

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

На VIII редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 13.07.2020. године, на основу молбе ментора, др Невене Грдовић, вишег научног сарадника, Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду и др Мелите Видаковић, научног саветника, Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације Јоване Ј. Рајић, истраживача сарадника, Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду под насловом: „Улога метилације ДНК у процесу епително-мезенхимске транзиције хуманих епителних ћелија конјуктиве“, у саставу:

др Невена Грдовић, виши научни сарадник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду

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

др Душанка Савић-Павићевић, редовни професор, 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 Ј. Рајић** под насловом „Улога метилације ДНК у процесу епително-мезенхимске транзиције хуманих епителних ћелија конјуктиве“ урађена је на Одељењу за молекуларну биологију Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду, у оквиру пројекта „Сигнални молекули у дијабетесу: идентификација потенцијалних биолошких маркера укључених у модификацију и интеграцију сигналних путева у циљу предикције и интервенције у дијабетесу“, потпројекат „Генетска предиспозиција за развој дијабетеса тип 1 и нови приступи у превенцији дисфункције β ћелија у дијабетесу: изучавање путева преноса сигнала посредованих CXCL12 (ОИ173020) и Плана и програма рада Института за 2020. годину (451-03-69/2020-14/200007), финансираних од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Докторска дисертација садржи укупно 153 стране текста, од чега су нумерисане 133 стране. Нумерисани текст је подељен на 7 поглавља: **Увод** (31 страна), **Циљеви** (2 стране), **Материјал и методе** (15 страна), **Резултати** (36 страна), **Дискусија** (18 страна), **Закључци** (2 стране) и **Литература** (29 страна). Докторска дисертација укључује и 27 слика (2 у поглављу Увод, 1 у поглављу Материјал и методе, 24 у поглављу Резултати) и 3 табеле у поглављу Материјал и методе. У поглављу Литература наведено је 579 библиографских јединица које су исправно назначене у тексту. Насловне стране на српском и енглеском језику, листа ментора и чланова комисије, изјава захвалности, сажети на српском и енглеском језику, листа скраћеница, садржај, биографија аутора, изјава о ауторству, изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и изјава о коришћењу сачињавају ненумерисани текст докторске дисертације (15 страна на почетку и 5 страна на крају).

Анализа докторске дисертације

У поглављу **Увод** кандидаткиња је кроз четири већа одељка систематично дала преглед литературних података који описују досадашња сазнања релевантна за предмет истраживања своје докторске дисертације. У одељку под насловом **Фиброза и болести ока** наведени су епидемиолошки подаци који указују на распрострањеност различитих болести ока у којима долази до фиброзних промена. Такође кандидаткиња описује опште механизме настанка фиброзних промена при чему посебно истиче улогу миофибробласта у настанку патологије и уводи појам епително-мезенхимске транзиције (ЕМТ). Потом је дат преглед различитих фиброзних болести ока са детаљнијим освртом на грађу, функције и болести коњуктиве повезане са фиброзом. У наредном одељку насловљеном **Трахом** исцрпно је описана патогенеза, клиничке манифестације, епидемиологија и третман болести под називом трахом, која се развија након поновљених и/или перзистентних инфекција епителних ћелија коњуктиве бактеријом *Chlamydia trachomatis*. Посебно је подвучен значај ћелијске хипотезе по којој епителне ћелије имају значајну улогу у имунопатологији трахома и потенцијално доприносе настанку оживљачног ткива након уласка у процес ЕМТ. Сходно томе, у одељку **Процес епително-мезенхимске транзиције** описане су опште одлике овог феномена који се јавља у три различита биолошка контекста и укључује губитак епителних и постепено задобијање мезенхимских карактеристика које подразумевају издуживање ћелије, задобијање покретљивости и повећану синтезу протеина ванћелијског матрикса. Затим су описани различити биомаркери процеса ЕМТ помоћу којих је могуће у већој или мањој мери одредити фенотип испитиваних ћелија и изнет је преглед сигналних путева који доводе до покретања транзиције са највећим фокусом на канонске и неканонске сигналне путеве покренуте TGF- β протеинима који се сматрају прототипским индукторима процеса ЕМТ. У последњем одељку под називом **Регулација процеса ЕМТ** кандидаткиња је истакла значај међусобно испреплетаних регулаторних мрежа које контролишу експресију гена укључених у транзицију и чије нарушавање баланса доводи до промена фенотипа ћелија. Прво су описани транскрипциони фактори повезани са покретањем и регулацијом процеса ЕМТ, пре свега ZEB, SNAIL и TWIST протеини, који учествују у функционисању најбоље окарактерисане регулаторне мреже. Осим тога дат је кратак преглед епигенетичких механизма укључених у регулацију процеса ЕМТ и преко навођења бројних примера

посебно објашњена улога и истакнут значај хистонских модификација, метилације ДНК и миРНК у контроли експресије различитих гена повезаних са процесом ЕМТ.

У поглављу **Циљеви** јасно и сажето су изнети циљеви ове докторске дисертације. Кандидаткиња полази од чињенице да се тренутни приступи у терапији фиброзових стања, укључујући и фиброзне промене конјуктиве, нису показали довољно специфичним и ефикасним с' обзиром да таргетију молекуле који, осим у покретању фиброзе и процеса ЕМТ, учествују и у бројним виталним процесима у ћелији. Због тога кандидаткиња истиче да је неопходно пронаћи алтернативне, специфичније и ефикасније стратегије у лечењу фиброзе конјуктиве, при чему би потенцијално значајан правац у већој мери узимао у обзир улогу епителних ћелија у настанку фиброзових промена. У складу са тим, као општи циљ ове докторске дисертације кандидаткиња поставља испитивање способности хуманих епителних ћелија конјуктиве да уђу у процес ЕМТ под различитим условима и идентификацију кључних фактора повезаних са покретањем и прогресијом транзиције. При томе би посебна пажња била усмерена на расветљавање улоге метилације ДНК у регулацији експресије гена укључених у процес ЕМТ у овим ћелијама. Како би се дошло до општег задато је неколико непосредних циљева који укључују: 1) Испитивање потенцијала инфекције хуманих епителних ћелија конјуктиве бактеријом *C. trachomatis* да покрене процес ЕМТ и испитивање улоге метилације ДНК током овог процеса; 2) Успостављање *in vitro* модела процеса ЕМТ са циљем идентификације есенцијалних фактора неопходних за одигравање транзиције хуманих епителних ћелија конјуктиве и разјашњавање регулаторних механизма који леже у основи овог процеса; 3) Расветљавање улоге метилације ДНК у покретању процеса ЕМТ у хуманим епителним ћелијама конјуктиве и испитивање могућности за заустављање и/или делимичну реверзију транзиције променом профила метилације одређених гена.

У поглављу **Материјал и методе** кандидаткиња детаљно описује све коришћене експерименталне методе као и начин обраде резултата, а наводи и све реагенсе и апаратуру коришћену у раду. Ово поглавље је подељено на пет већих одељака. У првом одељку описани су експерименти рађени на имортализованим хуманим епителним ћелијама конјуктиве (енгл. *Human Conjunctival Epithelial Cells* - НСјЕ ћелије). У циљу испитивања потенцијала инфекције бактеријом *C. trachomatis* да доведе до покретања процеса ЕМТ коришћени су ДНК, РНК и протеини изоловани 72 сата након инфекције

НСјЕ ћелија са 1×10^7 инфективних јединица бактерије *C. trachomatis* (серовар В/НАР-36) (Центар за окуларну инфламацију и инфекцију (OCUVAC), Медицински факултет у Бечу). У другој фази израде тезе, за успостављање *in vitro* модела процеса ЕМТ на коме је детаљније окарактерисан процес ЕМТ, НСјЕ ћелије су гајене на стандардној хидрофилној подлози и третиране хуманим пречишћеним рекомбинантним индукторима процеса ЕМТ - самостално са TGF- β 1 и TGF- β 2 протеинима (10 ng/ml) или истовремено са TGF- β 1 и TGF- β 2 (по 5 ng/ml) у трајању од шест пасажа (30 дана), након чега су изоловани ДНК, РНК и протеини. За третмане епигенетичким агенсима, НСјЕ ћелије су котретиране ДНК деметилујућим агенсом 5-азацитидином (5-AzaC) или у периоду између другог и трећег пасажа (5 дана) за котретман 5-AzaC са периодом опоравка, или између петог и шестог пасажа (5 дана) за котретман 5-AzaC без периода опоравка. При томе је TGF- β 1 континуирано примењиван, а ДНК, РНК и протеини изоловани након шестог пасажа. Током ових експеримената праћена је морфологија и миграција НСјЕ ћелија. Осим тога, коришћене су и методе за манипулацију нуклеинским киселинама као што су квантитативна ланчана реакција полимеразе у реалном времену (RT-qPCR), панели базирани на методи RT-qPCR (хумани панел за испитивање експресије 84 гена повезаних са процесом ЕМТ и хумани панел за испитивање експресије 84 миРНК укључених у процес ЕМТ) и методе за анализу метилације ДНК базиране на PCR техници (MSP, HRM и бисулфитно секвенцирање). Експерименталне методе коришћене током израде ове докторске дисертације обухватале су и технике манипулације протеинским узорцима за имуноблот анализу, имуноцитохемију и проточну цитометрију.

У поглављу **Резултати** јасно и прегледно су наведени добијени експериментални резултати. У складу са постављеним циљевима, кандидаткиња приказује резултате у оквиру три главна одељка. У оквиру одељка **Потенцијал инфекције НСјЕ ћелија бактеријом *C. trachomatis* за покретање процеса ЕМТ** показано је да након инфекције НСјЕ ћелија бактеријом *C. trachomatis* долази до повећања експресије главних индуктора процеса ЕМТ (TGF- β 1 и TGF- β 2), до активације различитих сигналних путева и повећања експресије транскрипционих фактора (*SNAI1* и *ZEB2*) укључених у покретање процеса ЕМТ. Такође, показано је да долази до смањења експресије маркера епителних ћелија Е-кадхерина и повећања експресије маркера мезенхимских ћелија фибронектина и α -SMA на нивоу иРНК и протеина. Ти резултати праћени су значајним повећањем нивоа метилације

ДНК у оквиру промотора *CDH1* и незнатног смањења нивоа метилације у оквиру првог егзона *FN1* и *ACTA2* што указује на улогу метилације ДНК у регулацији експресије гена који кодира за Е-кадхерин у НСјЕ ћелијама након инфекције бактеријом *S. trachomatis*. У следећем одељку под називом ***Карактеризација процеса ЕМТ и идентификација кључних молекула одговорних за покретање транзиције НСјЕ ћелија***, на основу промене морфологије НСјЕ ћелија у правцу фенотипа карактеристичног за мезенхимске ћелије, повећања њихове покретљивости, смањења експресије епителних и повећања експресије мезенхимских маркера и транскрипционих фактора укључених у покретање процеса ЕМТ, показано је да дуготрајан третман TGF- β 1 изоформом има највећи потенцијал за покретање транзиције НСјЕ ћелија. Даље је утврђено да котретмани НСјЕ ћелија ДНК деметилујућим агенсом, посебно котретман 5-AzaC са периодом опоравка, доводе до реверзије морфолошких промена ка епителном фенотипу, као и до смањења покретљивости НСјЕ ћелија и повећања експресије протеина маркера епителних и смањења експресије протеина маркера мезенхимских ћелија. Такође, котретмани 5-AzaC у две временске тачке довели су до различитих и селективних ефеката у погледу експресије гена који дефинишу епителни/мезенхимски фенотип. Тако је котретман 5-AzaC са периодом опоравка довео до изразитог смањења експресије гена који кодирају за протеине маркере мезенхимских ћелија и гена који кодирају за транскрипционе факторе повезане са покретањем процеса ЕМТ. Ови резултати указали су на могућу укљученост узводних регулаторних фактора који координишу експресију већег броја гена и који своју активност испољавају као негативни регулатори експресије гена. Тако је у одељку ***Улога миРНК у процесу ЕМТ у НСјЕ ћелијама*** приказано да дуготрајан третман НСјЕ ћелија TGF- β 1 доводи до статистички значајног повећања нивоа метилације ДНК у оквиру промоторских региона оба миРНК-200 локуса што је било праћено смањењем експресије чланова фамилије миРНК-200 и променама морфологије НСјЕ ћелија у правцу мезенхимског фенотипа. Након котретмана 5-AzaC са периодом опоравка дошло је до статистички значајног смањења нивоа метилације ДНК у оквиру промоторских региона оба миРНК-200 локуса што је било праћено повећањем експресије чланова фамилије миРНК-200 и променама морфологије НСјЕ ћелија у правцу епителног фенотипа.

У поглављу **Дискусија** поступно је представљена упоредна анализа приказаних резултата и доступних релевантних података објављених у научној литератури. На основу

текста у овом поглављу може се закључити да кандидаткиња добро познаје проблематику истраживања приказаног у овој докторској дисертацији. Дискусија започиње прегледом различитих болести конјуктиве у којима процес ЕМТ доприноси настанку фиброзових промена, укључујући и инфекцију бактеријом *S. trachomatis*, чиме је приказан шири контекст и значај урађеног истраживања. Кандидаткиња потом детаљно дискутује добијене резултате у светлу доступних истраживања о улози TGF- β протеина у настанку ожиљачног ткива у трахому, активацији сигналних путева након инфекције бактеријом *S. trachomatis* који могу довести до прокретања транзиције епителних ћелија конјуктиве, са посебним фокусом на промену нивоа експресије и метилације појединих гена укључених у процес ЕМТ. Потом су у наредним сегментима дискусије исцрпно протумачени резултати који су на *in vitro* моделу процеса ЕМТ показали да дуготрајан третман TGF- β 1 изоформом има највећи потенцијал за покретање транзиције НСЈЕ ћелија. Даље, кандидаткиња дискутује о улози метилације ДНК у настанку очних болести повезаних са процесом ЕМТ и ефектима примене ДНК деметилационих агенаса у заустављању и реверзији транзиције. Посебна пажња је посвећена тумачењу и разјашњавању резултата који указују на разлику у ефектима примене ДНК деметилујућег агенса у две временске тачке на реверзију процеса ЕМТ у НСЈЕ ћелијама. Такође, дискутован је ефекат котретмана 5-AzaC са периодом опоравка који је довео до смањења експресије гена који кодирају за макере мезенхимских ћелија и транскрипционе факторе укључене у покретање процеса ЕМТ, па је кандидаткиња детаљно образложила потенцијалне разлоге који су могли довести до таквог резултата и детектовану реверзију процеса ЕМТ у НСЈЕ ћелијама приписала деметилацији гена за миРНК. У завршним сегментима дискусије темељно је анализирана улога појединих миРНК, релевантних у контексту добијених резултата, а посебно функционалне импликације промене метилационог статуса промотора гена за фамилију миРНК-200 након третмана TGF- β 1 протеинима и котретмана 5-AzaC са периодом опоравка. На крају, предложено је да би директна деметилација ових промотора могла представљати нову терапеутску стратегију у третману болести конјуктиве повезаних са процесом ЕМТ.

У поглављу **Закључци** сумирани су и јасно наведени закључци изведени на основу добијених и продискутованих резултата, а на основу претходно постављених циљева. Кандидаткиња је навела седам основних закључака: 1) Инфекција бактеријом *S.*

trachomatis доводи до покретања процеса ЕМТ у НСјЕ ћелијама; 2) Инфекција НСјЕ ћелија бактеријом *C. trachomatis* доводи до промена у метилационим профилима гена маркера епителних и мезенхимских ћелија; 3) НСјЕ ћелије могу ући у процес ЕМТ након дуготрајног третмана TGF- β протеинима, при чему TGF- β 1 изоформа поседује највећи потенцијал за покретање овог процеса; 4) Метилација ДНК има важну улогу у покретању и реверзији процеса ЕМТ у НСјЕ ћелијама третираним TGF- β 1 протеинима; 5) Селективни ефекти примене деметилујућег агенса се, преко утицаја на ниво експресије различитих миРНК, манифестују у смањењу експресије већег броја гена који кодирају за протеине маркере мезенхимских ћелија и транскрипционе факторе укључене у покретање процеса ЕМТ у НСјЕ ћелијама третираним TGF- β 1 протеинима; 6) Промена профила метилације ДНК у оквиру гена који кодирају за чланове фамилије миРНК-200 има кључну улогу у покретању и реверзији процеса ЕМТ у НСјЕ ћелијама третираним TGF- β 1 протеинима; 7) Деметилација ДНК у оквиру промотора миРНК-200 локуса могла би представљати нову терапеутску стратегију у третману оних болести конјуктиве у чијој етиологији процес ЕМТ игра значајну улогу.

На крају ове докторске дисертације налази се поглавље **Литература** у коме је дата опсежна листа библиографских јединица која указује да је кандидаткиња темељно приступила изучавању проблематике докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Rajić, J.**, Inic-Kanada, A., Stein, E., Dinić, S., Schuerer, N., Uskoković, A., Ghasemian, E., Mihailović, M., Vidaković, M., Grdović, N., Barisani-Asenbauer, T. (2017). *Chlamydia trachomatis* Infection Is Associated with E-Cadherin Promoter Methylation, Downregulation of E-Cadherin Expression, and Increased Expression of Fibronectin and α -SMA—Implications for Epithelial-Mesenchymal Transition. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(JUN), 253. **M21**. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00253>
2. **Rajić, J.**, Dinić, S., Uskoković, A., Arambašić Jovanović, J., Tolić, A., Đorđević, M., Đorđević, M., Poznanović, G., Mihailović, M., Inic-Kanada, A., Barisani-Asenbauer, T., Grdović, N., Vidaković, M. (2020). DNA methylation of miR-200 clusters promotes epithelial to mesenchymal transition in human conjunctival epithelial cells. *Experimental Eye Research*, 197, 108047. **M21**. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108047>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Rajić, J.**, Grdović, N., Inic-Kanada, A., Stein, E., Schuerer, N., Uskoković, A., Ghasemian, E., Dinić, S., Mihailović, M., Arambašić Jovanović, J., Tolić, A., Sinadinović, M., Đorđević, M., Poznanović, G., Barisani-Asenbauer, T., Vidaković, M. (2017) *Chlamydia trachomatis* infection triggers Epithelial Mesenchymal Transition in conjunctiva: involvement of DNA methylation, in: Mourdjeva, M., Kistanova, E., Fazeli, A., Brevini, T. (Eds.), *In vitro 3-D Total Cell Guidance and Fitness*. Jointly published by the Institute of Biology and Immunology of Reproduction, BAS, COST Action CA16119 and Mouseprint Ltd., Albena Resort, Bulgaria, pp. 64-65. **M34**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **Rajić, J.**, Grdović, N., Inic-Kanada, A., Stein, E., Schuerer, N., Uskoković, A., Ghasemian, E., Dinić, S., Mihailović, M., Arambašić Jovanović, J., Tolić, A., Sinadinović, M., Đorđević, M., Poznanović, G., Barisani-Asenbauer, T., Vidaković, M., (2017) *Chlamydia trachomatis* infection and development of epithelial mesenchymal transition in conjunctiva: possible epigenetic mechanisms unveiled, u: Brajušković, G., Đorđević, A. (Eds.), 1st Congress of Molecular Biologists of Serbia - CoMBoS. Belgrade: University of Belgrade, Faculty of Biology, Belgrade, Serbia, p. 70. **M64**
2. **Rajić, J.**, Tolić, A., Đorđević, B.M., Đorđević, M.M., Mihailović, M., Dinić, S., Uskoković, A., Arambašić Jovanović, J., Poznanović, G., Inic-Kanada, A., Barisani-Asenbauer, T., Grdović, N., Vidaković, M. (2019) The capability of different TGF- β isoforms to induce EMT in human conjunctival epithelial cells. Proceedings from Serbian Biochemical Society Ninth Conference with international participation “Diversity in Biochemistry”, Belgrade, Serbia, p. 159-160. **M64**

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидаткиње Јоване Ј. Рајић послата је дана 26.06.2020. године на софтверску проверу оригиналности, док је Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор добио дана 02.07.2020. године. Извештај добијен након провере оригиналности докторске дисертације Јоване Ј. Рајић под насловом: „Улога метилације ДНК у процесу епително-мезенхимске транзиције хуманих епителних ћелија конјуктиве“, коришћењем програма *iThenticate* у Универзитетској библиотеци „Светозар Марковић“, показао је индекс сличности од **7%**. Анализом Извештаја утврђено је да је степен подударности текста последица употребе скраћеница које се налазе у општој употреби, назива институција, као и назива одређених произвођача, хемикалија, састава дефинисаних пуфера и стандардизованих експерименталних метода. Све наведено је у складу са чланом 9. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду што указује на оригиналност докторске дисертације кандидаткиње Јоване Ј. Рајић, те је настављен прописани поступак припреме за њену одбрану.

Мишљење и предлог Комисије

Увидом у докторску дисертацију под насловом „Улога метилације ДНК у процесу епително-мезенхимске транзиције хуманих епителних ћелија конјуктиве“, Комисија констатује да она представља оригинални научни рад кандидаткиње Јоване Ј. Рајић. Приказани резултати дају важан научни допринос разумевању процеса епително-мезенхимске транзиције (ЕМТ) у конјуктивалној фибрози и то путем дефинисања услова и кључних фактора одговорних за покретање и напредовање процеса ЕМТ хуманих епителних ћелија конјуктиве, при чему је посебна пажња посвећена значају метилације ДНК у регулацији експресије гена укључених у транзицију ових ћелија. С’ обзиром да и процес ЕМТ и епигенетичке промене представљају реверзибилне феномене, резултати ове докторске дисертације потенцијално представљају основу за развијање преко потребних нових приступа у лечењу болести ока повезаних са фиброзом конјуктиве. Значај истраживања и резултатата добијених током израде ове докторске дисертације потврђује и објављивање две публикације у врхунским међународним часописима (M21).

Имајући у виду квалитет докторске дисертације **Јоване Ј. Рајић**, под насловом „Улога метилације ДНК у процесу епително-мезенхимске транзиције хуманих епителних ћелија конјуктиве“, Комисија има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену Комисије и одобри јавну усмену одбрану докторске дисертације кандидаткиње Јоване Ј. Рајић.

КОМИСИЈА:

У Београду, 19.07.2020. године

др Невена Грдовић, виши научни сарадник
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
– Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду

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

др Душанка Савић-Павићевић, редовни професор,
Универзитет у Београду-Биолошки факултет