

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На IX редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 12. 7. 2024. године, на основу молбе ментора, др Јоване Јаснић, научног сарадника Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду и др Милоша Бркушанина, доцента Биолошког факултета Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Емилије Н. Милошевић**, истраживача сарадника Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду под насловом: „Карактеризација гена *ANKRD1* и утицаја виолацеина на ћелије рабдомиосаркома *in vitro*“, у саставу: проф. др Горан Брајушковић, редовни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет, др Данијела Максимовић-Иванић, научни саветник, Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања Сениша Станковић, Институт од националног значаја за Републику Србију и др Снежана Којић, научни саветник, Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство.

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

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Емилије Н. Милошевић је оригинално истраживање којим је окарактерисана експресија гена *ANKRD1* и испитиван антитуморски ефекат бактеријског пигмента виолацеина на ћелијама пореклом од рабдомиосаркома. Докторска дисертација је урађена у Лабораторији за молекуларну биологију, односно Групи за ћелијску и молекуларну биологију мишића Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду.

Докторска дисертација садржи: насловну страну на српском и енглеском језику, податке о менторима и члановима комисије, резиме на српском и енглеском језику са кључним речима, садржај, текст рада по поглављима, литературу, биографију и три изјаве. Текст дисертације (78 страна) садржи следећа поглавља: Увод (странице 1-15), Циљеви рада (страница 16), Материјал и методе (странице 17-30), Резултати (странице 31-47), Дискусија (странице 48-58), Закључци (страница 59). Литература, у којој је цитирано 245 извора, је излистана на странама 60-78. Следи биографија кандидата, након које су приложене следеће изјаве: Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу. Дисертација садржи 27 слика и 14 табела.

Анализа докторске дисертације

Поглавље **Увод** је тематски подељено на пет потпоглавља. Кандидаткиња је у оквиру прве целине описала основне карактеристике попречно-пругастих мишића, а затим је објаснила механизме диференцијације скелетних мишићних ћелија. У трећем потпоглављу је изнела основне клиничке податке о рабдомиосаркому, тумору меких ткива који настаје као резултат поремећеног процеса диференцијације мишићних ћелија. Кандидаткиња је додатно описала савремене методе дијагностике и терапије рабдомиосаркома. Посебно се осврнула на агенсе природног порекла који се користе у терапији рабдомиосаркома. Четврто поглавље је посвећено протеину *ANKRD1*, члану

фамилије мишићних протеина са анкиринским поновцима, који се у литератури разматра као потенцијални маркер за диференцијалну дијагностику рабдомиосаркома. У овом потпоглављу описана је функција протеина ANKRD1 у миогенези, као и његова експресија и функција у патолошким стањима мишића, условима стреса и туморима. У последњем потпоглављу описан је бактеријски пигмент виолацеин, познат по бројним биолошким активностима, међу којима је и антитуморска.

У поглављу **Циљеви** је најпре објашњено да се први део истраживања односи на испитивање потенцијалног дијагностичког маркера рабдомиосаркома, протеина ANKRD1, који има улогу у туморогенези и диференцијацији мишићних ћелија која је нарушена код рабдомиосаркома. Други део истраживања односи се на испитивање новог потенцијалног терапеутика за рабдомиосаркоме, бактеријског метаболита виолацеина. Сходно томе постављена су два специфична циља ове тезе:

1. Окарактерисати ген *ANKRD1* у ћелијским линијама које воде порекло од два најзаступљенија типа рабдомиосаркома, кроз испитивање његове ендogene експресије на нивоу РНК и протеина, као и унутарћелијске локализације.
2. Испитати ефекат виолацеина на ћелије пореклом од рабдомиосаркома, кроз анализу цитотоксичног ефекта, утицаја на процесе карактеристичне за туморске ћелије и одређивање механизма деловања.

Поглавље **Материјал и методе** обухвата два потпоглавља. У првом потпоглављу је најпре дат преглед експерименталног материјала (ћелијске линије, лабораторијске животиње, бактерије, прајмери, плазмидни конструкти и вектори, и антитела). У другом потпоглављу су описане бројне експерименталне методе које је кандидаткиња користила у свом истраживању и које су организоване у девет целина: 1) ћелијска култура, 2) транзијентна трансфекција ћелија у култури, 3) третман ћелија инхибитором протеазома, 4) анализа експресије гена на нивоу РНК методама RT-PCR и qPCR (изолација РНК, синтеза комплементарне ДНК, PCR и квантитативни PCR у реалном времену), 5) секвенцирање ДНК методом по Сангеру), 6) анализа експресије на нивоу протеина (припрема протеинских екстраката, мерење концентрације протеина методом по Брадфорду, имунопреципитација, „western blot” и имуноцитохемија), 7) методе за анализу антитуморског дејства виолацеина (изолација и пречишћавање виолацеина, одређивање вијабилности ћелија МТТ тестом, есеј зарастања ране, тест токсичности на ембрионима зебрица, одређивање типа ћелијске смрти методом проточне цитофлуориметрије, релативна квантификација унутарћелијских реактивних врста кисеоника и одређивање нивоа липидне пероксидације), 8) микроскопија и 9) статистичка анализа.

У поглављу **Резултати**, уобличеном у два потпоглавља, прегледно су и систематично представљени резултати докторске дисертације, документовани сликама и графицима. У првом потпоглављу изложени су резултати карактеризације експресије гена *ANKRD1* у ћелијским линијама рабдомиосаркома. Најпре је документована специфичност антитела на хумани протеин ANKRD1 која су коришћена у даљем раду. У делу резултата посвећених експресији испитиваног гена на нивоу транскрипта и протеина у ћелијским линијама пореклом од рабдомиосаркома кандидаткиња је указала на хетерогеност експресије протеина ANKRD1 у ћелијским линијама SJRH30, RD и HS-729, за разлику од транскрипта који је имао сличан ниво експресије у анализираним ћелијама. Следе резултати анализе унутарћелијске локализације протеина ANKRD1 којима је показано присуство овог протеина и у цитоплазми, и у једрима, и то у једарним структурама које се зову Кахалова тела. У следећем одељку кандидаткиња показује да је протеин ANKRD1 подложен протеазомалној деградацији, а након тога да у ћелијама пореклом од рабдомиосаркома није било могуће прекомерно експримирати протеин ANKRD1, у циљу испитивања његове

функције. Друго потпоглавље Резултата је посвећено процени антитуморског ефекта виолацеина на ћелије пореклом од рабдомиосаркома, коришћењем низа експерименталних приступа: анализа цитотоксичности *in vitro* и токсичности *in vivo*, одређивање типа ћелијске смрти, праћење интеракције виолацеина са ћелијама, праћење ефекта виолацеина на миграцију ћелија, анализа параметара оксидативног стреса и испитивање садејства виолацеина са конвенционалним хемиотерапеутицима. Кандидаткиња је најпре одредила IC₅₀ вредности виолацеина за све три коришћене ћелијске линије и показала да виолацеин у концентрацији 10 пута већој од IC₅₀ није токсичан за ембрионе зебрице. Затим је показала да виолацеин изазива апоптозу у RD ћелијама, да преципитира на површини ћелија и да утиче на покретљивост испитиваних туморских ћелија успоравајући њихову миграцију. Даље су описани експерименти којима је циљ био одгонетање механизма којим виолацеин убија туморске ћелије. Показано је да дејство виолацеина на ћелије пореклом од рабдомиосаркома није повезано са оксидативним стресом. У комбинацији са конвенционалним хемиотерапеутицима, доксорубицином, иринотеканом и аналогом винкрестина, винфлунином, виолацеин значајно појачава цитотоксични ефекат доксорубицина, и то синергистички за RD ћелије. На крају, кандидаткиња је показала да виолацеин не утиче на експресију протеина ANKRD1.

Поглавље **Дискусија** садржи критичку анализу добијених резултата у контексту резултата сродних истраживања. Дискусија се односи на: разлоге због којих је ANKRD1 испитиван у ћелијским линијама рабдомиосаркома, карактеристике испитиваних ћелијских линија пореклом од рабдомиосаркома, поређење експресионог профила ANKRD1 у ћелијским линијама рабдомиосаркома и другим туморским ћелијама, потенцијалне разлоге неуспеха прекомерне експресије ANKRD1 у ћелијама рабдомиосаркома, потенцијалну функцију ANKRD1 у испитиваним туморским ћелијама, и дуалну, цитоплазматичну и једарну локализацију, као и локализацију у Кахаловим телима. Следи део дискусије посвећен виолацеину чија је цитотоксичност по први пут, у овој тези, тестирана на ћелијама пореклом од рабдомиосаркома. Поређен је његов цитотоксични ефекат између ћелија пореклом од рабдомиосаркома и других тумора. Дат је осврт на селективност виолацеина према малигним ћелијама. Дискутован је механизам деловања виолацеина на ћелије пореклом од рабдомиосаркома у односу на познате механизме његовог деловања на друге туморске ћелије. Кандидаткиња се затим осврнула на цитотоксични ефекат виолацеина у комбинацији са конвенционалним хемиотерапеутицима за лечење рабдомиосаркома. На крају дискусије дат је критички осврт на адекватност виолацеина као агенса за терапију и, у светлу досадашњих сазнања о виолацеину као антитуморском агенсу, изнети су захтеви које виолацеин треба да испуни да би постао кандидат за терапију тумора.

У поглављу **Закључци** су јасно и концизно изведени закључци на основу резултата анализе експресије ANKRD1 у ћелијама пореклом од рабдомиосаркома као и утицаја виолацеина на ове ћелије. Закључци су у складу са постављеним циљевима докторске тезе и сумирани су у 12 тачака:

- Утврђена је разлика у нивоу транскрипта и протеина ANKRD1 у ћелијским линијама рабдомиосаркома.
- Испитиване ћелијске линије рабдомиосаркома експримирају ANKRD1 неизмењене примарне секвенце.
- Протеин ANKRD1 локализован је у цитоплазми и једрима ћелија пореклом од рабдомиосаркома, а присутан је и у Кахаловим телима RD и HS-729 ћелија.
- Протеин ANKRD1 подложен је протеазомалној деградацији у ћелијама рабдомиосаркома.

- Виолацеин има цитотоксично дејство на ћелије пореклом од рабдомиосаркома.
- Концентрације виолацеина токсичне за ћелије рабдомиосаркома не утичу на преживљавање ембриона зехрица.
- Виолацеин индукује апоптозу RD ћелија.
- Виолацеин преципитира на површини ћелија рабдомиосаркома и не улази у ћелије током 24 сата третмана.
- Виолацеин статистички значајно успорава миграцију SJRH30 ћелија, док је успоравање миграције RD и HS-729 ћелија приметно, али не и статистички значајно.
- Дејство виолацеина на ћелије рабдомиосаркома је независно од оксидативног стреса јер: предтретман антиоксидантом не смањује осетљивост ћелија рабдомиосаркома на виолацеин и нема индукције липидне пероксидације и повећане продукције реактивних кисеоничних врста у ћелијама рабдомиосаркома.
- Виолацеин повећава осетљивост ћелија рабдомиосаркома на доксорубицин. Исти тренд присутан је и у комбинованим третманима са иринотеканом и винфлунином, али без статистичке значајности.
- Третман виолацеином у трајању од 24 сата не утиче на експресију протеина ANKRD1 у ћелијским линијама рабдомиосаркома.

Поглавље **Литература** садржи 245 адекватно цитираних библиографских јединица.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Milosevic, E.,** Stanisavljevic, N., Boskovic, S., Stamenkovic, N., Novkovic, M., Bavelloni, A., Cenni, V., Kojic, S., Jasnica, J. (2023). Antitumor activity of natural pigment violacein against osteosarcoma and rhabdomyosarcoma cell lines. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 149(13), 10975–10987. <https://doi.org/10.1007/s00432-023-04930-9>. **(M22)**

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37270734/>

2. **Milosevic, E.,** Novkovic, M., Cenni, V., Bavelloni, A., Kojic, S., Jasnica, J. (2024). Molecular characterization of ANKRD1 in rhabdomyosarcoma cell lines: expression, localization, and proteasomal degradation. *Histochemistry and Cell Biology*, 161(5), 435–444. <https://doi.org/10.1007/s00418-024-02272-2>. **(M21)**

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38396247/>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Milošević, E.,** Jasnić, J., Stanisavljević, N., Bošković, S., Stamenković, N., Novković, M., Cenni Vittoria., Kojić, S. (2021). Antitumor activity of natural pigment violacein against osteosarcoma and rhabdomyosarcoma cell lines. 4th European PhD and Postdoc Symposium „EXPLORING LIFE DYNAMICS: In and Out of Equilibrium”, virtuelno, Milano, Italija. **M34**

2. **Milosevic E.,** Jasnić, J., Novkovic M., Cenni V., Bavelloni A., Kojić, S. (2023). Expression profiling of ANKRD1 in rhabdomyosarcoma cell lines. EACR 2023 Congress: Innovative Cancer Science, Torino, Italija, Molecular Oncology 17(S1) EACR23-1162, str. 196–197. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13471>. **M34**

3. **Milošević, E.,** Jasnić, J., Stanisavljević, N., Cenni, V., Bavelloni, A., Kojić, S., (2023). Violacein enhances the cytotoxic effect of commonly used chemotherapeutics on

rhabdomyosarcoma cells. 6th Congress of the Serbian Association for Cancer Research (SDIR), Beograd, Srbija. Oncology insights P37, str. 94. **M34**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

/

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација је послата на проверу оригиналности 25.6.2024. године. Ментор је Извештај о провери оригиналности докторске дисертације Емилије Н. Милошевић добио истог дана. На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације кандидаткиње констатовано је да подударање текста износи 14%. Детаљним увидом у Извештај утврђено је да је највеће подударање, од 3%, са докторском тезом др Јоване Јаснић, ментора кандидаткиње, што је разумљиво с обзиром на сличну тематику истраживања. Остала појединачна подударања са изворима износе 1% или мање од 1%, и претежно се односе на стандардне елементе докторских дисертација (афилијација факултета, скраћенице, називе поглавља), препознавање цитираних референци и имена аутора, коришћења стручних израза, описа делова методолошких протокола за које су јасно наведене референце, препознавања делова реченица за које је очигледно да нису преузети из других извора, као и претходно публиковане резултате истраживања докторандкиње који су проистекли из ове дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета у Београду број 201/18).

С обзиром да Извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидаткиње Емилије Н. Милошевић Комисија сматра да се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација Емилије Н. Милошевић, под насловом „Карактеризација гена *ANKRD1* и утицаја виолацеина на ћелије рабдомиосаркома *in vitro*“, представља оригинални рад који даје значајан научни допринос у области биологије туморске ћелије. Квалитет ове тезе се огледа у проширењу сазнања о експресији гена *ANKRD1* у ћелијама пореклом од рабдомиосаркома, која доприносе расветљавању његове улоге у молекуларним механизмима туморогенезе и подржавају његово даље разматрање у светлу терапеутског таргета рабдомиосаркома. Осим тога, цитотоксичност виолацеина за ћелије пореклом од рабдомиосаркома, као и анализа механизма његовог дејства, отварају могућност примене овог агенса као потенцијалног терапеутика у третману рабдомиосаркома, у перспективи.

Дисертација је урађена у сагласности са образложењем наведеним у пријави теме. У складу је са принципима научно-истраживачког рада и садржи све потребне елементе прописане за завршетак докторске дисертације. Циљеви докторске дисертације су јасно дефинисани и применом адекватно одабраних метода истраживања успешно реализовани. Добијени резултати истраживања приказани у докторској дисертацији у складу су са постављеним циљевима и задацима истраживања, закључци произилазе из добијених резултата, а резултати су критички дискутовани.

Резултати ове докторске дисертације публиковани су у два оригинална рада у међународним научним часописима категорије M21 и M22, и представљени на три међународна скупа категорије M34.

С обзиром да је кандидаткиња Емилија Н. Милошевић испунила све формалне услове неопходне за одбрану докторске дисертације под насловом „**Карактеризација гена *ANKRD1* и утицаја виолацеина на ћелије рабдомиосаркома *in vitro***“, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да усвоји Извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације Емилије Н. Милошевић.

КОМИСИЈА:

У Београду, 22. 7. 2024. године

проф. др Горан Брајушковић
редовни професор
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Данијела Максимовић-Иванић
научни саветник
Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања Синиша Станковић,
Институт од националног значаја за Републику Србију

др Снежана Којић
научни саветник
Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство