

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На I редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 14.10.2016. године, прихваћен је извештај ментора др Снежане Којић и др Драгице Радојковић о урађеној докторској дисертацији **Јоване Г. Јаснић (претходно презиме Јаснић-Савовић)**, истраживача сарадника у Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду, под насловом „**Одређивање профила експресије и унутарћелијске локализације протеина ANKRD2 у срцу и скелетним мишићима човека**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу др Снежана Којић, виши научни сарадник Института за Молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, др Душанка Савић-Павићевић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Драгица Радојковић, научни саветник Института за Молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду. Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и на основу анализе приложене докторске дисертације Већу подноси следећи:

### ИЗВЕШТАЈ

#### 1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација **Јоване Г. Јаснић (претходно презиме Јаснић-Савовић)** под насловом „**Одређивање профила експресије и унутарћелијске локализације протеина ANKRD2 у срцу и скелетним мишићима човека**“, написана је на 179 страна, у оквиру којих се налази 9 табела и 35 слика. У докторској дисертацији је цитирано 192 извора литературе. 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 по поглављима, Литературу, Биографију аутора и Прилоге. Текст дисертације садржи следећа поглавља: **Увод** (27 страна), **Циљ рада** (2 стране), **Материјал и методе** (25 страна), **Резултати** (36 страна), **Дискусија** (17 страна), **Закључци** (3 стране) и **Литература** (16 страна). Поред наведеног у прилогу садржи: Биографију аутора, Изјаву о ауторству, Изјаву о истовестности штампане и електронске верзије докторске дисертације, Изјаву о коришћењу, као и одштампана два научна рада објављена у научним часописима са ISI листе који су директно проистекли из докторске дисертације.

#### 2. АНАЛИЗА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Поглавље **Увод** садржи четири потпоглавља и у њему је дат сажет приказ досадашњих сазнања из литературе која су непосредно везана за предмет докторске дисертације. Описане су опште карактеристике срчаног и скелетних мишића, грађа

саркомере, и дат је преглед протеина који улазе у њен састав. Посебно поглавље је посвећено протеинима саркомере који су укључени у пренос механичких сигнала и налазе се у мултипротеинским комплексима, сигналозомима. Затим су детаљно описане структурне и функционалне карактеристике механосензора И-траке саркомере, мишићних протеина са анкиринским поновцима - MARP протеина, међу које спада и протеин ANKRD2 који је предмет ове докторске тезе. Кандидаткиња је детаљно описала структуру, унутарћелијску локализацију, експресију и функције протеина ANKRD2, као и карактеристике гена *Ankrd2* и механизме његове регулације. Такође су изнети постојећи подаци везани за изоформе протеина ANKRD2 који су наведени у протеинским базама података и литератури. У овом делу кандидаткиња је дефинисала и именовала изоформе које је анализирала у овој тези. На крају уводног дела протеин ANKRD2 је описан као потенцијални дијагностички маркер и наведене су болести у којима је измењена његова експресија.

У поглављу **Циљеви рада** дефинисана су четири главна научна циља докторске дисертације:

-да се одреде профил експресије и унутарћелијска локализације протеина ANKRD2 у срцу човека и да се упореде са параметрима протеина ANKRD1,

-да се испита адекватност модел система кардиомиоцита неонаталних пацова (КМНП) за изучавање срчано-специфичне функције ANKRD2,

-да се утврде експресиони профил и унутарћелијска локализација изоформи ANKRD2 у срцу и скелетним мишићима човека и

-да се утврди механизам регулације експресије изоформи ANKRD2.

У поглављу **Материјал и методе** наведене су хемикалије и апарати који су коришћени у раду, и описани су методолошки поступци које је кандидаткиња применила током израде тезе, а који се односе на рад са бактеријама, ћелијама, протеинима, ДНК и РНК. Ово поглавље је започето подацима о субјектима чија су ткива коришћена у овој тези, експерименталним животињама, сојевима бактерија, плазмидним конструкторима, граничницима, антителима и ћелијским линијама, а наведени су и хемијски агенси и компјутерски програми. Следи опис експерименталних метода које су коришћене при раду са бактеријама (методе култивације и изолације плазмидне ДНК, експресија рекомбинантних протеина у бактеријама и њихово пречишћавање), методе рада са ћелијама (култивација ћелија, изолација примарних КМНП, транзијентна трансфекција, третман ћелија доксорубицином и одређивање вијабилности ћелија МТТ тестом), методе рада са РНК и ДНК (методе изолације РНК из ткива и ћелија, реверзна транскрипција, ланчано умножавање ДНК полимеразом (PCR), квантитативни PCR у реалном времену (qRT-PCR) и електрофореза ДНК фрагмената), методе рада са протеинима (припремање протеинских екстраката из ћелија и ткива и одређивање њихове концентрације, електрофореза и визуелизација протеина на полиакриламидним геловима, western blot и есеј имуноадсорпције), имуноцитохемија, имунохистохемија, методе рада на микроскопу (конфокална и DIC микроскопија) и статистичка обрада добијених резултата.

У поглављу **Резултати** су изложени резултати истраживања груписани у четири целине и прегледно документовани сликама и табелама које су јасно објашњене у легендама. У првом делу је описана анализа специфичности антитета за детекцију протеина ANKRD2 и његових изоформи. У ову сврху примењено је неколико различитих

приступа као што су тестирање антитела на протеинима експримираним у прокариотском систему, на рекомбинантним протеинима егзогено експримираним у еукариотском систему и есеј имуноадсорпције, чиме је обезбеђена поузданост резултата. Друга целина је посвећена одређивању профила експресије и унутарћелијске локализације протеина ANKRD2 у срцу. Детаљно је анализирана локализација ANKRD2 у интеркалирајућим дисковима (ИКД) који представљају нову структуру у којој је овај протеин локализован. У трећој целини су приказани резултати евалуације КМНП као адекватног модел система за изучавање протеина функције ANKRD2 у срцу. Показано је да је профил експресије Ankrd2 у КМНП веома сличан профилу у срцу човека, и да зависи од степена зрелости кардиомиоцита. Утврђено је и да кардиотоксични агенс доксорубицин не утиче на ниво експресије Ankrd2. Четврта целина резултата је посвећена карактеризацији изоформи протеина ANKRD2, S-ANKRD2 и M-ANKRD2. Показано је да, осим бројних сличности, изоформе имају неједнаку експресију, дистрибуцију и унутарћелијску локализацију у срцу и скелетним мишићима, док трећа изоформа L-ANKRD2 није детектована. Такође је установљено да је експресија S-ANKRD2 и M-ANKRD2 регулисана на транскрипционом нивоу. Приказани резултати веома уверљиво указују да је S-ANKRD2 доминантна изоформа у попречно пругастим мишићима човека и да највише доприноси генералном профилу експресије протеина ANKRD2.

У поглављу **Дискусија** дата је упоредна анализа оригиналних резултата ове докторске дисертације и података из литературе. Кандидаткиња је прво дискутовала стабилност биомолекула изолованих из узорака посмртних ткива човека које је користила за анализу протеина ANKRD2. Затим су поређени нови резултати о експресији протеина ANKRD2 у срцу човека са постојећим. Посебна пажња је посвећена локализацији ANKRD2 у интеркалирајућим дисковима кардиомиоцита која иде у прилог претпоставци да су протеини MARP фамилије укључени у међућелијску комуникацију. Такође је указано на откриће да локализација ANKRD2 у ИКД има улогу у патолошком механизму који лежи у основи дилатираних кардиомиопатије. Даље су дискутовани кардиомиоцити неонаталних пацова као модел систем за проучавање функције гена који се специфично експримирају у срцу и потенцијални разлози различитог деловања доксорубицина на експресију протеина ANKRD2 и ANKRD1. У дискусији је посебан акценат стављен на изоформе ANKRD2 у срцу и скелетним мишићима човека, с обзиром на оскудне податке у литератури. Кандидаткиња је прегледно структурирала добијене резултате о изоформама и сумирала их шематски. У последњем одељку овог поглавља је дискутован веома важан резултат који се односи на механизам настанка изоформи ANKRD2, којим је оповргнута хипотеза из литературе да су оне продукт транслације једне иРНК са алтернативних старт кодона.

У поглављу **Закључци**, сажето и јасно су изнети најважнији закључци до којих је кандидаткиња дошла анализирањем добијених експерименталних резултата на основу којих је потврђено да су остварени постављени циљеви и потврђене хипотезе докторске дисертације. На основу добијених резултата донето је укупно седамнаест закључака подељених у три целине. Закључци потврђују актуелност истраживања, истичу значај добијених резултата, и представљају полазну основу за будућа истраживања. Анализом профила експресије и локализације протеина ANKRD2 у срцу човека закључено је следеће: ANKRD2 је експримиран у срцу човека у мањој мери у односу на ANKRD1;

ANKRD2 је локализован у саркомери кардиомиоцита човека слично протеину ANKRD1; ANKRD2 је детектован само у једрима кардиомиоцита срца које је показивало карактеристике благе хипертрофије и интеркалирајући дискови кардиомиоцита човека су идентификовани као нова места локализације протеина ANKRD2 и ANKRD1. На основу евалуације кардиомиоцита као модел система за проучавање протеина ANKRD2 у срцу је закључено да је протеин Ankrd2 експримиран у кардиомиоцитима неонаталних пацова, да је ендогени Ankrd2 локализован и у цитоплазми и у једру кардиомиоцита неонаталних пацова, да је локализација егзогеног ANKRD2 експримираног у кардиомиоцитима неонаталних пацова зависна од степена зрелости кардиомиоцита и да кардиотоксични агенс доксорубин не доводи до промене нивоа експресије Ankrd2. Анализом изоформи ANKRD2 у попречно-пругастим мишићима човека кандидаткиња је дошла до следећих закључака: да постоји разлика у расподели изоформи ANKRD2 у попречно-пругастим мишићима човека; да се изоформа S-ANKRD2 више експримира у скелетном мишићу, док је изоформа M-ANKRD2 доминантнија у срцу; да постоји разлика у експресији изоформи ANKRD2 у спорим и брзим влакнима скелетних мишића човека; да се изоформа S-ANKRD2 специфично експримира у спорим влакнима, док је изоформа M-ANKRD2 скоро униформно распоређена у брзим и спорим влакнима; да изоформе S-ANKRD2 и M-ANKRD2 имају сличну саркомерну локализацију у ћелијама скелетних мишића човека, док је локализација M-ANKRD2 израженија у једру мишићне ћелије у односу на S-ANKRD2; да су изоформе S-ANKRD2 и M-ANKRD2 у кардиомиоцитима човека преференцијално локализоване у саркомери; да је S-ANKRD2 доминантна изоформа у ИКД кардиомиоцита човека; да у попречно-пругастим мишићима човека није детектована изоформа LANKRD2; да су изоформе S-ANKRD2 и M-ANKRD2 продукти транслације са две иРНК; да је изоформа S-ANKRD2 доминантна у попречно-пругастим мишићима човека и највише доприноси општем профилу експресије протеина ANKRD2 те је треба прогласити канонском; да су у миобластима човека изоформе S-ANKRD2 и M-ANKRD2 детектоване у једру, док се у миотубама S-ANKRD2 експримира само у цитоплазми, а M-ANKRD2 и у једру и у цитоплазми што указује на различиту функцију изоформи ANKRD2 у процесу диференцијације мишићних ћелија.

У поглављу **Литература** дата је листа од 192 библиографске јединице. Наведене научне публикације се односе на области које су од значаја за предмет дисертације и цитиране су на начин који објашњава, контекстуализује и потврђује добијене резултате. Списак литературе је адекватан, актуелан и довољно широк да покрива све аспекте истраживања и разматрана питања. Навођења литературе у самом тексту дисертације су јасна и примерена, како по садржају тако и по месту.

### **3. БИБЛИОГРАФИЈА**

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

Б1. Радови у часописима међународног значаја

**1. M21a - Jasnica-Savovic J**, Krause S, Savic S, Kojic A, Kovcic V, Boskovic S, Nestorovic A, Rakicevic L, Schreiber-Katz O, Vogel JG, Schoser BG, Walter MC, Valle G, Radojkovic D,

Faulkner G, Kojic S. (2016). Differential expression and localization of Ankrd2 isoforms in human skeletal and cardiac muscles. *Histochem Cell Biol*, 146(5):569-584.

**2. M21a - Jasnic-Savovic J**, Nestorovic A, Savic S, Karasek S, Vitulo N, Valle G, Faulkner G, Radojkovic D, Kojic S. (2015). Profiling of skeletal muscle Ankrd2 protein in human cardiac tissue and neonatal rat cardiomyocytes. *Histochem Cell Biol*, 143(6):583-597.

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

**1. M34 - Kojic S, Martinelli V, Jasnic-Savovic J**, Rakicevic Lj, Nestorovic A, Radojkovic D and Faulkner G. Expression profile of striated muscle signaling protein Ankrd2 in neonatal rat cardiomyocytes and its putative role in heart function and development. The Arturo Falaschi Conference Series on Molecular Medicine, *Frontiers in Cardiac and Vascular Regeneration*, Trieste, Italy, May 30-June 2, 2012, Book of Abstracts, p. 71.

**2. M34 - Jasnic Savovic J**, Vitulo N, Krause S, Nestorovic A, Vogel J, Schreiber-Katz O, Savic S, Karasek S, Radojkovic D, Schoser B, Walter MC, Valle G, Faulkner G and Kojic S. Uneven distribution of two human Ankrd2 isoforms between skeletal and cardiac muscle. 44<sup>th</sup> European Muscle Conference, *Muscle Research in Health and Disease*, Warsaw, Poland, September 21-25, 2015, Book of Abstracts, p. 37.

**3. M34 - Jasnic-Savovic J**, Krause S, Savic S, Kojic A, Kovcic V, Boskovic S, Nestorovic A, Rakicevic Lj, Schreiber-Katz O, Vogel JG, Schoser BG, Walter MC, Valle G, Radojkovic D, Faulkner G, Kojic S. Differential expression and localization of Ankrd2 isoforms in human skeletal and cardiac muscles. Conference on Structure and Dynamics of the Sarcomere, Belgrade, Serbia, May 4-6, 2016, Book of Abstracts, p. 52 (**усмена презентација**).

#### 4. МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Докторска дисертација кандидаткиње **Јоване Г. Јаснић**, под насловом „**Одређивање профила експресије и унутарћелијске локализације протеина ANKRD2 у срцу и скелетним мишићима човека**“ представља оригиналан научни рад са јасно дефинисаним циљевима заснованим на добром познавању научне проблематике и са адекватно планираним и успешно реализованим истраживачким поступком. Резултати ове тезе представљају значајан научни допринос разумевању протеина ANKRD2 и његових изоформи у срцу и скелетним мишићима човека.

У изради дисертације Јована Г. Јаснић је показала иницијативу и висок степен самосталности како у експерименталном раду тако и при тумачењу добијених резултата које је критички дискутовала, у односу на податке из литературе.

Треба нагласити да су остварени резултати објављени у оквиру два оригинална научна рада категорије M21a, што потврђује њихову актуелност и значајност. Резултати ове дисертације су практично изворног типа и отварају нове проблематике које се односе на функционалне студије протеина ANKRD2 и његових изоформи.

На основу увида у експериментални рад, постигнуте резултате као и написану докторску тезу, Комисија закључује да су задаци постављени у циљевима испуњени у

потпуности, тако да позитивно оцењује докторску тезу и има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета, Универзитета у Београду, да прихвати позитивну оцену докторске дисертације **Јоване Г. Јаснић** под насловом „**Одређивање профила експресије и унутарћелијске локализације протеина ANKRD2 у срцу и скелетним мишићима човека**“ и омогући кандидаткињи јавну одбрану рада.

У Београду, 07. 11. 2016. године.

**КОМИСИЈА:**

---

др Снежана Којић, виши научни сарадник  
Института за молекуларну генетику  
и генетичко инжењерство Универзитета у Београду

---

др Душанка Савић-Павићевић, ванредни професор  
Биолошког факултета Универзитета у Београду

---

др Драгица Радојковић, научни саветник  
Института за молекуларну генетику  
и генетичко инжењерство Универзитета у Београду

---