

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

На X редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 10.09.2024. године, на основу молбе ментора, др Александре Николић, научног саветника Универзитета у Београду - Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, и др Душанке Савић-Павићевић, редовног професора Универзитета у Београду- Биолошког факултета одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Тамаре А. Бабић**, истраживача сарадника, Универзитета у Београду - Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство под насловом: „Алтернативна иницијација транскрипције гена *SMAD4* у колоректалном карциному“, у саставу: др Горан Брајушковић, редовни професор, Универзитет у Београду- Биолошки факултет, др Мелита Видаковић, научни саветник, Универзитет у Београду- Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“-Институт од националног значаја за Републику Србију и др Милена Угрин, виши научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство.

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 Тамаре А. Бабић је оригинално научно истраживање које је урађено у Групи за генску регулацију у туморима, Департмана за хуману молекуларну генетику и геномику, Универзитета у Београду - Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство.

Докторска дисертација садржи: насловну страну на српском и енглеском језику, податке о менторима и члановима комисије, захвалницу, резиме на српском и енглеском језику са кључним речима, листу скраћеница, садржај, текст рада по поглављима, литературу, биографију и три изјаве. Текст дисертације (69 страна) садржи следећа поглавља: Увод (странице 1-17), Циљеви рада (страница 18), Материјал и методе (странице 19-34), Резултати (странице 35-47), Дискусија (странице 48-58), Закључци (странице 59-60). Литература, у којој је цитирано 194 извора, излистана је на странама 61-69. 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 налази 30 слика и 8 табела.

## Анализа докторске дисертације

Поглавље **Увод** подељено је на три потпоглавља, и у њему је дат приказ релевантне литературе која је непосредно везана за предмет докторске дисертације. Прво потпоглавље тиче се епидемиологије и превентивних мера колоректалног карцинома (КРК), молекуларне генетике КРК са кратким приказом генетичких и епигенетичких аберација, развојних путева КРК и на основу њих успостављене класификације КРК, кратког приказа метастатског КРК и више типова класификације КРК према стадијумима тумора. У другом потпоглављу описан је процес регулације експресије гена, са детаљнијим освртом на главне учеснике процеса: промоторе, регулаторне елементе, опште транскрипционе факторе и транскрипционе регулаторе. Посебно је описан процес алтернативне иницијације транскрипције као механизам који је изучаван у овој докторској дисертацији, као и његова улога у карциному. На крају, дат је кратак приказ улога микро РНК и РНК-везујућих протеина у процесу регулације експресије гена. Треће потпоглавље описује ген *SMAD4*, његове транскрипте и протеински продукт, у светлу чињенице да *SMAD4* има описану улогу у развоју КРК. Најпре је детаљно наведена структура гена *SMAD4*, затим транскриптомске и протеинске изоформе, структура и функција протеина *SMAD4* у ћелији и његова улога у КРК, као и еволутивна очуваност гена *SMAD4*.

Имајући у виду улоге протеина *SMAD4* и алтернативне иницијације транскрипције у процесу малигне трансформације, општи циљ докторске дисертације је испитивање процеса алтернативне иницијације транскрипције тумор-супресора *SMAD4* и његове потенцијалне улоге у развоју колоректалног карцинома. Стога су у поглављу **Циљеви** дефинисани следећи циљеви рада: анализа транскриптомског профила гена *SMAD4* и функционална анализа алтернативних промотора гена *SMAD4*.

Поглавље **Материјал и методе** подељено је на 21 потпоглавље у којима су наведене све информације неопходне за репродуковање експерименталних процедура. Најпре је дат преглед биолошког материјала коришћеног у тези: ткива испитаника у оквиру националног скрининга за КРК и испитаника са дијагностикованим карциномом колона, ректума и метастатским КРК, ткива јетре модел система миша у 4 временске тачке развоја, хуманих ћелијских линија HCEC-1CT, SW480, HCT116, DLD-1, Caco-2, HT29, SW620, MRC-5 и HEK293, и бактерија *E. coli* соја DH5 $\alpha$ . Даље су описане процедуре изолације и мерења нуклеинских киселина коришћених у даљим експерименталним процедурама у тези. Изоловани молекули РНК коришћени су за анализу секвенцирања РНК нове генерације, као и анализу релативне заступљености транскрипата гена *SMAD4* и *Smad4* методом qRT-PCR након чега је уследила *in silico* анализа одабраних транскрипата *SMAD4*-213 и *SMAD4*-209. Транскриптомски подаци коришћени су и за мапирање места почетка транскрипције транскрипата гена *SMAD4* на промоторске регионе C и D, као и за процену активности наведених промотора. Затим, уследио је низ процедура које претходе и неопходне су за извођење репортерског есеја базираног на мерењу флуоресценце: ланчана реакција полимеразе за промоторске регионе гена *SMAD4*, електрофореза ДНК у

гелу од агарозе, секвенцирање ДНК ампликона методом по Сангеру, клонирање промотора у репортерске векторе и пролазна трансфекција. Након тога, описана је *in silico* анализа промотора гена *SMAD4*, ДНК „pull-down“ есеј и анализа протеома масеном спектрометријом.

У поглављу **Резултати**, подељеном на 12 потпоглавља, сажето су приказани резултати докторске дисертација документовани адекватним сликама и табелама. Најпре је дат табеларни приказ демографских карактеристика испитаника, након чега су приказани резултати анализе експресије гена *SMAD4* и транскрипта *SMAD4-201* у различитим типовима узорака. У анализираним хуманим ћелијским линијама удео транскрипта *SMAD4-201* у укупној експресији гена *SMAD4* износи између 16% и 46%, а разлика између неизмењених и малигнућ ћелија се не уочава. Са друге стране, у клиничким узорцима детектован је варијабилан удео транскрипта *SMAD4-201* (0,07% - 98%) који варира у зависности од типа ткива: удео *SMAD4-201* опада са прогресом КРК, па су вредности највеће у здравој слузници колона, мање у околном неизмењеном ткиву и најмање у околном здравом ткиву колона. Изузетак чини заступљеност *SMAD4-201* у паровима ткива пореклом из ректума, указујући на ткивну специфичност експресије овог транскрипта. Анализа експресије хомологог транскрипта *Smad4-201* у узорцима ткива јетре миша на два ембрионална и два адултна ступња развоја показала је да у ембрионалним стадијумима транскрипт *Smad4-201* чини већину експресије гена *Smad4*, док се у постанаталном периоду његов удео смањује на половину. Транскриптомска анализа показала је диференцијалну експресију транскрипата *SMAD4-209* и *SMAD4-213* у ћелијским линијама, и то већу експресију *SMAD4-209* у неизмењеној линији HCEC-1CT и већу експресију *SMAD4-213* у малигним линијама HCT116 и DLD-1. Анализа експресије претходна два транскрипта у спареним узорцима КРК показала је вишу експресију *SMAD4-209* у неизмењеном ткиву у односу на туморско, док се разлика у експресији у случају транскрипта *SMAD4-213* не уочава. *In silico* анализа транскрипта *SMAD4-213* указала је на његову протеин-кодирајућу улогу, чиме настаје нефункционални протеин *SMAD4* који вероватно омета правилну TGF- $\beta$  сигнализацију, али и регулаторну улогу захваљујући комплексној секундарној структури и предикованом везивању бројних молекула миРНК. *In silico* анализа транскрипта *SMAD4-209* показала је да он поседује јединствени регион који је вероватно одговоран за његову искључиву експресију у неизмењеном ткиву, а који поседује везујућа места за поједине миРНК и РНК-везујуће протеине са улогом у КРК. Промотори С и D показују диференцијалну активност, тако да промотор С има већу активност у неизмењеним, док промотор D има већу активност у малигним ћелијама, а *in silico* анализа указала је на диференцијално везивање транскрипционих регулатора за промоторске регионе који би могли да објасне њихову специфичну активност. Протеомска анализа потврдила је везивање претходно предикованих транскрипционих регулатора SP1, NRF1 и FOXA2 за промоторске регионе чија је улога у КРК већ описана у литератури.

Поглавље Дискусија садржи критички осврт на резултате и њихово тумачење у односу на постојеће податке у литератури. На крају овог поглавља изнета је хипотеза алтернативне регулације експресије гена *SMAD4* у КРК, проистекла из докторске дисертације.

У поглављу **Закључци** сумирани су сви резултати докторске дисертације и указано је да је алтернативна иницијација транскрипције гена *SMAD4* механизам који је заступљен у развоју колоректалног карцинома. Потврђена је аберантна употреба алтернативних промотора *SMAD4* у КРК, као и постојање специфичних тумор-асоцираних транскрипционих изоформи које се са датих промотора преписују. *SMAD4-209* може се сматрати анти-туморским фактором и даља истраживања требало би да буду усмерена на испитивање његовог терапеутског потенцијала. *SMAD4-213* вероватно има улогу у развоју КРК, те би будућа истраживања требало да испитају његову функцију и терапеутски потенцијал његовог утишавања у туморским ћелијама.

Поглавље **Литература** садржи 194 цитираних радова коришћених у изради докторске дисертације.

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

### **Б1. Радови у часописима међународног значаја**

1. Babic T, Dragicevic S, Miladinov M, Krivokapic Z, Nikolic A. *SMAD4-201* transcript as a putative biomarker in colorectal cancer. *BMC Cancer*, 2022;22(1):72. **M22**, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35034624/>
2. Babic T, Ugrin M, Jeremic S, Kojic M, Dinic J, Banovic Djeri B, Zoidakis J, Nikolic A. Dysregulation of transcripts *SMAD4-209* and *SMAD4-213* and their respective promoters in colon cancer cell lines. *J Cancer*, 2024;15(15):5118-5131. **M22**, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39132157/>

### **Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја**

1. Babic T, Dragicevic S, Miladinov M, Krivokapic Z, Nikolic A. *SMAD4* gene coding transcripts with alternative 5' ends as colorectal cancer biomarkers. *ESHG 2021 - Virtual Conference*, 2021; *EJHG* 2022, 30(SUPPL 1), 556–556. **M34**

### **Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја**

1. Babic T, Dragicevic S, Nikolic A. *SMAD4* transcript analysis in human permanent cell lines. 4<sup>th</sup> Congress of the Serbian Association for Cancer Research, 2019, Serbia. **M64**

## Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата **Тамаре А. Бабић**, број индекса **M3005/2016** послата је дана **23.09.2024. године** на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио дана **23.09.2024.**

На основу извршене анализе од стране Универзитетске библиотеке Светозар Марковић коришћењем програма iThenticate, утврђен је проценат подударности од 13%. Увидом у Извештај утврђено је подударање са 164 сумарна извора. Детаљном анализом добијеног Извештаја и поклапања по сегментима, уочено је да је подударање са пет извора било по 1% и у свим преосталим случајевима мање од 1%. Поклапања су превасходно потицала од афилијације ментора и чланова комисије, присутних термина на енглеском језику, општих места и података која се тичу формата дисертације, методолошких протокола и уобичајених фраза карактеристичних за тематику докторске дисертације.

Када се све изнето узме у обзир, извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата **Тамаре А. Бабић**, под насловом **”Алтернативна иницијација транскрипције гена *SMAD4* у колоректалном карциному“**, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

## Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација Тамаре А. Бабић, истраживача-сарадника Универзитета у Београду - Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство представља оригиналан научно-истраживачки рад који значајно доприноси разумевању процеса алтернативне иницијације транскрипције у процесу малигне трансформације. Кандидаткиња је постављене циљеве ове дисертације реализовала адекватним биоинформатичким и великим бројем експерименталних анализа којима је испитивала транскриптомски профил и алтернативне промоторе гена *SMAD4* у колоректалном карциному. Значајност ове студије огледа се расветљавању базичних молекуларно-биолошких процеса и њихове аберантне употребе у карциному. Посебно се истичу биомаркерски кандидати чије би даље испитивање допринело развоју савремених терапеутика. Резултати ове дисертације су објављени у два научна рада (категорије M22) у којима је Тамара Бабић први аутор. Адекватно представљени и критички протумачени добијени резултати овог научног рада показују капацитет кандидаткиње да успешно реализује целовито научно истраживање.

На основу наведеног именована Комисија предлаже Наставно-Научном Већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену докторске дисертације кандидаткиње **Тамаре А. Бабић** под називом „**Алтернативна иницијација транскрипције гена *SMAD4* у колоректалном карциному**“ и тиме омогући кандидаткињи јавну одбрану дисертације.

### КОМИСИЈА:

У Београду, 11.10.2024. године

---

др Горан Брајушковић, редовни професор  
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

---

др Мелита Видаковић, научни саветник  
Универзитет у Београду – Институт за биолошка истраживања ”Синиша Станковић” –  
Институт од националног значаја за Републику Србију

---

др Милена Угрин, виши научни сарадник  
Универзитет у Београду – Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство