базе свих описаних ретких CNV региона идентификованих код пацијента са САКУТ-ом, коришћењем литературе и јавно доступних база података.

2. Дескриптивна карактеризација CNV региона и мапираних миРНК кроз протоколе за анализу података великог обима.

3. Биоинформатичка карактеризација миРНК и одабир миРНК које потенцијално регулишу кључне процесе у развићу бубрежно-уринарног система.

4. Утврђивање нивоа одабраних миРНК кандидата након промене дозе миРНК гена *in vitro* у ћелијским линијама код којих је вештачки генерисан CNV регион асоциран са настанком САКУТ-а.

5. Карактеризација функционалног ефекта дозе гена за миРНК на ниво транскрипта гена које одабране миРНК регулишу, а који учествују у кључним биолошким процесима одговорним за настанак урођених анормалија бубрега и уринарног тракта.

6. Валидација патогеног ефекта измењеног нивоа одабраних миРНК на промену експресије гена које регулишу кроз поновно успостављање нивоа миРНК трансфекцијом миРНК *in vitro*.

Поглавље **Материјал и методе** је подељено у 13 одвојених целина, где се налази детаљан опис експерименталних метода молекуларне генетике коришћених у реализацији наведених циљева. Кандидаткиња је дала детаљан приказ поступка прикупљања података о ретким CNV регионима који су асоцирани са САКУТ-ом, анализе оптерећења гена који кодирају миРНК ретким CNV регионима који су асоцирани са САКУТ-ом, мапирања и идентификације миРНК које су најчешће локализоване у ретким CNV регионима који су повезани са САКУТ-ом, биоинформатичке анализе миРНК и миРНК фамилија које су најчешће локализоване у ретким CNV регионима који су асоцирани са САКУТ-ом. Наведене су коришћене ћелијске линије, а детаљно је описан и процес гајења и

пасажирања ћелија, као и процес селекције миРНК кандидата и њихових циљних гена. Описани су протоколи и методе за секвенцирање нове генерације (engl. *Next-Generation Sequencing* - NGS) и пролазну трансфекцију ћелија. Након тога су описане методе за екстракцију укупне РНК из култивисаних ћелија, синтезу комплементарне ДНК реакцијом реверзне транскрипције и релативну квантификацију експресије миРНК и иРНК циљних гена. У последњем поглављу, *Анализа релативних нивоа миРНК и иРНК*, наведен је тест који је коришћен при обради добијених резултата. Материјал и методе су детаљно наведени.

**Резултати** су у оквиру докторске дисертације уобличени у 5 целина. Резултати су приказани у табелама и на сликама и сви прикази су пропраћени одговарајућим објашњењима и позивима на табелу и/или слику у тексту докторске дисертације. Кандидаткиња је нагласила које табеле и/или сликовни прикази су у идентичном формату приказани на енглеском језику у публикацијама које су проистекле из ове докторске дисертације.

Први део (стр. 27-29), обухвата резултате где је процењено оптерећење гена који кодирају миРНК, у ретким CNV регионима који су асоцирани са САКУТ-ом и показано је да се гени који кодирају миРНК и CNV региони који су асоцирани са САКУТ-ом не преклапају насумично већ постоји оптерећење гена, тј. гени који кодирају миРНК су обогаћени у CNV регионима који су асоцирани са САКУТ-ом. Такође је показано да одређене хромозоме карактерише релативно велики или мали број гена који кодирају миРНК, а који су локализовани у CNV регионима који су асоцирани са САКУТ-ом, у односу на линеарну зависност. Такви хромозоми су били хромозоми 16, 20 и 21.

У другом делу резултата (стр. 29-32), приказане су идентификоване миРНК и фамилије миРНК које су најчешће локализоване у CNV регионима који су асоцирани са САКУТ-ом. Поред тога, анализа фамилија миРНК које су најчешће локализоване у ретким CNV регионима код пацијената са САКУТ-ом је указала на обогаћење фамилије miR-548.

У трећем делу (стр. 32-35), приказани су резултати које се односе на биоинформатичку анализу миРНК које су најчешће локализоване у ретким CNV регионима који су асоцирани са САКУТ-ом. Анализа мреже миРНК, које су најчешће локализоване у ретким CNV регионима који су асоцирани са САКУТ-ом, показала је доминантну регулацију две миРНК, hsa-miR-484 и hsa-miR-185-5p. Поред тога, генерисана је мрежа интеракција миРНК и циљних гена чланова фамилије miR-548, а анализа централности је указала на *GPC4* као ген који је регулисан са највећим бројем миРНК из фамилије miR-548. Такође су идентификовани молекуларни путеви обогаћени у циљним генима миРНК које су најчешће локализоване у ретким CNV регионима који су асоцирани са САКУТ -ом и чланова фамилије miR-548.

У четвртом делу резултата (стр. 36-37), употребом NGS технологије показано је да је број миРНК са значајном разликом у експресији између испитиваних линија (НЕК293 WT, НЕК293 MIR484 KO<sup>het</sup> и НЕК293 MIR185 KO<sup>hom</sup>) веома мали у односу на укупан број идентификованих миРНК.

Последњи део (стр. 38-52), је подељен у два потпоглавља. Прво потпоглавље приказује резултате функционалне студије која је урађена како би се потврдио ефекат ретког CNV региона на експресију миРНК кандидата (*hsa-miR-484* и *hsa-miR-185-5p*), а последично и на нивое њихових циљних гена. Идентификован је значајно нижи ниво *hsa-miR-484* у НЕК293 ћелијској линији са хетерозиготном делецијом гена *MIR484* (НЕК293 *MIR484 KO<sup>het</sup>*) у поређењу са НЕК293 WT ћелијском линијом, а експресија *hsa-miR-185-5p* није детектована у НЕК293 ћелијској линији са хомозиготном делецијом гена *MIR185* (НЕК293 *MIR185 KO<sup>hom</sup>*) у поређењу са НЕК293 WT ћелијском линијом где је експресија ове миРНК идентификована. Испитивањем нивоа иРНК циљних гена показано је да је промена нивоа *hsa-miR-484* услед хетерозиготне делеције повезана са променом у експресији *MDM2*, *APAF1* и *NOTCH3*, док је промена нивоа *hsa-miR-185-5p* услед хомозиготне делеције повезана са променом у експресији *MDM2* и *RHOA*.

Друго потпоглавље обухвата резултате који се односе на експресију циљних гена након третмана НЕК293 WT, НЕК293 *MIR484 KO<sup>het</sup>* и НЕК293 *MIR185 KO<sup>hom</sup>* ћелијских линија одговарајућим миРНК мимикама. Реституција нивоа *hsa-miR-484* у НЕК293 *MIR484 KO<sup>het</sup>* ћелијској линији је повезана са променом у експресији *NOTCH3* у поређењу са ћелијама које су третиране NT миРНК контролом (енгл. *Non-targeting miRNA mimic*). Реституција нивоа *hsa-miR-185-5p* у НЕК293 *MIR185 KO<sup>hom</sup>* ћелијској линији је повезана са променом у експресији *ATF6* и *RHOA* у поређењу са ћелијама које су третиране NT миРНК контролом. Третман НЕК293 WT ћелија са *hsa-miR-484* и *hsa-miR-185-5p* мимикама је повезан са променом у експресији *MDM2*, *NOTCH3*, *FIS1* и *ATF6* у поређењу са ћелијама које су третиране NT миРНК контролом.

**Дискусија** је организована у пет јасно одвојених целина које су тако организоване на основу постављених и реализованих циљева и добијених резултата у оквиру докторске дисертације. У првој целини (стр. 53-54) је дискутовано о оптерећењу гена који кодирају миРНК, у ретким CNV регионима који су асоцирани са САКУТ-ом. Друга целина (стр. 54-55) се односи на дискусију везану за идентификацију и биоинформатичку интерпретацију миРНК и миРНК фамилија које су најчешће локализоване у CNV регионима који су асоцирани са САКУТ-ом. Трећа целина (стр. 56) се односи на дискусију везану за анализу миРНОма све три ћелијске линије (НЕК293 WT, НЕК293 *MIR484 KO<sup>het</sup>* и НЕК293 *MIR185 KO<sup>hom</sup>*), која је урађена како би се утврдило евентуално постојање разлике у нивоу највише експримираних миРНК. Четврта целина (стр. 56-61) се односи на дискусију везану за функционалну студију где је испитано да ли CNV региони утичу на промену нивоа експресије миРНК кандидата *in vitro* и последично на нивое експресије њихових циљних гена. У последњој, петој целини (стр. 61-64) се дискутовало о ефекту реституције миРНК кандидата у ћелијске линије са уведеном хомозиготном или хетерозиготном делецијом гена за ове миРНК, као и о третману НЕК293 WT са миРНК мимикама, на експресију циљних гена.

Дискусија је детаљна и поред адекватних објашњења кандидаткиња даје и критички осврт на сопствене резултате изнете у докторској дисертацији у светлу других

налаза из литературе. Кандидаткиња је наводила савремене научне радове при вођењу дискусије. Јасно је указала и на постојање извесних ограничења своје студије, али и изнела предлоге за будућа истраживања у изучаваном научном пољу.

На основу резултата добијених приликом извођења експеримената у оквиру докторске дисертације, кандидаткиња је извела закључке који су представљени јасно и таксативно. **Закључци** ове докторске дисертације су били следећи (преузето у целости из докторске дисертације):

1. Применом алгоритма који је представљен у овој докторској дисертацији могу се успешно идентификовати и функционално интерпретирати гени за миРНК који су најчешће локализовани у ретким CNV регионима који су асоцирани са САКУТ-ом.

2. Генерисани модели ћелијских линија са нокаутом за гене миРНК могу се успешно применити у студијама, са циљем изучавања ефекта CNV региона на експресију гена за миРНК који су локализовани у њима, као и последичне промене у експресији гена који су циљни гени нокаутираних миРНК.

3. Уведена хетерозиготна делеција гена за *MIR484* у НЕК293 ћелијској линији има ефекат на експресију *hsa-miR-484* која је значајно нижа у поређењу са НЕК293 WT ћелијском линијом. Уведена хомозиготна делеција гена за *MIR185* у НЕК293 ћелијској линији има ефекат на експресију *hsa-miR-185-5p* која није детектована овој ћелијској линији у поређењу са НЕК293 WT ћелијском линијом где је експресија ове миРНК идентификована. На основу ових резултата закључујемо да CNV региони имају функционални ефекат на експресију миРНК гена који су у њима локализовани.

4. Промена нивоа *hsa-miR-484* услед хетерозиготне делеције је повезана са променом у експресији *MDM2*, *APAF1* и *NOTCH3*, док је промена нивоа *hsa-miR-185-5p* услед хомозиготне делеције повезана са променом у експресији *MDM2* и *RHOA*. Ове промене потврђују значај миРНК и утицај делеције гена за ове миРНК на регулацију циљних гена, на основу чега закључујемо да CNV региони имају ефекат не само на експресију миРНК гена који су у њима локализовани, већ и на експресију њихових циљних гена.

5. Реституцијом нивоа *hsa-miR-484* и *hsa-miR-185-5p* у ћелијским линијама са уведеном хомозиготном или хетерозиготном делецијом гена за ове миРНК, потврђен је потенцијал ублажавања ефекта ретког CNV региона на експресију циљних гена миРНК које су локализоване у овим регионима, што нам указује на могућност коришћења миРНК мимика или других облика миРНК терапије као стратегије за поновно успостављање измењене експресије гена која је узрокована измењеном експресијом миРНК која је локализована у ретком CNV региону.

6. Примењени модели и методолошки приступ коришћени у овој докторској дисертацији нам омогућавају да добијемо бољи увид у молекуларно генетичку основу САКУТ-а. С обзиром на успешност овог приступа, могао би се применити и за расветљавање молекуларно генетичке основе других сложених болести.

При писању докторске дисертације, кандидаткиња Кристина М. Митровић је цитирала 282 литературна извора који су релевантни за научну област докторске дисертације. Сви коришћени литературни извори су правилно и уједначеним стилем наведени у тексту. Комплетан попис коришћене литературе је дат у оквиру целине **Литература**.

## Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

### Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Mitrovic K**, Zivotic I, Kolic I, Djordjevic A, Zakula J, Filipovic Trickovic J, Zivkovic M, Stankovic A, Jovanovic I. Identification and functional interpretation of miRNAs affected by rare CNVs in CAKUT. *Scientific Reports*. 2022;12(1):17746.

IF<sub>2022</sub>=4,997 (oblast: Multidisciplinary Sciences)

**M21**

Линк ка публикацији на интернету:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36273030/>

2. **Mitrovic K**, Zivotic I, Kolic I, Zakula J, Zivkovic M, Stankovic A, Jovanovic I. A preliminary study of the miRNA restitution effect on CNV-induced miRNA downregulation in CAKUT. *BMC Genomics*. 2024;25(1):218.

IF<sub>2022</sub>=4,4 (oblast: Genetics & Heredity)

**M21**

Линк ка публикацији на интернету:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38413914/>

### Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Mitrovic K**, Kolic I, Zivotic I, Filipovic Trickovic J, Djordjevic A, Zivkovic M, Stankovic A, Jovanovic I. Are miR-548 family members potential genetic drivers of CAKUT. *European Human Genetics Conference – ESHG*, August 28th-31th, 2021, Vienna, Austria

**M34**

2. Kolic I, **Mitrovic K**, Zivotic I, Djordjevic A, Filipovic-Trickovic J, Zivkovic M, Stankovic A, Jovanovic I. *Assessing the burden of rare CNVs on miRNA genes in CAKUT*. *European Human Genetics Conference – ESHG*, June 11th-14th, 2022, Vienna, Austria

**M34**



## ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација кандидата Кристине М. Митровић, број индекса: Б3022/2017 послата је дана **8. 5. 2024. године** на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности је достављен менторима истог дана.

На основу извршене анализе од стране Универзитетске библиотеке „Светозар Марковић“ коришћењем програма iThenticate и налаза у извештају који је достављен менторима, констатујемо да за поднет текст индекс сличности износи 13%. Увидом у Извештај уочено је подударање са 75 сумарних извора. Детаљном анализом добијеног Извештаја и поклапања по сегментима, утврђено је да је подударање са једним извором било 3%, три извора по 1%, док је за све преостале изворе подударност била мања од 1%. Уочена поклапања су потицала од термина на енглеском, афилијација ментора, публикација које су проистекле из докторске дисертације, као и општих појмова и фраза које су карактеристичне за проблематику која је изучавана у оквиру докторске дисертације.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујемо да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, кандидата Кристине М. Митровић, под насловом **„Идентификација микро РНК у регионима генома са ретким структурним варијантама као потенцијалних генетичких узрочника за настанак урођених анормалија бубрега и уринарног тракта човека“**, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

## Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација кандидаткиње Кристине М. Митровић, под насловом „Идентификација микро РНК у регионима генома са ретким структурним варијантама као потенцијалних генетичких узрочника за настанак урођених анормалија бубрега и уринарног тракта човека“ представља врло савремен и оригинални научни рад. Формални услови за завршетак докторске дисертације су испуњени публикавањем резултата проистеклих из докторске дисертације у два врхунска међународна часописа, оба М21 категорије, на којима је кандидаткиња први аутор. Резултати проистекли из докторске дисертације су у виду апстракт саопшени на две међународне конференције.

Комисија је утврдила да је реч о савременом научном делу, са оригиналним експерименталним приступом у изучавању урођених анормалија бубрега и уринарног тракта човека. Кандидаткиња је јасно и концизно објаснила проблематику у уводном делу дисертације, добро приказала резултате које је дискутовала и критички сагледала у светлу савремених научних радова. Дисертација је обликована према постављеним техничким пропозицијама.

Коришћени експериментални приступ је иновативан и обухватио је *in silico*, *in vitro* и молекуларно-генетичке методе. Кандидаткиња Кристина М. Митровић је зрело и озбиљно приступила до сада слабо изучаваној научној проблематици и приказаним резултатима указала на велики значај изучавања микро РНК у регионима генома са ретким структурним варијантама као потенцијалних генетичких узрочника за настанак урођених анормалија бубрега и уринарног тракта човека. Добијени резултати су отворили нова питања за даљи наставак истраживања у овом научном пољу.

Именована Комисија предлаже Наставно-Научном Већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену докторске дисертације кандидаткиње **Кристине М. Митровић** под називом „Идентификација микро РНК у регионима генома са ретким структурним варијантама као потенцијалних генетичких узрочника за настанак урођених анормалија бубрега и уринарног тракта човека“ и тиме омогући кандидаткињи јавну одбрану дисертације.

Београд, 14. 5. 2024. године

**КОМИСИЈА:**

---

др Александра Станковић, научни саветник  
Универзитет у Београду - Институт за нуклеарне науке „Винча“ – Институт од  
националног значаја за Републику Србију

---

др Маја Живковић, научни саветник  
Универзитет у Београду - Институт за нуклеарне науке „Винча“ – Институт од  
националног значаја за Републику Србију

---

др Марија Савић Веселиновић, ванредни професор  
Универзитет у Београду – Биолошки факултет