

**UNIVERZITET U BEOGRADU**  
**Tehnološko-metalurški fakultet**  
**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU**

**PREDMET:** Referat o urađenoj doktorskoj disertaciji kandidata Mr Jelene Gvozdrenović-Jeremić, dipl. inž.

Na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta od 30.05.2019. godine (Odluka br. ), imenovani smo za članove Komisije za ocenu doktorske disertacije kandidata Mr Jelene Gvozdrenović-Jeremić, dipl.inž. tehnologije, pod naslovom

**„Mehanizam nastanka heterotopne osifikacije i koncipiranje odgovarajućeg tretmana“**

Posle pregleda dostavljene disertacije i drugih pratećih materijala i razgovora sa Kandidatom, Komisija je sačinila sledeći:

**R E F E R A T**

**1. UVOD**

**1.1. Hronologija odobravanja i izrade disertacije**

Školske 2016/2017. godine kandidat Jelena Gvozdrenović-Jeremić, dipl. inž. tehnologije, upisala je doktorske akademske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, profil Biohemijsko Inženjerstvo i Biotehnologija.

28.07.2018. godine kandidat Jelena Gvozdrenović-Jeremić dipl. inž. tehnologije, je prijavila temu doktorske disertacije pod naslovom: „Mehanizam nastanka heterotopne osifikacije i koncipiranje odgovarajućeg tretmana“.

23.08.2018. godine, na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta doneta je Odluka (br. 35/297 od 23.08.2018) o imenovanju članova Komisije za ocenu podobnosti teme i kandidata Jelene Gvozdrenović Jeremić, dipl. inž. tehnologije, za izradu doktorske disertacije i naučne zasnovanosti teme: „Mehanizam nastanka heterotopne osifikacije i koncipiranje odgovarajućeg tretmana “.

20.09.2018 godine Nastavno-naučno veće Tehnološko-metalurškog fakulteta je donelo Odluku (br. 35/363) o prihvatanju referata Komisije za ocenu podobnosti teme : „Mehanizam nastanka heterotopne osifikacije i koncipiranje odgovarajućeg tretmana“ i kandidata Mr Jelene Gvozdrenović-Jeremić, dipl. inž. tehnologije, za izradu doktorske disertacije. Za mentora ove doktorske disertacije imenovana je dr Ljiljana Mojović, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Veće naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu jednoglasno je 29.10.2018 godine dalo saglasnost (odluka br:61206-4750/2-18) na predlog teme doktorske disertacije kandidata Mr Jelene Gvozdrenović Jeremić, dipl. inž. tehnologije, pod nazivom: „Mehanizam nastanka heterotopne osifikacije i koncipiranje odgovarajućeg tretmana“.

30.05.2019. Na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta doneta je Odluka (br. ) o imenovanju članova Komisije za ocenu doktorske disertacije Mr Jelene

Gvozdenović-Jeremić, dipl. inž. pod nazivom „Mehanizam nastanka heterotopne osifikacije i koncipiranje odgovarajućeg tretmana“. Komisija za ocenu doktorske disertacije je za predsednika Komisije izabrala dr Zoricu Knežević-Jugović, redovnog profesora Tehnološko metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

## **1.2. Naučna oblast disertacije**

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije pripadaju naučnoj oblasti Tehnološko inženjerstvo, uža naučna oblast Biohemijско inženjerstvo i biotehnologija, za koju je matičan Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu. Mentor je dr Ljiljana Mojović, redovni profesor Tehnološko- metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, koja je na osnovu dosadašnjih objavljenih publikacija i iskustva kompetentna da rukovodi izradom ove disertacije.

## **1.3. Biografski podaci o kandidatu**

Jelena Gvozdenović-Jeremić (rođena Gvozdenović) rođena je 1. septembra 1969. godine u Beogradu. Osnovnu školu „Ćirilo i Metodije“ u Beogradu završila je sa odličnim uspehom, kao i srednju „XI Gimnaziju“- smer Mikrobiologija u Beogradu. Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu, na Odseku za hemijsko i biohemijско inženjerstvo, upisala je školske 1988/89 godine. Diplomirala je 6. maja 1994. godine na Katedri za Biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju sa ocenom 10 na diplomskom radu i prosečnom ocenom tokom studija 8,70 čime je stekla zvanje diplomiranog inženjera biohemijскоg inženjerstva i biotehnologije. U maju 1994. zapošljava se u Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo kao istraživač saradnik na projektu: Proizvodnja rekombinantnog insulina finansiranog of Ministarstva nauke Srbije.

Magistarske studije upisala je 1994/1995 godine. Magistarski rad pod nazivom: „Optimizacija parametara proizvodnje rekombinantne penicillin G amidaze u *E.coli*“ odbranila je sa ocenom 10 pod rukovodstvom prof. Dr Josipa Barasa decembra 1998. Sve ispite predviđene planom i programom magistarskih studija položila je sa prosečnom ocenom 9,55.

Godine 1998. dobija poziciju istraživača na Iowa State University gde se bavi ekspresijom i proizvodnjom rekombinantnih proteina u kvascu, bakterijama i biljkama. Projekat je bio finansiran od strane kompanije ‘Prodigene’. Od decembra 2002. godine prihvata poziciju Naučnog istraživača i Menadžera laboratorije na Wayne State University u Detroitu gde je finansirana sa projekta Nacionalnog instituta za zdravlje.

Evropskom projektu ‘3D Repertoire’ se priključuje 2006 u EMBL (European Molecular Biology Laboratory) u Heidelbergu kao rukovodilac Fermentacione jedinice koja je odgovorna za proizvodnju rekombinantno eksprimiranih proteina u kvascu za potrebe otkrivanja kristalografske strukture proteina i interakcija protein-protein ili protein-lipid.

Godine 2009. se priključuje projektu na Nacionalnom Institutu za zdravlje u Vašingtonu (DC), gde provodi više od šest godina radeći istraživanja iz biologije razvitka kostiju i naslednih bolesti kostiju. Aktivno učestvuje u otkrivanju uloge Wnt i Hedgehog signalnog mehanizma i njihovim ulogama u različitim bolestima kod ljudi. Godine 2016. kao osnivač i glavni naučni rukovodilac “Nostopharma” kompanije nastavlja istraživanja u smeru otkrivanja nove terapije za patološki rast kostiju.

Školske 2016/2017 godine upisala je doktorske akademske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu, studijski program Biohemijско inženjerstvo i biotehnologija, pod

mentorstvom prof. Dr Ljiljane Mojović. Na treću godinu akademskih doktorskih studije je upisana sa završenom magistraturom uz priznavanje 120 ESPB

## 2. OPIS DISERTACIJE

### 2.2. Sadržaj disertacije

Doktorska disertacija kandidata Mr Jelene Gvozdrenović-Jeremić, dipl.inž. tehnologije, pisana je na srpskom jeziku i sadrži 114 strana A4 formata, 28 slika, 7 tabela i 146 literaturnih navoda. Doktorska disertacija sadrži sledeća poglavlja: *Rezime* (na srpskom i engleskom jeziku), *Uvod*, *Teorijski deo*, *Eksperimentalni deo*, *Rezultati i diskusija*, *Zaključak*, *Literatura*, *Biografija* i *Prilozi*. Prilozi sadrže izjavu o autorstvu, izjavu o istovetnosti štampane i elektronske verzije rada i izjavu o korišćenju. Na početku disertacije dat je *Rezime* na srpskom i engleskom jeziku, spisak korišćenih skraćenica, spisak naslova slika i tabela. Po svojoj formi i sadržaju, podneti rad zadovoljava sve standarde Univerziteta u Beogradu za doktorsku disertaciju.

### 2.3. Kratak prikaz pojedinačnih poglavlja

U *Uvodu* je dat kratak osvrt na oblast istraživanja i definisan je predmet rada, istaknut je značaj istraživanja, cilj rada, kao i doprinos i aktuelnost istraživanja ove doktorske disertacije. Ovde je ukazano na problem van skeletnog formiranja kostiju i patološki proces koji se javlja kao posledica traume na meko tkivo ili u retkim slučajevima kao posledica genske mutacije. Data je generalna klasifikacija heterotopne osifikacije kao i histopatološki nalaz. Ukazano je na potrebu za otkrivanjem mehanizma ovog patološkog procesa kao i razvoja adekvatnih farmakoloških tretmana. Dat je osvrt na ulogu mezenhimalnih matičnih ćelija u ovom patološkom procesu. kao i na metode i genetski model miša koji će biti korišćeni u istraživanju.

*Teorijski deo* je podeljen na devet poglavlja. Prvo poglavlje teorijskog dela daje detaljan pregled epidemiologije heterotopne osifikacije, kao i situacije u kliničkoj praksi gde se ova komplikacija najčešće javlja. U sledećem poglavlju data je detaljna klinička slika ove pojave i jasno je ukazano na razlike u patologiji između stečene forme heterotopne osifikacije i genetske forme iste. Objasnjena je klasifikacija heterotopne osifikacije koja je danas široko prihvaćena u kliničkoj praksi. Dalje je ukazano na kliničke faktore rizika koji su prisutni kada je u pitanju ova pojava. Širok spektar različitih faktora ukazuju na kompleksnost ove pojave kao i moguće različito poreklo ćelija i različite molekularne mehanizme koji dovode do ove pojave. Istaknute su morfološke, fiziološke i biohemijske karakteristike različitih etiologija ovog patološkog stanja. Ukazano je na metode dijagnostike koje se trenutno koriste, kao i patološke sličnosti i razlike. Zatim je u sledećem poglavlju dat pregled trenutnih pristupa prevenciji i tretmanu heterotopne osifikacije. Ukazano je na nedostatke postojanja efikasne terapije i profilaktičnog tretmana U cilju razvoja efikasnog tretmana ukazano je na neophodnost otkrivanja molekularnog puta koji dovodi do ovog patološkog stanja kao i porekla matičnih ćelija koje su direktno uključene u *de novo* stvaranje kosti van skeletnog sistema. U tom smislu izvršen je detaljan pregled naučnih radova objavljenih u poslednjoj deceniji koji se odnose na rasvetljavanje porekla ćelija koje doprinose heterotopnoj osifikaciji. Analizirani su i prikazani svi poznati molekularni putevi za koje se zna iz dosadašnjih istraživanja da doprinose ovoj patologiji, a poseban osvrt je dat GNAS genu kao i Hedgehog molekularnom putu koji ovaj gen aktivira. Takođe, dat je pregled svih dosada poznatih animalnih modela koji predstavljaju neprocenjivo sredstvo u istraživanjima i intenzivno se koriste u cilju pre kliničkih kao i osnovnih istraživanja. U zadnjem

poglavlju dat je kratak osvrt na neophodne korake koji su neophodni za uspešno plasiranje budućeg novog efikasnog tretmana za heterotopnu osifikaciju.

U poglavlju *Eksperimentalni deo* navedeni su materijali korišćeni u toku izrade doktorske disertacije, a zatim su navedene metode korišćene u toku eksperimentalnog rada i obrade rezultata. Ovaj deo je podeljen na tri celine, od kojih je prva posvećena pripremi inhibitora Hedgehog molekularnog puta. Sledeća celina opisuje koje su sve vrste miševa korišćene, kao i ćelijske linije. Navedene su sve hemikalije, enzimi i antitela korišćeni u *in vitro* kulturi kao i *in vivo* mišjim modelima. Zatim je detaljno objašnjen konstrukt koji je napravljen tako da se metabolički efekat deficijencije tj. gubitka  $G_s\alpha$  dobija uvođenjem adeno Cre virusa u mišji model radi dobijanja fenotipa koji reproduktivno oslikava fenotip heterotopne osifikacije kod ljudi.

U trećem delu dat je detaljan opis metoda koje se koriste za detekciju osteogeneze i različitih nivoa mineralizacije u tkivima i ćelijama. Dat je detaljan opis bojenja alizarin crvenim i alcian plavim za određivanje analize skeletnog fenotipa pomoću analiza preparata celog skeleta kako bi se uočile skeletne pravilnosti ili anomalije. Dalje, opisana je metoda bojenja srebrom po Von Kosa metodi gde dolazi do zamene kalcijumovih jona sa jonima srebra. Metoda je korišćena za bojenje histoloških sekcija, kao i ćelijskih kultura radi detekcije kalcifikacije. Opisane su imunohistohemijske metode koje su korišćene da bi se pokazalo prisustvo određenog proteina u sekcijama tkiva pripremljenih za histologiju. Dalje, opisana je kvantitativna PCR metoda kojom je detektovan relativan nivo ekspresije gena od interesa u odnosu na internu kontrolu i eksperimentalnu kontrolu. Date su detaljne sekvence svih prajmera koji su korišćeni za detekciju gena pomoću kvantitativnog PCR. Dat je opis metoda *in situ* hibridizacije gde se koristi obeležena komplementarnu DNK, RNK ili modifikovan lanac nukleinskih kiselina da lokalizuje specifične DNK ili RNK sekvence u delu ili sekciji tkiva ili ćelijama. Opisan je postupak izolovanja ćelija iz uda embriona kao odavno korišćen i pogodan eksperimentalni sistem za proučavanje ćelijskih procesa tokom razvoja skeletnog sistema, formiranja 3D funkcionalnih karakteristika i regulacije koraka prilikom razvića skeletnih elemenata. Na kraju su opisane statističke metode koje su korišćene u ovom radu.

*Rezultati i diskusija* su prikazani u okviru jednog poglavlja i sastoje se iz sedam odeljaka, shodno rezultatima istraživanja. Kako nam genetske forme heterotopne osifikacije pružaju jedinstvenu mogućnost da ispitamo mehanizme kojima se prostorno reguliše formiranje kostiju, ukazano je na genetski mišji model za POH. POH je genetska bolest izazvana inaktivirajućom mutacijom *Gnas* gena koji kodira  $G_s\alpha$  -važan prenosilac signala sa G protein receptora (GPCR). Zato je korišćen miš sa uslovnim gubitkom *Gnas* gena ili tkivno-specifičnim uklanjanjem *Gnas* gena. U poglavlju su najpre opisani fenotipi zapaženi uklanjanjem  $G_s\alpha$  u ranom mezenhimu uda kod embriona miša. Postignuto je uslovno brisanje gena za sintezu  $G_s\alpha$  ili ukrštanjem sa mišjim Cre linijama, specifičnim za određeno tkivo ili dodavanjem Cre virusa u ćelijsku kulturu  $G_s\alpha^{ff}$  mišjih ćelija ili ciljanim ubrizgavanjem Cre virusa u željeno tkivo na mišjem  $G_s\alpha^{ff}$  modelu. Ovi eksperimenti imali su za cilj da pokažu ulogu *Gnas* u ektopičnom stvaranju kostiju, kao i da ukažu na molekularni put koji biva aktiviran nakon potpunog uklanjanja GNAS iz specifičnog tkiva. Bilo je potrebno pokazati i u ćelijskoj kulturi, kao i u mišjem modelu ulogu matičnih mezenhimalnih progenitorskih ćelija u *de novo* formiranju ektopičnog koštanog tkiva koje rezultira heterotopnom osifikacijom. Pokazano je da potpuni gubitak *Gnas* dovodi do heterotopne osifikacije. Ovo je postignuto na više različitih mišjih linija i shodno pokazano u različitim tkivima kao npr udu, traheji ili nosu. Dokazano je da su mezenhimske progenitorske

ćelije upravo ćelije koje dovode do stvaranja kosti u mekom tkivu, neadekvatnom diferencijacijom u osteoblaste. Dokazano je da je Hedgehog molekularni put dovoljan i neophodan da bi došlo do patološkog formiranja kostiju u mekom tkivu ili heterotopne osifikacije. Ukazano je na veoma važnu ulogu *Gnas* gena u regulaciji balansa signala između Wnt i Hh molekularnog puta u procesu stvaranju kosti. Ovaj rad predstavlja značajan doprinos boljem razumevanju kako mutacije *Gnas* gena (njegova aktivacija kao i gubitak) izazivaju dve potpuno različite bolesti (FD i POH) ukazujući na signalne puteve koji bivaju aktivirani kao što je (Wnt/ $\beta$ -catenin i Hh). Kako ova dva signalna mehanizma dovode do različitih bolesti skeletnog sistema, ovaj rad ukazuje na značaj veoma kontrolisane aktivnosti  $G\alpha_s$  pomoću GPCR proteina, kako u prostoru tako i u vremenu i njegovu važnu ulogu u limitaciji formiranja kostiju isključivo u granicama skeletnog sistema. Takođe, eksperimentalne hipoteze i pitanja potvrđeni su korišćenjem više eksperimentalnih tehnika da bi se došlo do konačnog zaključka. Primećeni fenomeni su potvrđeni na nivou tkiva (mišji model ili humani uzorci), zatim ćelijskom nivou (na ćelijskoj kulturi ili na histološkim preparatima) i najzad na nivou proteina (Western blot) ili RNK (qRT-PCR ili *in situ* hibridizacija).

U poglavlju *Zaključak* su prikazani najvažniji rezultati i zaključci, kao i njihov doprinos predmetnoj oblasti istraživanja.

Poglavlje *Literatura* obuhvata 146 navoda iz oblasti istraživanja koja su korišćena u toku istraživanja i izrade doktorske disertacije.

### **3. OCENA DISERTACIJE**

#### **3.1. Savremenost i originalnost**

Na osnovu pregleda savremene stručne literature, može se reći da sprovedena istraživanja u okviru ove doktorske disertacije spadaju u veoma aktuelno polje istraživanja u oblasti biotehnološkog pristupa otkrivanju molekularnog mehanizma i tipa ćelija uzročnika patološkog formiranja kostane mase. Prvi put je ukazano na molekularni put koji značajno doprinosi patologiji veoma aktuelnog problema patološkog rasta kosti van skeletnog sistema, za koji trenutno ne postoji adekvatna terapija. Originalni pristup u kombinovanju tri različita, već poznata i odobrena leka kako bi se povećala efikasnost a smanjili neželjeni efekti pruža veoma obećavajuću mogućnost za trajno rešenje ovog kliničkog problema, pa je sa tog aspekta ova disertacija originalna i savremena.

#### **3.2. Osvrt na referentnu i korišćenu literaturu**

U okviru doktorske disertacije citirano je ukupno 146 referenci, koje ukazuju na aktuelnost istraživanja u ispitivanoj oblasti. Većina referenci predstavlja naučne radove objavljene u vrhunskim međunarodnim časopisima sa tematikom značajnom za izradu doktorske disertacije, publikovanih u poslednjoj deceniji. Istraživanja prikazana u navedenim referencama su korišćena za planiranje eksperimentalnog rada, analizu, upoređivanje i tumačenje rezultata dobijenih tokom izrade doktorske disertacije i izvođenje zaključaka. Takođe, u navedenoj literaturi navedene su i relevantni pregledni radovi ranijeg datuma, koji predstavljaju bazična saznanja iz predmetne oblasti i polaznu osnovu za tumačenje eksperimentalnih rezultata. U okviru navedene literature nalaze se i reference kandidata Jelene Gvozdenović-Jeremić, proistekle iz istraživanja u vezi sa ovom disertacijom i koje su objavljene u međunarodnim časopisima i na konferencijama.

Pregledana obimna literatura i priloženi objavljeni radovi ukazuju na adekvatno poznavanje predmetne oblasti istraživanja.

### **3.3. Opis i adekvatnost primenjenih naučnih metoda**

Istraživanja u okviru doktorske disertacije su ostvarena korišćenjem odgovarajućih eksperimentalnih tehnika i savremenih analitičkih instrumentalnih metoda prema originalnim ili modifikovanim metodama iz literature, kao i adekvatnom analizom i obradom podataka.

Karakterizacija fenotipa kod miševa je postignuta pripremom histoloških preparata, zatim adekvatnim bojenjem radi detekcije mineralizacije tkiva. Analiza proteina koji su prisutni u histološkim preparatima radjena je primenom tehnika imunohistologije i korišćenjem odgovarajućih komercijalnih antitela za proteine od interesa. Najsavremenija WISH metoda detekcije RNK na ćelijskom nivou u tkivu ili celom mšijem embrionu je korišćena u radu. Kvantitativni PCR u realnom vremenu je korišćen radi detekcije signala ili gena od interesa na nivou sinteze RNK. Analiza ćelijskih procesa tokom razvoja skeletnog sistema postignuta je izolacijom ćelija uda iz mišjeg embiona. Eksperimentalni modeli miša dobijeni su višegeneracijskim ukrštanjem i određivanjem genotipa potomstva putem PCR tehnike.

### **3.4. Primenljivost ostvarenih rezultata**

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije pružaju naučnu osnovu za razvoj efikasne klauzalne terapije za primenu u indikaciji heterotopne osifikacije. Ukazivanje na uzrok ove patološke pojave na molekularnom i ćelijskom nivou predstavlja solidnu naučnu osnovu za pronalaženje efikasnog rešenja za ovu kliničku komplikaciju. Kombinacija tri molekula čije je individualno korišćenje već poznato i odobreno u kliničkoj praksi, koja je predložena u ovoj disertaciji, predstavlja inovativno rešenje koje je već ušlo u preklinička ispitivanja finansiranja od države Merilend, SAD.

### **3.5. Ocena dostignutih sposobnosti kandidata za samostalni naučni rad**

Kandidat Mr Jelena Gvozdenović-Jeremić, dipl. inž, je tokom izrade doktorske disertacije ispoljila izuzetnu stručnost i samostalnost u pretraživanju i korišćenju naučne literature, planiranju i realizaciji eksperimenata, kao i korišćenju različitih tehnika i metoda. Pri analizi, obradi i diskusiji rezultata pokazala je samostalnost, sistematičnost i kreativnost. Na osnovu dosadašnjeg zalaganja i postignutih rezultata Komisija je mišljenja da kandidat poseduje sve kvalitete neophodne za samostalni naučno-istraživački rad.

## **4. OSTVARENI NAUČNI DOPRINOS**

### **4.1. Prikaz ostvarenih naučnih doprinosa**

Rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije imaju višestruko značajan naučni, ali i praktičan doprinos, pri čemu se može izdvojiti sledeće:

- Pronalazak da gubitak *Gnas* gena dovodi do HO putem aktivacije Hedgehog (Hh) signalnog puta je od velikog značaja za razumevanje funkcije *Gnas* gena u regulaciji signalnih puteva koji dovode do različitih fenotipa koštanog sistema.

- Pokazano da gubitak funkcije *Gnas* gena u mezenhimalnim matičnim ćelijama dovodi do progresivne HO u mišjem POH modelu, kao i da je mehanizam osifikacije intramembranski gde se matične ćelije direktno diferenciraju u osteoblaste, bez prethodnog formiranja hondrocita.
- Dokazano je da je Hedhegoh signalni put i dovoljan i neophodan za razvitak HO. Shodno tome, pokazano je da se već poznati Hh inhibitori odobreni u drugim aplikacijama (kao na primer kancer) mogu preusmeriti za tretiranje HO.
- Pokazano je da su i drugi oblici defektne mineralizacije, kao *Enpp1* mutacija koja izaziva tzv. generalnu arterijsku infantilnu kalcifikaciju (GACI), posredovani Hh signalnim putem.
- U radu je ispitana i mogućnost upotrebe kombinacije tri već poznata Hh inhibitora *in vitro* koji imaju komplementarno dejstvo na inhibiciju Hh signalnog puta i efikasno inhibiraju diferencijaciju MSC u osteoblaste.
- Rezultati ispitivanja su pokazali da su Arsen trioksid (ATO), Lovastatin i Vitamina D3 potentni inhibitori veoma brzog i ireverzibilnog procesa diferencijacije mezenhimalnih ćelija u osteoblaste, pokrenute Hh i ostalim osteogenim signalnim mehanizmima .
- Redukovana koncentracija ovih agensa može potencijalno poboljšati selektivnost novog leka i smanjiti neželjene sekundarne efekte kod ljudi.
- Ovi preliminarni rezultati otvaraju mogućnost novog pristupa u razvoju HO terapije, kao što su uvođenje kombinovane terapije već odobrenih lekova u cilju smanjenja nuspojava i troškova razvoja novog leka. Ovi preliminarni rezultati pružaju nadu HO pacijentima za koje trenutno nema efikasne i bezbedne terapije.

#### 4.2. Kritička analiza rezultata istraživanja

Imajući u vidu da je HO bolest bez adekvatne i efikasne terapije postavlja se pitanje koji molekularni mehanizam je uključen u prostorno definisanje formiranja skelnog sistema. Ovaj rad predstavlja značajan doprinos boljem razumevanju kako mutacije GNAS gena (njegova aktivacija kao i gubitak) izazivaju potpuno različite bolesti (FD tj. POH) identifikujući signalne puteve koji bivaju aktivirani kao što je (Wnt/ $\beta$ -catenin i Hh). Kako oba signalna mehanizma dovode do različitih bolesti kostiju, ovaj rad ukazuje na značaj veoma kontrolisane aktivnosti.  $G\alpha_s$  pomocu GPCR proteina, kako u prostoru tako i u vremenusve veću potražnju mehanizam osifikacije intramembranski i da se matične ćelije direktno diferenciraju u osteoblaste, bez prethodnog formiranja hondrocita. Došlo se do zaključka da je Hh signalni put odgovoran za prostornu regulaciju kostiju i da u sprezi sa Wnt signalnim putem striktno kontrolise fenotipe dodatnog formiranja kostiju i nedostatka istih. Predmet istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bilo je i formulisanje odgovarajuće terapije u skladu sa mehanističkim nalazima. U tom smislu, formulisana je kombinacija od tri različita molekula koja su poznata po inhibiciji Hh signala za koju je pokazana *in vivo* efikasnost u inhibiciji osteogeneze.

### 4.3. Verifikacija naučnih doprinosa

Kandidat Mr Jelena Gvozdenović-Jeremić je rezultate istraživanja dobijene u okviru izrade svoje doktorske disertacije potvrdila objavljivanjem radova u časopisima međunarodnog značaja i saopštenjima na međunarodnim i nacionalnim skupovima. Rezultati istraživanja proistekli iz ove doktorske disertacije objavljeni su u okviru četiri rada u naučnim časopisima međunarodnog značaja (kategorije M21a – jedan rad, kategorije M21 – jedan rad, kategorije M23 – dva rada), i dva saopštenja na međunarodnim skupovima. U toku dosadašnjeg naučno-istraživačkog rada u okviru uže naučne oblasti biohemijskog inženjerstva i biotehnologije kandidat je autor i koautor još deset radova u časopisima međunarodnog značaja.

#### **Radovi proistekli iz doktorske disertacije:**

##### **Radovi objavljeni u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (M21a)**

1. Regard JB, Malhotra D, Gvozdenovic-Jeremic J, Josey M, Chen M, Weinstein L, Shore E, Kaplan F, Yang Y, *Activation of Hedgehog signaling by loss of GNAS causes heterotopic ossification*, Nature Medicine (2013) 19 (11) pp.1505-1512. doi:10.1038/nm.3314, IF(2013)=28.054, ISSN: 1078-8956.

##### **Radovi objavljeni u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21)**

1. Jin Y, Cong Q, Gvozdenovic-Jeremic J, Hu J. Zhang Y, Terkeltaub R, Yang Y, *Enpp1 inhibits ectopic joint calcification and maintains articular chondrocytes by repressing Hedgehog signaling*, Development (2018) 145, doi: 10.1242/dev.164830, IF(2017)=5.413, ISSN: 0950-1991.

##### **Radovi objavljeni u međunarodnom časopisu (M23)**

1. Gvozdenovic-Jeremić J, Mojović L, *Drug repositioning for a rare genetic disorder progressive osseous heteroplasia (POH)*, Genetika (2019) vol 51(1) pp. 347-355, doi:10.2298/GENSR1901357G, IF(2017)=0.392, ISSN: 0534-0012.
2. Gvozdenovic-Jeremić J, Vert-Wong K, Mojović L, *Antiosteogenic effect of Arsenic trioxide, Cholecalciferol, Lovastatin or their combination in vitro*. J. Serb.Chem Soc (2019), accepted, IF (2017)=0.392, ISSN: 0534-0012.

##### **Radovi saopšteni radovi na naučnom skupu**

1. Gvozdenovic-Jeremić J, Jin Y, *Hedgehog signaling is upregulated in articular cartilage of enpp1 mutant mice*. Working Together at the Frontiers of Science and Technologies to Eradicate Cartilage Disease (2015), Gordon March 22 - 27, 2015, Galveston Texas.
2. Gvozdenovic-Jeremić J, Vert-Wong K, *Novel formulation for the treatment of HO associated with aberrant HH signaling activity* (2017), SOMOS conference, Scottsdale, Arizona, Dec 2017.

#### **Ostali naučni radovi kandidata:**

##### **Radovi objavljeni u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (M21a)**



1. Kim W., Khan S., Gvozdenovic-Jeremic J., Yang Y et al., *Interacting network of Hippo, Wnt B-catenin and Notch signaling represses liver tumor formation*, Journal of Clinical Investigation; (2017)-127(1):137-152. IF(2017)=13.251, ISSN: 0950-1991.
2. Shibata Y, Gvozdenovic-Jeremic J, Love J, Kloss B, White JF, Grisshammer R, Tate CG. “*Optimising the combination of thermostabilising mutations in the neurotensin receptor for structure determination*”, Biochim Biophys Acta, (2013) Apr; 1828(4) pp. 1293-12301. IF(2013)=7.854, ISSN: 006-3002.
3. White J, Noinaj N, Shibata Y, Love J, Kloss B, Gvozdenovic-Jeremic J, Shah P, Joseph Shiloach, Christopher G. Tate, Reinhard Grisshammer, *Structure of the agonist bound Neurotensin receptor NTS1*, Nature, (2012) Oct 25:490(7421); pp.508-513. IF(2012)=38.597, ISSN:0028-0836.
4. Gallego O., Betts M., Gvozdenovic-Jeremic J., Matzezki C., Trott J., Bonn S., Russell R., Kaksonen M., Gavin A.C “*A systematic screen for protein-lipid interactions in S. Cerevisiae*” Molecular Systems Biology, (2010) Nov. 6, pp. 1-15. IF(2011)= 8.626, ISSN:1744-4292.

#### **Radovi objavljeni u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21)**

1. Inagaki S, Ghirlando R, White JF, Gvozdenovic-Jeremic J, Northup JK, Grisshammer R, *Modulation of the interaction between neurotensin receptor NTS1 and Gq protein by lipid*, J Mol Biol, (2012) Mar 16:417(1-2) ; pp.95-111. IF(2012)=7.308, ISSN:0022-2836.
2. Lane LA, Fernández-Tornero C, Zhou M, Morgner N, Ptchelkine D, Steuerwald U, Politis A, Lindner D, Gvozdenovic J, Gavin AC, Müller CW, Robinson CV, *Mass spectrometry reveals stable modules in holo and apo RNA polymerases I and III*, Structure, (2011) Jan 12; 19(1); pp. 90-100. IF(2011)=6.347, ISSN:0969-2126.
3. Zhong Q, Gvozdenovic-Jeremic J, Li G, Greenberg M, *Up-regulation of the cell integrity pathway in S.cerevisiae suppress temperature sensitivity of mutants lacking mitochondrial anionic phospholipids*, Journal of Biological Chemistry, (2007) Jun 1:282(22):15946-53. IF(2008)=5.520, ISSN:0021-9258.
4. Gohil V, Gvozdenovic-Jeremic J, Schlame M, Greenberg ML, *Binding of 10-N-nonyl acridine orange to cardiolipin-deficient yeast cells: implications for assay of cardiolipin*, Analytical Biochemistry, (2005) Aug 15;343(2);350-352. IF(2005)=3.088, ISSN:0003-2697.
5. Gvozdenovic-Jeremic J, Zhong Q, Webster P, Zhou J, Greenberg ML, *Loss of function of KRE5 suppresses temperature sensitivity of mutants lacking mitochondrial anionic lipids”* Mol Bio Cell, (2005) Feb., Vol:16, pp.665-675. IF(2005)=6.520, ISSN: 1059-1524-
6. Ljubijankic G, Gvozdenovic J, Sevo M, and Degrassi G, *High-level secretory expression of penicillin amidase from Providencia rettgeri in Saccharomyces cerevisiae: purification and characterization*, Biotechnol Prog, Mar-Apr (2002) vol:18(2), p.330-336. IF(2002)=1.754, ISSN: 8756-7938-

#### **Radovi objavljeni u istaknutom međunarodnom časopisu (M22)**

1. Cotton JC, Pometto AL, Gvozdenovic-Jeremic J, *Continuous lactic acid fermentation using a plastic composite support biofilm reactor*, Appl Microbiol Biotechnol (2001) Dec: 57(5-6) pp:636-30. IF(2001)=1.754, ISSN:0175-7598-

## 5. ZAKLJUČAK I PREDLOG

Na osnovu iznetih podataka, mišljenje Komisije je da doktorska disertacija kandidata Mr Jelene Gvozdenović-Jeremić, dipl. inž, pod nazivom „**Mehanizam nastanka heterotopne osifikacije i koncipiranje odgovarajućeg tretmana**“ predstavlja značajan i originalan naučni doprinos predmetnoj oblasti istraživanja. Originalnost i naučni doprinos doktorske disertacije su potvrđeni objavljivanjem radova u časopisima međunarodnog značaja, saopštavanjem rezultata na međunarodnim i nacionalnim konferencijama, kao i proverom originalnosti korišćenjem softvera iThenticate. Komisija je mišljenja da ova doktorska disertacija ispunjava sve zahtevane kriterijume, kao i da je kandidat tokom izrade disertacije pokazao naučno-istraživačku sposobnost u svim fazama izrade disertacije. Imajući u vidu kvalitet, obim i naučni doprinos postignutih rezultata, Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, da se doktorska disertacija pod nazivom „Mehanizam nastanka heterotopne osifikacije i koncipiranje odgovarajućeg tretmana“ kandidata Mr Jelene Gvozdenović-Jeremić, dipl. inž, prihvati, izloži na uvid javnosti u zakonom predviđenom roku i uputi na konačno usvajanje Veću naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu i da nakon završetka ove procedure pozove kandidata na usmenu odbranu disertacije pred Komisijom u istom sastavu.

U Beogradu, 31.05.2019. godine

### ČLANOVI KOMISIJE

---

dr Zorica Knežević Jugović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

---

Dr Sonja Pavlović, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičku inženjerstvo

---

dr Maja Vukašinović-Sekulić, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet