

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 15.06.2020. godine, broj 9700/08, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Ekspresija protein arginin metil transferaze 1 (PRMT1) i njenih ko-efektora u tumorima  
bubrežnih ćelija kod odraslih”**

kandidata dr Jelene Filipović, asistenta na Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Mentor doktorske disertacije je prof. dr Jasmina Marković-Lipkovski, redovni profesor na Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Svetislav Tatić, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Doc. dr Duško Dunderović, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Ljubinka Janković-Veličković, Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

**IZVEŠTAJ**

**A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije**

Doktorska disertacija dr Jelene Filipović napisana je na ukupno 105 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura.

U disertaciji se nalaze ukupno 32 slike, 29 tabela i 4 grafikona. Zahvalnica, sažetak na srpskom i engleskom jeziku, spisak skraćenica korišćenih u tekstu i sadržaj doktorske teze su prikazani na početku, dok se biografija kandidata nalazi na njenom kraju.

**Uvod** je napisan na 37 strana i sadrži 18 slika i 4 tabele. Podeljen je na šest poglavlja, koja su napisana jasno i koncizno. U prva četiri poglavlja su opisane kliničke i histopatološke karakteristike tumora bubrežnih ćelija kod odraslih, osnovni principi njihove dijagnostike, dileme u diferencijalnoj dijagnozi, kao i najznačajnije genetske i epigenetske promene koje se javljaju u procesu njihove patogeneze. Peto poglavlje predstavlja kratak osvrt na strukturu i funkciju porodice PRMT (engl. Protein arginine methyltransferase-1) proteina uz ilustraciju jednom slikom. Šesto poglavlje je posvećeno PRMT1 proteinu. Opisana je struktura ovog proteina, mehanizam njegovog dejstva, zatim uloga u razvoju različitih tkiva i organa, odnosno tumora, kao i prognostički značaj njegove ekspresije u različitim tumorima. Jasno i sažeto su opisane osnovne karakteristike epitelno-mezenhimne transformacije (EMT), a potom je prikazan značaj PRMT1 proteina u procesu EMT, sa posebnim osvrtom na interakciju sa regulatorima EMT: ZEB1 (engl. Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1), RUNX1 (engl. Runt-related transcription factor 1), TWIST1 (engl. Twist Family BHLH Transcription Factor 1), ilustrovanom sa pet slika.

**Ciljevi istraživanja**, napisani na jednoj strani, su jasno definisani, pri čemu je izdvojeno šest glavnih ciljeva:

1. Ispitivanje ekspresije PRMT1 i njenih ko-efektora ZEB1, RUNX1 i TWIST1 u različitim histološkim tipovima tumora bubrežnih ćelija (RCC, engl. renal cell carcinoma): ccRCC (engl. clear cell RCC, pRCC (engl. papillary RCC), chRCC (engl. chromophobe RCC), RO (renalnim onkocitomima), CDC (engl. collecting duct carcinomas) i MLCRN-LMP (engl. multilocular cystic renal neoplasm of low malignant potential).
2. Poređenje ekspresije PRMT1, ZEB1, RUNX1 i TWIST1 sa demografskim i epidemiološkim karakteristikama pacijenata - pol, starost i preživljavanje i prognostičkim parametrima tumora bubrega - nuklearni gradus, stadijum tumorske bolesti i dimenzije tumora.
3. Ispitivanje dijagnostičkog i prognostičkog značaja imunohistohemijske ekspresije PRMT1 i ZEB1 u ccRCC niskog nuklearnog gradusa (nuklearni gradus I i II po WHO/ISUP) i MLCRN-LMP, i između chRCC, klasičnih RO i aRO (atipičnih RO).
4. Korelacija ekspresije PRMT1, ZEB1, RUNX1 i TWIST1 sa ekspresijom markera WNT/ $\beta$ -EMT signalnog puta: N-kadherinom, E-kadherinom i  $\beta$ -kateninom u različitim tipovima tumora bubrežnih ćelija.
5. Ispitivanje iRNA PRMT1 ekspresije u najčešćim karcinomima bubrežnih ćelija: ccRCC, pRCC i chRCC i okolnom netumorskom bubrežnom parenhimu, kao i poređenje sa prognostičkim parametrima tumora bubrega - nuklearni gradus, stadijum tumorske bolesti i dimenzije tumora.
6. Analiza hromozomskih aberacija aRO FISH metodom i poređenje sa PRMT1 i ZEB1 imunohistohemijskom (IHH) ekspresijom.

Poglavlje **Materijal i metode** je napisano na 14 strana i sadrži podatke o analiziranim uzorcima tumora i karakteristikama pacijenata, patološkim evaluacionim kriterijumima, metodi konstrukcije tkivnog mikroniza (TMN), primenjenim metodama IHH bojenja, qRT-PCR tehnike, fluorescentne in situ hibridizacije (FISH), načinima njihove analize i statističkoj obradi rezultata. Analizirani su slučajevi ccRCC, pRCC tip I i II, chRCC, RO, CDC i MLCRN-LMP. Detaljno je objašnjena tehnika konstrukcije tkivnog mikroniza, na čijim presecima su rađena IHH bojenja sledećim primarnim antitelima: PRMT1, ZEB1, RUNX1, TWIST1, N-kadherin i E-kadherin i  $\beta$ -katenin. U ovom poglavlju je opisana i metodologija analize obojenih preseka za svako primenjeno antitelo. Analizirani su obim, intenzitet i lokalizacija imunohistohemijske ekspresije. U cilju potvrde dobijenih rezultata na TMN, korišćeni su i odgovarajući konvencionalni, celi preseki od po nekoliko slučajeva različitih tipova tumora bubrega korišćenih za TMN. Detaljno je objašnjena izolacija iRNK, qRT-PCR analiza relativne iRNK PRMT1 ekspresije, kao i kohorte TCGA (engl. The Cancer Genome Atlas) i GTE<sub>x</sub> (engl. Genotype-Tissue Expression), koje su korišćene za poređenje dobijenih rezultata. U ovom poglavlju je objašnjena i FISH metoda, analiza prisustva aneuploidije na slučajevima aRO, kao i poređenje sa imunohistohemijskom ekspresijom PRMT1 i ZEB1. Ovo poglavlje je upotpunjeno sa pet tabela i jednom slikom.

**Rezultati** su u saglasnosti sa postavljenim ciljevima, sistematično predstavljeni kroz sedam poglavlja i 42 strane. Originalni rezultati ovog istraživanja su prikazani kroz 19 tabela, 13 slika i četiri grafikona, uz potrebna objašnjenja u pratećem tekstu.

**Diskusija** je napisana jasno i pregledno na devet strana, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

**Zaključci** odgovaraju postavljenim ciljevima i sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 100 bibliografskih jedinica, koje su poredane po redosledu po kome se citiraju u tekstu disertacije.

## **B) Kratak opis postignutih rezultata**

U netumorskom parenhimu, PRMT1 ekspresija je bila uočena u parijetalnim ćelijama Boumanove kapsule, ćelijama mezangijuma, epitelnim ćelijama proksimalnih tubula i epitelnim ćelijama sabirnih kanalića. Na TMN, PRMT1 ekspresija je bila prisutna u svim analiziranim

patohistološkim tipovima, i u većini slučajeva je bila heterogena. Učestalija heterogena PRMT1 ekspresija je primećena u ccRCC nižeg gradusa, nižeg stadijuma tumorske bolesti, dok je homogeni gubitak PRMT1 ekspresije bio karakterističan za slučajeve ccRCC visokog gradusa visokog stadijuma i kod umrlih pacijenata. Pacijenti bez PRMT1 ekspresije su imali lošije preživljavanje, u poređenju sa pacijentima sa PRMT1 ekspresijom. PRMT1 je bio eksprimiran u svim MLCRN-LMP, skoro svim RO i manjem broju chRCC. U kohorti celih preseka, skoro svi slučajevi ccRCC niskog gradusa, MLCRN-LMP, RO i aRO su imali difuznu ekspresiju PRMT1, jakog intenziteta. U istoj kohorti, skoro svi slučajevi chRCC su fokalno eksprimirali PRMT1. ZEB1 je bio eksprimiran u endotelnim ćelijama kapilara glomerula i krvnih sudova bubrežnog parenhima, uz odsustvo ekspresije u epitelnim ćelijama tubula i sabirnih kanalića. Iako je ZEB1 ekspresija na TMN bila uočena u skoro svim analiziranim tipovima tumora, najveći broj slučajeva je bio homogeno negativan, dok je heterogena ZEB1 imunopozitivnost bila prisutna u ccRCC i RO. Veći broj umrlih pacijenata je imao homogeni gubitak ZEB1 IHH ekspresije. Takođe, analiza preživljavanja je pokazala da je ZEB1 nezavisni prognostički parametar boljeg preživljavanja pacijenata sa ccRCC. Na konvencionalnim presecima, ZEB1 je bio homogeno negativan u skoro svim chRCC, dok je većina RO i svi aRO difuzno eksprimirala ZEB1. RUNX1 se u veoma slabom intenzitetu eksprimirao u pojedinačnim ćelijama glomerula, proksimalnih, distalnih tubula i sabirnih kanalića. RUNX1 ekspresija je u različitoj učestalosti uočena u analiziranim tipovima tumora, ali u svim slučajevima MLCRN-LMP, bez udruženosti sa kliničko-patološkim parametrima. TWIST1 je pokazao difuznu i jaku imunopozitivnost u ćelijama glomerula, citoplazmi tubulskih epitelnih ćelija i na membrani sabirnih kanalića. Citoplazmatska ekspresija TWIST1 jakog intenziteta primećena je u ccRCC visokog gradusa, sa sarkomatoidnom komponentom. Najveći broj slučajeva ccRCC sa odsustvom PRMT1 ekspresije, imao je i nedostatak ZEB1 ekspresije. Većina ccRCC i svi MLCRN-LMP sa RUNX1 ekspresijom imali su ko-ekspresiju sa PRMT1. Gubitak PRMT1 ekspresije u ccRCC, bio je udružen sa učestalom citoplazmatskom lokalizacijom TWIST1. Markeri EMT Wnt/ $\beta$ -katenin signalnog puta nisu bili udruženi sa PRMT1, ZEB1 ili TWIST1 ekspresijom. Nivo relativne iRNK PRMT1 ekspresije u tumorskom tkivu bio je niži nego u tkivu okolnog parenhima bubrega. Najniži nivo relativne iRNA-PRMT1 ekspresije zabeležen je kod ccRCC, nešto viši nivo iRNA-PRMT1 je bio u pRCC, a najviši nivo relativne ekspresije iRNA-PRMT1 primećen je kod chRCC. Značajno sniženje relativne iRNA-PRMT1 ekspresije bilo je uočeno u uzorcima ccRCC visokog gradusa i stadijuma. Metodom FISH analize dokazana je poliploidija svakog hromozoma u slučajevima

aRO. Svi slučajevi aRO su difuzno ekspresirali PRMT1 i ZEB1, bez obzira na rezultate FISH analize.

### **C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature**

U doktorskoj disertaciji je detaljno ispitana ekspresija PRMT1 epigenetskog regulatora u različitim strukturama zdravog bubrežnog parenhima. Po prvi put je PRMT1 ekspresija analizirana u sedam različitih tipova tumora bubrežnih ćelija u adultnoj populaciji. Prema podacima iz literature, PRMT1 ekspresija je uočena u mnogim tkivima: bubregu, koži, duodenumu, pankreasu, plućima, dojci, placenti, testisu, prostati (Vezzalini M. 2010). Ista studija je pokazala ekspresiju PRMT1 u epitelnim ćelijama renalnih tubula, ali bez ekspresije PRMT1 u glomerulima ili sabirnim kanalčićima (Vezzalini M. 2010). PRMT1 se ekspresira i u karcinomima pluća, mokraćne bešike, debelog creva, dojke, u akutnoj limfoblastnoj leukemiji, gliomima i uglavnom je predstavljen kao negativan prognostički faktor (Wang S., 2012, Zou L., 2012, Avasarala S., 2015, Gao Y., 2016, Papadokostopoulou A. 2009., Yoshimatsu M. 2011). Međutim, pacijenti sa karcinomom želuca i ekspresijom PRMT1 su imali značajno bolje preživljavanje od pacijenata bez PRMT1 ekspresije, što je u saglasnosti sa našim rezultatima (Altan B. 2016). PRMT1 ekspresija u svim MLCRN-LMP i većini niskogradusnih ccRCC je takođe u saglasnosti sa podacima iz literature da ccRCC i MLCRN-LMP ekspresiraju zajedničke IHH markere i imaju povoljniju prognozu za pacijenta (Moch H. 2016). Difuzna ekspresija PRMT1 i ZEB1 jakog intenziteta u skoro svim RO može biti od praktičnog značaja, budući da još uvek ne postoji IHH marker koji bi sa sigurnošću služio u njihovoj diferencijalnoj dijagnozi (Alamara C., 2008, Ng KL., 2014). U literaturi je do sada opisana heterogena ekspresija u višim gradusima ili potpuni gubitak ZEB1 ekspresije u ccRCC niskog gradusa (Guarch R. 2018, Zaldumbde L. 2015). Homogeni gubitak ZEB1 ekspresije kod većine umrlih pacijenata u ovoj disertaciji bi mogao ukazivati da ZEB1 na različite načine učestvuje u tumor specifičnim mehanizmima nastanka i progresije tumora bubrežnih ćelija, koji su za sada još uvek nedovoljno proučeni. U literaturi je takođe pokazana udruženost povećane ekspresije iRNK RUNX1 u ccRCC sa muškim polom, visokim nuklearnim gradusom, kliničkim stadijumom, kao i lošijim preživljavanjem (Fu Y. 2019). U ovoj disertaciji je analizirana IHH RUNX1 ekspresija, te razlika u rezultatima može biti posledica razlike u metodologiji. Citoplazmatska ekspresija TWIST1 u ccRCC visokog gradusa, sa sarkomatoidnom komponentom je u saglasnosti sa već objavljenim podacima da je njegova citoplazmatska lokalizacija u ćelijama ccRCC udružena sa visokim gradusom, agresivnim

tumorskim ponašanjem i lošom prognozom (Rasti A. 2018). Najniži nivo relativne iRNA-PRMT1 ekspresije zabeležen u ccRCC u odnosu na pRCC i chRCC je u saglasnosti sa podacima iz literature da je ccRCC, u poređenju sa pRCC i chRCC, agresivniji tip tumora, sa lošijom prognozom (Moch H. 2016). Značajno sniženje relativne iRNA-PRMT1 ekspresije u ccRCC visokog gradusa i stadijuma je u skladu sa rezultatima IHH analize. Pokazana poliploidija svakog hromozoma u zonama sa ćelijskom atipijom na slučajevima aRO može biti posledica ćelijskog stresa tokom nastanka tumora, njenog reprogramiranja i prilagodjavanja, te održavanja benigne prirode RO, što je u saglasnosti sa podacima iz literature (Øvrebø JI. 2018).

#### **D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije**

**Filipović J**, Bosić M, Ćirović S, Životić M, Dunderović D, Đorđević D, Živković-Perišić P, Lipkovski A, Marković-Lipkovski J. PRMT1 expression in renal cell tumors- application in differential diagnosis and prognostic relevance. *Diagn Pathol.* 2019;14(1):120. [M22, IF 2.528]

#### **E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija dr Jelene Filipović se odnosi na ispitivanje ekspresije PRMT1 epigenetskog regulatora i njenih ko-efektora ZEB1, RUNX1 i TWIST1 u sedam različitih tipova tumora bubrežnih ćelija kod odraslih. U disertaciji su korišćeni uzorci TMN, dok je potvrdna analiza obuhvatila analizu celih preseka određenih grupa slučajeva. Analiza je obuhvatila metode imunohistohemije, qRT-PCR i FISH.

Istraživanjem je pre svega pokazana ekspresija PRMT1 u različitim strukturama bubrežnog parenhima i različitim tipovima tumora bubrežnih ćelija kod odraslih. U ccRCC visokog gradusa i stadijuma ekspresija PRMT1 je bila heterogena, dok je homogeni gubitak PRMT1 ekspresije uočen u ccRCC visokog gradusa, visokog stadijuma i kod umrlih pacijenata. Pokazano je da su pacijenti bez PRMT1 i ZEB1 ekspresije imali lošije preživljavanje, a da je ZEB1 bio i nezavisan faktor preživljavanja. Takođe, difuzna ekspresija PRMT1 i ZEB1 jakog intenziteta mogla bi biti od praktičnog značaja u dijagnostici RO. Komisija zaključuje da je istraživanje sprovedeno u skladu sa najvišim metodološkim standardima, uz integrisan kliničko-patološki pristup problemu. Disertacija je napisana jasno, rezultati detaljno izneti, ciljevi i zaključci jasno definisani, uz relevantan literaturni pregled.

Na osnovu navedenog, Komisija smatra da doktorska disertacija predstavlja originalni naučni doprinos i predlaže Naučnom veću da prihvati priloženu disertaciju dr Jelene Filipović pod naslovom „**Ekspresija protein arginin metil transferaze 1 (PRMT1) i njenih ko-efektora u tumorima bubrežnih ćelija kod odraslih**”, i odobri njenu javnu odbranu.

Mentor

Članovi Komisije:

---

Prof. dr Jasmina Marković-Lipkovski,  
redovni profesor

---

Prof. dr Svetislav Tatić, redovni profesor,  
predsednik komisije

---

Doc. dr Duško Dunderović, docent

---

Prof. dr Ljubinka Janković-Veličković,  
redovni profesor