

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На IV редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 26.01.2018. године, прихваћен је извештај ментора др Јелене Поповић и академика Милене Стевановић о урађеној докторској дисертацији **Данијеле Д. Станисављевић**, Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, под насловом „**Анализа експресије и улоге хуманог гена *SOX14* у неуралној диференцијацији *in vitro* и регулацији малигног фенотипа**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу др Јелена Поповић, научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, академик Милена Стевановић, научни саветник, Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, редовни професор, Универзитет у Београду- Биолошки факултет, др Душанка Савић Павићевић, редовни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

### ИЗВЕШТАЈ

#### Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Данијеле Станисављевић је оригинално истраживање које за тему има анализу експресије и улоге хуманог гена *SOX14* у процесу неуралне диференцијације *in vitro* ембрионалних карциномских плурипотентних ћелијских линија пореклом од човека и миша, као и идентификацију улоге овог гена у процесима који карактеришу малигни фенотип ћелија пореклом од карцинома грлића материце.

Докторска дисертација Данијеле Станисављевић је урађена у Лабораторији за хуману молекуларну генетику на Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду.

Дисертација је написана на 185 страна, садржи 63 слике и 5 табела. 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, Скраћенице, Садржај, Текст по поглављима и Прилоге. Текст дисертације садржи следећа поглавља: Увод (странице 1-52), Циљеви рада (странице 52-54), Материјал и методе (странице 54-85), Резултати (странице 85-139), Дискусија (странице 139-163), Закључци (странице

163-164) и Литература (странице 164-185). У оквиру Прилога се налазе: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу. У докторској дисертацији је цитирано 322 извора литературе.

### **Анализа докторске дисертације:**

Предмет првог дела докторске дисертације је анализа експресије и улоге гена *SOX14/Sox14* у процесу неуралне диференцијације *in vitro* у ћелијским линијама пореклом од ембрионалних тератокарцинома човека и миша. Наведене ћелијске линије имају одлике плурипотентних ћелија, које се под дејством ретиноичне киселине диференцирају у зреле, функционалне неуроне и представљају добар модел систем за проучавање неурогенезе сисара. Предмет другог дела докторске дисертације је анализа улоге гена *SOX14* у ћелијским процесима везаним за малигни фенотип ћелија пореклом од карцинома грлића материце. Такође, анализирана је и улога овог гена у регулацији p53 сигналног пута.

У поглављу **Увод** приказана су досадашња сазнања из литературе која су организована у три потпоглавља. Потпоглавље 1 садржи опис литературних података који се односе на фамилију гена *SOX/Sox*, Потпоглавље 2 пружа литературни приказ развића нервног система, док је у Потпоглављу 3 дат литературни приказ сазнања о процесима који доводе до малигне трансформације ћелија, са посебним освртом на крацином грлића материце. У оквиру ових потпоглавља посебно су резимирана сазнања о генима у оквиру *SOXB* групе, њиховој улози у неуралном развићу и малигној трансформацији ћелије. Такође, детаљно је описан модел систем ембрионалних тератокарциномских ћелијских линија NT2/D1 и P19, које су коришћене у овој докторској дисертацији и истакнуте су одлике ових ћелија које их сврставају у добре модел системе за проучавање неурогенезе сисара. Поред тога, описан је карцином грлића материце који представља један од најчешћих гинеколошких малигнитета у Србији. Детаљно је описан p53 сигнални пут, тумор супресорска улога протеина p53 у ћелији, затим регулација експресије и функције овог протеина и његови циљни гени. Приказана су и досадашња сазнања о улози гена из фамилије *SOX* у настанку карцинома грлића материце и регулацији p53 сигналног пута.

Поглавље **Циљеви** садржи јасно дефинисане циљеве овог истраживања. Иако је ген *SOX14/Sox14* описан код бројних врста, његова улога у ћелијским процесима још увек није довољно позната. Како би се током израде ове докторске дисертације испитала експресија и улога једног од еволутивно најочуванијих *SOX* протеина, дефинисани су следећи циљеви:

1. Испитати експресију хуманог гена *SOX14* и мишијег гена *Sox14* током неуралне диференцијације плурипотентних ћелијских линија под дејством ретиноичне киселине *in vitro*.
2. Извршити упоредну анализу експресије гена *SOXB/SoxB* групе, маркера плурипотентности и маркера карактеристичних за различите фазе неуралне диференцијације.
3. Идентификовати типове диференцираних ћелија у којима се експримира *SOX14* методом имуноцитохемије.
4. Анализирати експресију и метилациони статус гена *SOX14* у комерцијалним ћелијским линијама пореклом од карцинома грлића материце.

5. Модулисати експресију гена *SOX14* у овим ћелијама и анализирати утицај његове измењене експресије на пролиферацију, ћелијски циклус, ћелијску смрт, миграцију и инвазију ћелија пореклом од карцинома грлића материце.

6. Идентификовати сигналне путеве у којима учествује транскрипциони регулатор *SOX14*.

У оквиру поглавља **Материјал и методе** дате су све информације неопходне за репродуковање експерименталних процедура. Прецизно су описани протоколи коришћени за неуралну диференцијацију NT2/D1 и P19 ћелија *in vitro*. Такође, описани су RT-PCR, qRT-PCR, Western blot и имуноцитохемија као методе коришћене за анализу експресије, како гена *SOX14*, тако и осталих гена који су проучавани током процеса неуралне диференцијације *in vitro* и у ћелијама пореклом од карцинома грлића материце. Детаљно је описан и рад са бактеријама, при чему су описане методе коришћене за клонирање гена *SOX14* (изолација плазмидне ДНК, дигестија плазмидне ДНК, лигација фрагмената ДНК и плазмидног вектора, припрема и трансформација компетентних бактерија). Описана је метода транзијентне трансфекције сисарских ћелија у култури, као и метода за извођење функционалних луциферазних есеја коришћењем различитих конструката који као репортер ген носе ген за луциферазу. Описан је и метилација специфични PCR коришћен за анализу метилационог статуса промотора гена *SOX14*. Такође, описана је и методологија коришћена за анализу утицаја повећане експресије гена *SOX14* на основне ћелијске процесе, као што су миграција, инвазија, пролиферација, ћелијски циклус и ћелијска смрт. За статистичку обраду података коришћен је статистички пакет SPSS.

Резултати настали током израде ове докторске дисертације су представљени у поглављу **Резултати**, које садржи два потпоглавља са следећим насловима:

1. Анализа експресије и улоге гена *SOX14/Sox14* током неуралне диференцијације *in vitro*
2. Анализа експресије и улоге хуманог гена *SOX14* у регулацији малигног фенотипа ћелија пореклом од карцинома грлића материце.

Добијени резултати су документовани схематским приказима и сликама.

У првом потпоглављу су приказани резултати везани за анализу процеса неуралне диференцијације NT2/D1 и P19 ћелија *in vitro*, праћењем различитих маркера диференцијације методама Western blot и имуноцитохемије. Добијени резултати су показали да се обе ћелијске линије успешно диференцирају у зреле неуроне и да представљају добар модел систем за анализу експресије гена *SOX14/Sox14* током процеса неуралне диференцијације *in vitro*. У овом потпоглављу су приказани и резултати анализе експресије осталих чланова SOXB групе и одабраних маркера плурипотентности (OCT4) и неуралних ћелија ( $\beta$ -III-Tubulin, MAP2 и GFAP) током неуралне диференцијације NT2/D1 и P19 ћелија *in vitro*. Методом имуноцитохемије анализирана је експресија SOX14 протеина на нивоу појединачних ћелија, како у недиференцираним, плурипотентним ћелијама, тако и у неуронима и ћелијама епителијалне морфологије које се добијају диференцијацијом NT2/D1 и P19 ћелија у присуству ретиноичне киселине.

У другом потпоглављу анализиран је метилациони статус и експресија гена *SOX14* у три комерцијално доступне ћелијске ћелије пореклом од карцинома грлића материце. У сврху анализе ефекта повећане експресије гена *SOX14* на основне ћелијске процесе, поменуте ћелијске линије су трансфектоване експресионим конструктом за овај ген. Највиши ниво ектопичне експресије постигнут је у HeLa ћелијама због чега је ова ћелијска линија одабрана као модел систем за даља истраживања. Поред експресионог конструкта за *SOX14* и контролног, празног вектора, коришћен је и експресиони

конструкт за доминантно негативни мутант SOX14 протеина. Анализиран је ефекат повећане експресије SOX14 протеина на следеће ћелијске процесе: миграцију, инвазију, пролиферацију, ћелијски циклус и ћелијску смрт. Добијени резултати су указали да повећана експресија SOX14 доводи до смањења пролиферације HeLa ћелија у култури, до повећања броја ћелија у апоптози, као и до заустављања ћелијског циклуса у G2/M фази. Индукција процеса апоптозе анализирана је проточном цитометријом, праћењем фрагментације ДНК у једрима и анализом експресије одабраних маркера апоптозе. У овом потпоглављу су такође приказани резултати утицаја повећане експресије SOX14 на активност промотора гена *TP53*, затим на ниво експресије p53 (на иРНК и на протеинском нивоу), на ниво фосфорилисане форме p53 протеина у ћелијама, као и на експресију одабраних циљних гена p53 транскрипционог регулатора. Резултати приказани у другом потпоглављу указују да SOX14 протеин има улогу тумор супресора у HeLa ћелијама као и да се овај тумор супресорски ефекат остварује регулацијом p53 сигналног пута.

У поглављу **Дискусија** дата је упоредна анализа добијених резултата и података из литературе. Добијени резултати су критички анализирани и интерпретирани, и јасно је сагледан њихов значај. Дискусија је добро структурирана и састоји се из два потпоглавља како би јасније пратила резултате приказане у тези. У оквиру првог потпоглавља дискутована је експресија и потенцијална улога гена *SOX14/Sox14* током процеса неуралне диференцијације NT2/D1 и P19 ћелија *in vitro*. У другом делу дискутована је тумор супресорска улога овог гена, као и његов потенцијални значај у супресији малигног фенотипа ћелија пореклом од карцинома грлића материце. Посебно је дискутована улога SOX14 у регулацији p53 сигналног пута у карциному грлића материце која је представљена схемом.

У поглављу **Закључци** су сажето и јасно изнети најважнији закључци до којих је кандидаткиња дошла анализирањем добијених експерименталних резултата. Добијени резултати су сумирани у укупно четрнаест закључака:

1. Експресија гена *SOX14/Sox14* расте током неуралне диференцијације ембрионалних карциномских ћелија NT2/D1 и P19 *in vitro*.
2. SOX14 и SOXB1 протеини имају преклапајући профил експресије током неуралне диференцијације NT2/D1 и P19 *in vitro*.
3. Изласком ћелија из стања плурипотентности и уласком у процес неуралне диференцијације, долази до повећања експресије SOX14 протеина. Ови резултати указује да овај протеин потенцијално може имати важну улогу у наведеном процесу и да ниво експресије SOX14 протеина може утицати на прелазак ћелија из плурипотентног у диференцирано стање.
4. SOX14 се експримира у плурипотентним ћелијама, неуронима, као и у другим типовима ћелија које се добијају током неуралне диференцијације NT2/D1 и P19 ћелија *in vitro*.
5. Експресија гена *SOX14* је потенцијално регулисана на пост-транскрипционом нивоу за сада непознатим механизмом у плурипотентним NT2/D1 и P19 ћелијама.
6. SOX14 има низак ниво експресије у ћелијама пореклом од карцинома грлића материце.
7. Промотор гена *SOX14* је метилован у ћелијама пореклом од карцинома грлића материце.
8. Повећана експресија SOX14 протеина не утиче на миграцију и инвазију HeLa ћелија.
9. Повећана експресија SOX14 протеина смањује пролиферацију и индукује застој у ћелијском циклусу и процес апоптозе у HeLa ћелијама.

10. SOX14 доводи до активације промотора гена *TP53* у HeLa ћелијама, али не утиче на ниво експресије овог гена.
11. SOX14 доводи до повећања нивоа ендогеног p53 протеина и његове фосфорилисане форме у HeLa ћелијама, што указује да SOX14 доприноси стабилизацији p53 протеина.
12. Повећана експресије SOX14 протеина индукује експресију p53 циљних геначиме је потврђено да је SOX14 протеин део p53 сигналног пута у HeLa ћелијама.
13. SOX14 остварује улогу тумор супресора у ћелијама пореклом од грлића материце.
14. Имајући у виду да је p53 сигнални пут компромитован присуством HPV вируса и да је повећана експресија SOX14 протеина довела до активације важног сигналног пута, индукција експресије SOX14 протеина у ћелијама пореклом од грлића материце може имати терапеутски значај.

### Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

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

1. **M21** - **Stanisavljevic D**, Petrovic I, Vukovic V, Schwirtlich M, Gredic M, Stevanovic M, Popovic J. SOX14 activates the p53 signaling pathway and induces apoptosis in a cervical carcinoma cell line. *PLoS One*. 2017 Sep 19;12(9):e0184686. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0184686>
2. **M21** - Popovic J, **Stanisavljevic D**, Schwirtlich M, Klajn A, Marjanovic J, Stevanovic M. Expression analysis of SOX14 during retinoic acid induced neural differentiation of embryonal carcinoma cells and assessment of the effect of its ectopic expression on SOXB members in HeLa cells. *PLoS One*. 2014 Mar 17;9(3):e91852. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0091852>

#### Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **M34** - Schwirtlich M, **Stanisavljević D**, Davidović S, Drakulić D, Klajn A, Stevanović M. Dynamic expression of SOXB1 transcription factors during in vitro-induced neural differentiation of human embryonal carcinoma (EC) cell line, NT2/D1. 6th Congress of the Serbian Neuroscience Society. Belgrade, Serbia, November 14-16, 2013. Book of abstracts: p 46.
2. **M34** - Marjanovic J., **Stanisavljevic D.**, Popovic J., Drakulic D., Mojsin M., Davidovic S., Petrovic I., Milivojevic M., Stevanovic M. Analysis of SOXB1 expression during neural differentiation of embryonal carcinoma NT2/D1 cells. GlowBrain Workshop „Application of biomaterials and in vivo imaging in stem cell research“. Zagreb, Republic of Croatia, March 27-29, 2014. Book of abstracts: p 68.

3. **M34 - Stanisavljevic D.**, Popovic J., Schwirtlich M., Klajn A., Marjanovic J., Topalovic V., Kovacevic Grujicic N., Stevanovic M. SOX14 is upregulated during neural differentiation of pluripotent embryonal carcinoma stem cells and expressed in both neuronal and non-neuronal cells. GlowBrain Workshop „Application of biomaterials and in vivo imaging in stem cell research“, Zagreb, Croatia, March 27-29, 2014. Book of abstracts: p 68.
4. **M34 - Stanisavljevic D.**, Schwirtlich M., Klajn A., Marjanovic J., Kovacevic Grujicic N., Topalovic V., Mojsin M., Stevanovic M. SOX14 downregulates SOX1 expression in HeLa cells. From Basic Research to Personalised Cancer Treatment, Munich, Germany, July 5- 8, 2014. Book of abstracts: p s56.
5. **M34 - Svirtlih M.**, Popovic J., **Stanisavljevic D.**, Klajn A., Marjanovic J., Stevanovic M. Expression analysis of SOX14 during neural differentiation of embrzonal carcinoma cells.9thÂ FENS Forum of Neuroscience. Milano, Italy, July 5-9, 2014. Book of abstracts: p 196.
6. **M34 - Marjanovic J.**, **Stanisavljevic D.**, Popovic J., Klajn A., Schwirtlih., Mojsin M., Petrovic I., Milivojevic M., Stevanovic M. Expression profile of SOXB1 during retinoic acid induced neural differentiation of embrzonal carcinoma NT2/D1 cells. Golden Helix Summer School Pharmacogenomics and Genomic Medicine: Bridging Research and the Clinic. Aegina island, Greece, September 11-15, 2014. Book of abstracts: p 103.
7. **M34 - Stanisavljevic D.**, Popovic J., Schwirtlich M., Klajn A., Marjanovic J., Topalovic V., Kovacevic Grujicic N., Stevanovic M. SOX14 expression during retinoic acid induced neural differentiation of pluripotent embryonal carcinoma stem cells. Golden Helix Summer School Pharmacogenomics and Genomic Medicine: Bridging Research and the Clinic, Aegina island, Greece, September 11-15, 2014. Book of abstracts: p 80.
8. **M34 - Stanisavljevic D.**, Popovic J., Schwirtlich M., Klajn A., Marjanovic J., Topalovic V., Kovacevic Grujicic N., Stevanovic M. Analasys of SOX14 expression during neural differentiation of pluripotent human and mouse embryonal carcinoma stem cells. V Congress Of The Serbian Genetic Society, Kladovo-Belgrade, Serbia, September 28-October 02, 2014. Book of abstracts: p 110.
9. **M34 - Stanisavljevic D.**, Popovic J., Schwirtlich M., Klajn A., Marjanovic J., Topalovic V., Kovacevic Grujicic N., Stevanovic M. SOX14 is not exclusively a neuronal marker. BIMLS, Belgrade International Molecular Life Science Conference for Students., Belgrade, Serbia, January 15-18, 2015. Book of abstracts: p 19.
10. **M34 - Stanisavljevic D.**, Petrovic I., Vukovic V., Schwirtlich M., Gredic M., Stevanovic M., Popovic J. SOX14 activates p53 signaling pathway and induces apoptosis in HeLa cells. 3rd Congress of the Serbian Association for Cancer Research (SDIR) with international participation “Challenges in anticancer research: translation of knowledge to improve diagnosis and treatment”, Belgrade, Serbia, October 6-7, 2017. Book of apstracts: p 56.

## Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација кандидаткиње **Данијеле Д. Станисављевић**, под насловом „**Анализа експресије и улоге хуманог гена *SOX14* у неуралној диференцијацији *in vitro* и регулацији малигног фенотипа**“, представља оригиналан научни рад са јасно дефинисаним циљевима заснованим на добром познавању научне проблематике и са адекватно планираним и успешно реализованим експериментима, уз поштовање етичких и научних норми. Остварени су задаци постављени у циљевима истраживања. Показано је да изласком ћелија из стања плурипотентности и уласком у процес неуралне диференцијације, долази до раста експресије SOX14 протеина, што указује да овај протеин потенцијално има важну улогу у наведеном процесу и да ниво експресије SOX14 може утицати на прелазак ћелија из плурипотентног у диференцирано стање. Такође, показано је да повећана експресија SOX14 протеина смањује пролиферацију и индукује процес апоптозе у HeLa ћелијама, доводи до повећања нивоа ендогеног p53 протеина и то његове фосфорилисане форме, а затим и до повећања експресије p53 циљних гена. Тиме је показано да је SOX14 део p53 сигналног пута и да путем регулације нивоа активне форме p53 протеина остварује улогу тумор супресора у ћелијама пореклом од карцинома грлића материце.

Добијеним резултатима постављена је основа за даља истраживања везана за улогу гена *SOX14* у процесу неуралне диференцијације и регулацији малигног фенотипа, не само у ћелијама пореклом од карцинома грлића материце, већ и другим типовима тумора.

**Данијела Д. Станисављевић** је кроз рад на докторској дисертацији показала висок степен самосталности, истраживачку зрелост, истрајност и самокритичност који су основ за успешно бављење истраживањем и који треба да буду одлика сваког кандидата који стиче звање доктора наука. Резултати приказани у овој дисертацији публиковани су у два оригинална рада и представљени на десет међународних скупова.

На основу увида у експериментални рад, постигнуте резултате као и написану докторску тезу, закључујемо да су задаци постављени у циљевима испуњени у потпуности и да добијени резултати имају велики значај у области хумане молекуларне генетике. Стога са задовољством предложемо Наставно-научном већу Биолошког факултета, Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену докторске дисертације

Данијеле Д. Станисављевић, под насловом „Анализа експресије и улоге хуманог гена *SOX14* у неуралној диференцијацији *in vitro* и регулацији малигног фенотипа“ и омогући кандидаткињи јавну одбрану рада.

**КОМИСИЈА:**

---

др Јелена Поповић, научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство)

---

академик Милена Стевановић, научни саветник, Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, редовни професор, Универзитет у Београду- Биолошки факултет

---

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

У Београду, 12.03.2018. године.