

Биолошки факултет
Број захтева: 15/453-1
Датум: 15.07.2014.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији

Молимо да, сходно члану 46. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду («Гласник Универзитета», број 131/06), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата: **Радослава С. Давидовића**, дипломираног молекуларног биолога и физиолога.

КАНДИДАТ: **Радослав С. Давидовић**

пријавио је докторску дисертацију под називом:

„Анализа мутационог статуса гена *p53* и метилационог статуса промотора гена *p14* и *p16* у липосаркомима“.

из научне области: Биолошке науке.

Универзитет је дана 27.02.2014. године. својим актом под бр. 02 Број: 61206-6268/3-14 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата која је гласила:

„Анализа мутационог статуса гена *p53* и метилационог статуса промотора гена *p14* и *p16* у липосаркомима“.

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата: **Радослава С. Давидовића**, образована је на VIII редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду-Биолошког факултета, одржаној 13.06.2014. год, одлуком Факултета под бр. 15/372-13.06.2014. год. у саставу:

Име и презиме члана Комисије

Звање

Научна област

1) Др Весна Мандушић

Научни сарадник,
Универзитет у Београду-
Институт за нуклеарне науке
„Винча“

Молекуларна биологија

2) Др Горан Брајушковић

Ванредни професор,
Универзитет у Београду-
Биолошки факултет

Биохемија и
молекуларна
биологија

3) Др Јелена Сопта

Доцент,
Универзитет у Београду-
Медицински факултет

Патологија, онкологија
мезенхималних
тумора

Наставно-научно веће Биолошког факултета Универзитета у Београду прихватило је извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата: Радослава С. Давидовића, на IX редовној седници одржаној 15. јула 2014. године.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

Прилог:

- 1. Извештај Комисије са предлогом.**
- 2. Акт Наставно-научног већа факултета о усвајању извештаја**



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 16
11000 БЕОГРАД
Република СРБИЈА
Тел: +381 11 2186 635
Факс: +381 11 2638 500
Е-пошта: dekanat@bio.bg.ac.rs

15/453-15.07.2014.

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 59. став 1. тачка 1. Статута Универзитета у Београду-Биолошког факултета, Наставно-научно веће Факултета, на IX редовној седници одржаној 15.07.2014. године, донело је

О Д Л У К У

Прихвата се Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата:

Радослава С. Давидовића, под називом:

„Анализа мутационог статуса гена *p53* и метилационог статуса промотора гена *p14* и *p16* у липосаркомима“.

Универзитет је дана 27.02.2014. године, својим актом под бр. 02 Број: 61206-6268/3-14 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

- 1. Davidović, R., Sopta, J., Mandušić, V., Krajnović, M., Stanojević, M., Tulić, G., Dimitrijević, B., 2013. p14(ARF) methylation is a common event in the pathogenesis and progression of myxoid and pleomorphic liposarcoma. Med. Oncol. 30, 682. doi:10.1007/s12032-013-0682-9 (M23, ИФ=2,147)..**
- 2. Davidović, R., Božović, A., Mandušić, V., Krajnović, M., 2014. Methylation-specific PCR: four steps in primer design. Cent. Eur. J. Biol. doi:10.2478/s11535-014-0324-z. (M23, ИФ=0,818)**

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

Доставити:

- Универзитету у Београду,
- докторанту,
- Стручној служби Факултета.

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

На VIII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 13. 6. 2014. године, прихваћен је извештај ментора др Весне Мандушић и др Горана Брајушковића о урађеној докторској дисертацији кандидата Радослава С. Давидовића, истраживача сарадника Института за нуклеарне науке „Винча“, под следећим насловом: „Анализа мутационог статуса гена *p53* и метилационог статуса промотора гена *p14* и *p16* у липосаркомима“. Сходно томе одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у следећем саставу:

1. др Весна Мандушић, научни сарадник Института за нуклеарне науке „Винча“
2. др Горан Брајушковић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду
3. др Јелена Сопта, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска, дисертација Радослава Давидовића под насловом „Анализа мутационог статуса гена *p53* и метилационог статуса промотора гена *p14* и *p16* у липосаркомима“, урађена је у Лабораторији за радиобиологију и молекуларну генетику Института за нуклеарне науке „Винча“. Рад је био финансијски подржан од стране Министарства просвете и науке Републике Србије током пројеката под ев. бројевима 143010 и 173049, којима је руководио и руководи др Богомир Димитријевић, научни саветник.

Докторска дисертација написана је, ћиричним писмом, на 97 страна и садржи 8 слика, 8 табела и 2 графика. Уводних страна (Насловна страна на српском и енглеском језику, Страна са информацијама о менторима и члановима комисије, Захвалница, Скраћенице, Резиме на српском и енглеском језику, Садржај) има 9. Дисертација се састоји из поглавља: Увод (20 страна, 5 слика), Циљеви рада (1 страна), Материјал и методе (15 страна, 4 табеле), Резултати (10 страна, 4 табеле, 2 графика и 3 слике), Дискусија (22 стране), Закључци (1 страна), Литература (14 страна, 196 референци). На крају дисертације су приложена следећа документа: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу (5 страна).

Анализа докторске дисертације:

Дисертација је подељена на следећих седам поглавља: Увод, Циљеви, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература.

Поглавље **Увод** даје увид у теоријске основе и концепте, који су помогли да се дефинишу експериментални циљеви тезе. Увод се може поделити у три целине, у којима се разматрају: опште карактеристике и подела липосаркома, основни концепти епигенетичке регулације експресије гена и улоге p53-p14 и p16-Rb сигналних путева у процесу туморигенезе.

У првом делу се, на јасан и целовит начин, излаже систематика и пато-хистолошке карактеристике следећа три подтипа липосаркома: а.) добродиферентовани / дедиферентовани, б.) миксоидни / округлоћелијски и в.) плеоморфни. Осим тога, укратко су изложена цитогенетичка обележја сваког подтипа, појединачно. Наглашене су промене како на хисто-патолошком тако и на цитогенетичком нивоу, које су од значаја за биолошко понашање тумора и диференцијалну дијагностику. Кратак преглед резултата клиничких студија, које су биле фокусиране на дефинисање прогностичких параметара, као и опис тренутног разумевања етиологије липосаркома, доприноси стварању свеобухватне слике о овом типу тумора мезенхималног порекла.

Други део даје кратак и целовит преглед основних механизма епигенетичке регулације експресије генске активности. Описани су улога и значај метилације молекула ДНК, модификације хистона и малих некодирајућих РНК у процесу неопластичне трансформације. На овај део се логички наставља трећа целина, која описује значај p53-p14 и p16-Rb сигналних путева у туморигенези. Предочене су све релеватне информације о улози и значају протеинских продуката гена *p14*, *p16* и *p53* у контроли ћелијског циклуса и

пролиферације ћелија. Такође, представљена су сазнања о учесталости алтерација ових гена у различитим типовима малигних тумора.

На основу досадашњих сазнања, циљеви су логички и јасно дефинисани на следећи начин:

1. Установити учесталост мутација гена p53 и хиперметилације промотора гена p14 и p16 у анализираној групи узорака липосаркома.
2. Утврдити да ли постоје разлике, у квалитативном и квантитативном смислу, у алтерацијама које захватају p53-p14 и p16-Rb сигналне путеве, између различитих подтипова липосаркома.
3. Корелисати ове алтерације са стандардним прогностичким параметрима липосаркома (пол, старосна доб, величина и градус тумора).
4. Демонстрирати *in silico* протокол за процену подесности прајмера у ланчаној реакцији полимеразе специфичне за метиловани алел.

Поглавље **Материјал и методе** даје приказ метода које су кориштене у студији. Изолација молекула геномске ДНК вршена је класичном фенол-хлороформском методом из узорака ткива, као и из лимфоцита периферне крви здравих особа. У сврху анализе метилационог статуса промотора гена *p14* и *p16* изолована геномска ДНК је подвргнута процесу бисулфитне модификације. Након тога, метилациони статус промотора циљних гена одређиван је методом МСП (енг. *Methylation Specific PCR*). Као неметилована контрола послужила је ДНК изолована из лимфоцита периферне крви здравих особа, док је као метилована контрола кориштена ДНК, која је претходно метилована *in vitro*. Подесност прајмера специфичних за метиловани алел проверена је предложеним *in silico* протоколом. Мутациона анализа гена *p53* урађена је методом директног секвенцирања, чему је претходило умножавање фрагмената молекула ДНК који садрже егзоне 5-8 гена *p53* методом ланчане реакције полимеразе.

Експресија протеина p16, p53, циклин D1 и Ki-67 анализирана је применом имунохистохемијске методе. За протеине p16 и циклин D1 експресија је оцењивана квалитативно, док је у случају друга два протеина процена експресије била семиквантитативна.

Статистичка анализа добијених резултата подразумевала је примену следећих статистичких тестова: Фишеров тест тачне вероватноће (*Fisher exact test*), МекНемаров χ квадратни тест (*McNemar's test*), Ман-Витнијев тест (*Mann-Whitney test*), Данов тест (*Dunn's*

test). За обраду података коришћен је лиценцирани програм за статистичку обраду Сигма плот 10.0 (*Sigma plot 10.0*).

Поглавље **Резултати** садржи систематизоване резултате истраживања, чији је приказ пропраћен одговарајућим сликама, табелама и графиконима. На почетку поглавља сумирани су подаци о броју испитаника у студији, броју и типу узорака, као и њихове клиничко-патолошке карактеристике. У делу где су изложени резултати мутационе анализе гена *p53*, дате су и информације о последицама сваке детектоване мутације на функционалност протеина *p53*. Информације су добијене претрагом базе података мутација гена *p53* (www.p53.fr/TP53Mutload/TP53Mutload.html). Представљени су и резултати *in silico* анализе подесности прајмера за употребу у студијама које за тему имају анализу метилованих секвенци молекула ДНК. Даље су приказани резултати метилационе анализе промотора гена *p14* и *p16*. На крају поглавља дата је анализа међузависности испитиваних параметара. Корелација између параметара представљена је графиконима.

Резултати експресионе анализе гена *p53* показали су да повећан ниво експресије протеина *p53* није карактеристичан само за округлоћелијску компоненту миксоидних липосаркома. Истовремено, мутације гена *p53* детектоване су само у чистим миксоидним липосаркомима. Закључено је да су алтерације гена *p53* редак догађај у оквиру миксоидног подтипа, који је карактеристичан за ране фазе патогенезе ових тумора. Сви плеоморфни липосаркоми показали су повећану експресију протеина *p53*. С обзиром на то као и на резултате претходних студија, претпостављено је да је абератна експресија протеина *p53* конститутивна одлика овог подтипа липосаркома. Мутације су детектоване у само два плеоморфна липосаркома. Ово је објашњено високом учесталошћу метилације промотора гена *p14*, која је детектована у плеоморфном и миксоидном подтипу.

Ово је била прва студија која је анализирала метилациони статус гена *p14* у плеоморфним и добродиферентованим липосаркомима. Значајно је истаћи и податак да је ово прво истраживање које је испитивало метилациони статус гена *p14* у патогенези миксоидних липосаркома код испитаника припадника кавкавске популације. Показано је да је метилација гена *p14* чест догађај у миксоидним липосаркомима. За разлику од претходне студије, која је сугерисала значај метилације промотора овог гена у каснијим фазама туморигенезе, резултати ове студије показују да се метилација гена *p14* јавља рано током развоја миксоидних липосаркома. Слично као у миксоидном подтипу, установљено је да је метилација гена *p14* чест догађај и у плеоморфном подтипу. С обзиром да мутација гена *p53* и метилација гена *p14* не јављају истовремено у плеоморфним липосаркомима, док је случај обрнут код миксоидног подтипа, изнета је претпоставка да ген *p14* игра различите улоге у

патогенези ова два подтипа тумора.

Испитивање метилационог статуса гена *p16* показало је да је овај догађај редак у липосаркомима као групи. Међутим, значајан је налаз да је промотор гена *p16* метилован само у рецидивима тумора. На основу добијених резултата закључено је да је метилација гена *p16*, за разлику од друга два подтипа, значајна у малигној прогресији плеоморфних липосаркома.

Анализа експресије протеина p16, имунохистохемијском методом, показала је да је повећан ниво експресије овог протеина чест догађај у сва три подтипа липосаркома. Значај овог налаза тумачен је узимајући у обзир битно различиту молекуларну основу три подтипа липосаркома. Разматрајући и резултате сличних студија, закључено је да је повећана експресија протеина p16 у миксоидном подтипу повезана са феноменом ћелијског старења. Ова теза је подржана налазом да је циклин D1 у свим случајевима, осим једног, експримиран истовремено са протеином p16. Такође, литературни подаци показују високу експресију циклин зависних киназа у овом подтипу липосаркома. Плеоморфни липосаркоми су показали абератну експресију p16 у свим испитиваним узорцима. Овај резултат протумачен је као знак узрапредовале малигне трансформације тумора.

Добијени резултати подржани су налазом да експресија пролиферативног фактора једарног протеина Ki-67 показује јасну асоцијацију са експресијом протеина p16. С обзиром на мали број узорака добродиферентованих липосаркома у студији, није било могуће изнети закључак о потенцијалној улози протеина p16 у патогенези овог подтипа липосаркома. Међутим, постоје индиције да експресија протеина p16 показује негативну корелацију са експресијом протеина p53. Истовремено, резултати ове студије показали су да је експресија пролиферативног фактора Ki-67 у позитивној корелацији са градусом липосаркома као и са експресијом протеина p16 и p53.

Показано је да је повећана експресија циклина D1 рани догађај у сва три подтипа липосаркома. Утврђена је знатно већа учесталост абератне експресије циклина D1 у плеоморфном и миксоидном подтипу него у сличним студијама других тимова. У случају плеоморфних липосаркома разлике у добијеним резултатима могуће је објаснити величином узорка, док је у случају миксоидних липосаркома није било могуће дати једноставно објашњење.

Поглавље **Дискусија** може се поделити на три дела. Први део садржи уводне напомене о важности p53-p14 и p16-Rb сигналних путева у саркомима, као и о проблемима са којима су суочени истраживачи у студијама које укључују липосаркоме. Други део је

анализа добијених резултата, као и поређење са резултатима претходних студија. Трећи део се бави разматрањем оправданости методолошког приступа примењеног за оцену метилационог статуса промотора гена *p14* и *p16*. Наиме, у оквиру дискусије разматрана је оправданост употребе методе МСП у метилационим студијама, у светлу примедби одређеног броја аутора да је метода непоуздана. Показано је да је у већини случајева где је метода дала лажно позитивне резултате, у питању био лош дизајн прајмера. С обзиром на то, предложен је једноставан *in silico* протокол, који може да послужи како за квалитетнији дизајн прајмера тако и за проверу већ дизајнираних прајмера.

У поглављу Закључци на основу представљених резултата изнети су, на јасан и концизан начин, следећи закључци:

1. Промене у сигналним путевима p53-p14 и p16-Rb могу имати значаја у патогенези сва три подтипа липосаркома.
2. Мутације гена *p53* нису детектоване у добродиферентованим липосаркомима, док су у остала два подтипа релативно редак догађај.
3. Метилација промотора гена *p14* чест је догађај у миксоидном и плеоморфном подтипу и вероватно је рани догађај током развоја тумора.
4. Метилација промотора гена *p16* потенцијално је значајна за касније фазе еволуције плеоморфних тумора, док у остала два подтипа није од значаја за туморигенезу.
5. Промене на нивоу експресије протеина p16 и циклина D1 рани су догађаји током развоја сва три подтипа липосаркома.
6. Експресија пролиферативног фактора Ki-67 корелише са градусом испитиваних тумора и добар је показатељ њиховог малигног потенцијала.
7. Предложени *in silico* протокол може да помогне да се препознају прајмери ниског квалитета и избегну лажно позитивни резултати у студијама који за тему имају анализу метилованих секвенци молекула ДНК..

На крају се налази поглавље Литература у коме се налазе, поређане по абecedном реду, библиографске јединице цитиране у дисертацији.

Радови из докторске дисертације:

3. **Davidović, R.**, Sopta, J., Mandušić, V., Krajnović, M., Stanojević, M., Tulić, G., Dimitrijević, B., 2013. p14(ARF) methylation is a common event in the pathogenesis and

progression of myxoid and pleomorphic liposarcoma. Med. Oncol. 30, 682. doi:10.1007/s12032-013-0682-9 (M23, ИФ=2,147)..

4. **Davidović, R.**, Božović, A., Mandušić, V., Krajnović, M., 2014. Methylation-specific PCR: four steps in primer design. Cent. Eur. J. Biol. doi:10.2478/s11535-014-0324-z. (M23, ИФ=0,818)

Библиографија:

1. Krajnovic, M., Radojkovic, M., **Davidovic, R.**, Dimitrijevic, B., Krtolica, K., 2013. Prognostic significance of epigenetic inactivation of *p16*, *p15*, *MGMT* and *DAPK* genes in follicular lymphoma. Med. Oncol. 30, 441. (M23, ИФ=2,147)
2. Tanic, N., Milovanovic, Z., Tanic, N., Dzodic, R., Juranic, Z., Susnjar, S., Plesinac-Karapandzic, V., Tatic, S., Dramicanin, T., **Davidovic, R.**, Dimitrijevic, B., 2012. The impact of PTEN tumor suppressor gene on acquiring resistance to tamoxifen treatment in breast cancer patients. Cancer Biology & Therapy 13, 1165-1174. (M22, ИФ=3,287).

Мишљење и предлог комисије:

Докторска дисертација Радослава С. Давидовића под називом „Анализа мутационог статуса гена *p53* и метилационог статуса промотора гена *p14* и *p16* у липосаркомима“ даје оригиналан допринос истраживањима у области молекуларне генетике липосаркома. Поред тога што је ово прва студија која за предмет истраживања има испитивање молекуларно генетичких карактеристика липосаркома у групи болесника из популације Србије, ово је прво истраживање где је испитиван метилациони статус промотора гена *p14* у плеоморфним и добродиферентованим липосаркомима. Вредност дисертације огледа се у неколико налаза. Први је да су промене у сигналним путевима *p53-p14* и *p16-Rb* присутне у свим типовима липосаркома, с тим да се број промена на нивоу гена и/или експресије протеина повећава са степеном малигне трансформације тумора. Такође, од значаја је налаз да су промене на нивоу гена *p14* и *p53* рани догађаји током туморигенезе миксоидних липосаркома, а да вероватно немају битну улогу у процесу формирања округлоћелијске компоненте тумора. Ова студија је прва која је показала да је метилација промотора гена *p16* присутна у каснијим фазама еволуције плеоморфних липосаркома.

Кандидат је показао добро познавање проблематике у области којом се бави.

Истраживање је добро организовано, уз јасно постављене циљеве. Изабрани методолошки приступи били су одговарајући, с обзиром на циљеве које је требало остварити. Добијени резултати су коректно анализирани и поређени су са налазима из других студија. Изведени закључци су јасни и концизни и имају упориште у експерименталним резултатима.

На основу свега наведеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације Радослава С. Давидовића.

У Београду, 17.06.2014.год.

Комисија:

Др Весна Мандушић, научни сарадник,
Институт за Нуклеарне Науке „Винча“,
Универзитет у Београду

Др Горан Брајушковић, ванредни професор,
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

Др Јелена Сопта, доцент,
Медицински факултет, Универзитет у Београду