

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

На 9. редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 10.07.2019. године, на основу молбе ментора, др Небојше Андрића и др Гордане Матић, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације за Јелене Д. Петровић (девојачко Хрубик), стручног сарадника у Сектору за генетичка и физичко-хемијска испитивања у СП Лабораторији а.д. Бечеј, под насловом „Улоге сигналних путева киназе регулисане екстрацелуларним сигнаlima, протеинских киназа РКВ и РКС у развоју и експресији гена ембриона рибе зебрице“ у саставу: др Радмила Ковачевић, проф. емеритус, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, др Душанка Савић-Павићевић, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду и др Кристина Погрмић-Мајкић, виши научни сарадник, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

### **ИЗВЕШТАЈ**

#### **Општи подаци о докторској дисертацији:**

Докторска дисертација под насловом „Улоге сигналних путева киназе регулисане екстрацелуларним сигнаlima, протеинских киназа РКВ и РКС у развоју и експресији гена ембриона рибе зебрице“ написана је на српском језику (латиничним писмом) на 163 странице и садржи 54 слике, 6 табела и 313 цитираних литературних навода. Дисертација је подељена на следећа поглавља: 1. Увод (1-27 стр.), 2. Циљеви истраживања (28-30 стр.), 3. Материјал и методе (31-48 стр.), 4. Резултати (49-83 стр.), 5. Дискусија (84-98 стр.), 6. Закључци (99-101 стр.) и 7. Литература (102-140 стр.). На почетку докторске дисертације се налази насловна страна на српском и енглеском језику, затим страна са информацијама о менторима и члановима Комисије, списак радова у којима се налазе резултати докторске дисертације, захвалница, сажетак на српском и енглеском језику са кључним речима, научном области и ужој научној области којој докторска дисертација припада. Затим следи садржај докторске дисертације. На крају докторске дисертације налази се листа скраћеница, биографија кандидата и изјаве (Изјава о ауторству, Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу).

## Анализа докторске дисертације:

Поглавље **УВОД** докторске дисертације садржи шест потпоглавља. У њему су сажето приказани литературни подаци који су непосредно повезани са темом докторске дисертације.

У потпоглављу „Ембриони риба зебрица“ описан је експериментални модел ембриона риба зебрица који је коришћен у овој дисертацији. Дат је преглед животног циклуса риба зебрица и стадијума развоја ембриона, а такође су приказане предности и мане коришћења ембриона риба зебрица у истраживачке сврхе. У другом потпоглављу „Сигнални путеви“ дат је детаљан приказ три сигнална пута која су предмет проучавања ове дисертације. У одељку „Erk“ описана је сигнални пут ванћелијским сигнаlima регулисаних киназа (енгл. *extracellular signal-regulated kinase*, ERK). Дат је детаљан преглед досадашњих литературних података о значају овог сигналног пута током ембриогенезе код сисара и риба зебрица. У другом одељку овог потпоглавља дат је приказ протеин киназе Б односно АКТ (енгл. *protein kinase B*, РКВ односно АКТ). Такође је дат детаљан преглед досадашњих литературних података о улози овог сигналног пута у ембриогенези, док је у трећем одељку представљен сигнални пут протеин киназа Ц (енгл. *protein kinase C*, РКС) и његов значај за развој ембриона. У трећем потпоглављу је дат приказ ензима који припадају I и II фази метаболизма ксенобиотика, а који су били предмет испитивања ове дисертације. Кандидаткиња је дала опис *sup1a* и *sup3ab5*, два гена из фамилије цитохрома P450 (енгл. *cytochrome P450*) која припадају I фази метаболизма ксенобиотика, као и опис три члана фамилије глутатион S-трансфераза (енгл. *glutathione S-transferase*, GST): *gstp1-2*, *gstal-3* и *gstml-3*, који припадају II фази метаболизма ксенобиотика. Описане су подфамилије ових гена, са посебним акцентом на контролу експримирања и улоге код риба зебрица. На крају потпоглавља I и II фази метаболизма ксенобиотика детаљно је дат преглед досадашњих литературних података о сигналним механизмима и транскрипционим факторима који учествују у регулацији експримирања *gstp1-2* код адултних ћелија и ембриона риба зебрица. У четвртном потпоглављу су описани антиоксидативни ензими који су предмет истраживања у овој дисертацији и њихова улога током ембриогенезе, док се у петом потпоглављу „Апоптоза“ даје приказ унутрашњег и спољашњег пута апоптозе са посебним освртом на гене који спречавају односно доводе до ћелијске смрти, а који су предмет истраживања ове дисертације. На крају увода, описан је развој мозга риба зебрица и дат је приказ гена који су значајни за овај процес, и који су такође испитивани у овој дисертацији.

У поглављу **ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА** су дефинисани следећи циљеви истраживања: испитивање улоге Erk и Akt на експримирање гена за ензиме I и II фазе метаболизма ксенобиотика као и гена за антиоксидативне ензиме током раног развоја ембриона; испитивање улоге Erk и Akt на експримирање *gstp1-2* код ембриона риба зебрица током оксидативног стреса; испитивање улоге сАМР/Рка/Стеb сигнализације на експримирање *gstp1-2* код ембриона риба зебрица; испитивање улоге сигналног пута Ркс током раног развоја ембриона риба зебрица.

У поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** описани су експериментални модел ембриони риба зебрица, третмани и дате шеме три експериментална дизајна који су коришћени за испитивања улоге сигналних путева Erk, Akt и Ркс у експримирању гена I и II фазе метаболизма ксенобиотика, гена за антиоксидативне ензиме као и гена за развој

ембриона рибе зебрице. За испитивање улоге Erk и Akt, ембриони старости од 5 до 24 сати после фертилизације, су третирани са инхибиторима или активаторима испитиваних сигналних путева у нормалним условима и током оксидативног стреса, а анализа експримирања гена и активација Erk и Akt је рађена у неколико временских тачака након третмана. За испитивање улоге сигналног пута Pkc, ембриони старости 24 сата после фертилизације, су третирани са PMA, активатором Pkc, док су поједине групе ембриона биле претретиране инхибиторима Pkc, ERK и ROS пре додавања PMA. Морфолошка анализа ембриона, експримирање иРНК и процена апоптозе је рађена у неколико временских тачака након третмана са PMA. Прецизно су наведене специфичне и неспецифичне хемикалије, описани ембриони риба зебрица, секвенце гена, врсте и порекло антитела и уређаји који су коришћени у експерименталном раду. Мерени су нивои експримирања гена (нивои иРНК) за ензиме Gst (*gstp1-2*, *gstal-3* и *gstml-3*), Суп (*sup1a*, *sup3ab5*), антиоксидативне ензиме (*hmox1*, *cat*, *sod2*, *gpx1*), апоптотичне гене (*casp3*, *casp9*, *apaf1*, *puma*, *mdm2*, *p53*, *bax* и *bcl-2*) и маркер гене развоја мозга (*emx1*, *otx2*, *ngn1*, *sox2*, *sox3*, *syn2a* и *pax2a*) коришћењем методе ланчане реакције полимеразе у реалном времену (qRT-PCR). Анализа појединачних транскрипата *gstp1* и *gstp2* је рађена методом PCR. Методом Western blot је анализирана фосфорилација Erk, Akt и Creb (енгл. *cAMP response element-binding protein*, Creb). Морфолошке промене на ембрионима су праћене коришћењем микроскопа, док је апоптоза код целих ембриона праћена коришћењем акридин оранж боје на флуоресцентном микроскопу. Анализа промоторског региона *gstp1* и *gstp2* зебрица је рађена компјутерском претрагом помоћу алатке *Genomatix MatInspector*. Резултати експеримента су статистички анализирани коришћењем анализе варијанси са два фактора (*Two-way ANOVA*) уз употребу *Dunnett* или *Tukey post hoc* теста. Студентски *t*- тест је рађен где је било применљиво.

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ** су приказани резултати истраживања добијени у овој дисертацији. Ово поглавље је подељено у неколико целина: испитивање улоге Erk и Akt на експримирање гена за ензиме I и II фазе метаболизма ксенобиотика као и гена за антиоксидативне ензиме током неометане ембриогенезе рибе зебрице, испитивање улоге Erk и Akt на експримирање *gstp1-2* током оксидативног стреса, улога сигналног пута Creb на експримирање *gstp1-2* током неометане ембриогенезе и улога активације Pkc током развоја ембриона риба зебрица. Прво су показани резултати о улози Erk и Akt на експримирање гена за ензиме I и II фазе метаболизма ксенобиотика као и гена за антиоксидативне ензиме ембриона рибе зебрице. Након приказа оптимизације ендогене контроле за методе qRT-PCR и Western blot и детаљне провере ефикасности инхибитора Erk и Akt код ембриона риба зебрица, показано је да примена U0126, инхибитора Erk, доводи до повећања експримирања *gstp1-2* и *sup1a* током раног развоја ембриона риба зебрица. Примена вортманина, инхибитора Akt, није довела до ремећења експримирања испитиваних гена. Оба инхибитора нису значајно мењала експримирања остале две испитиване изоформе ензима Gst, *Alpha* и *Mu*, као ни експримирања гена за антиоксидативне ензиме код ембриона рибе зебрице. Затим је показано да примена инхибитора Erk спречава експримирање *gstp1-2* током преласка из стадијума бластуре у стадијум сегментације и да је инхибиторни ефекат Erk на *gstp1-2* пролазан. Такође је показано да инхибиција Erk доводи до повећана експримирања *gstp1*, док је ефекат на *gstp2* изостао. У условима оксидативног стреса изазваног третманом са *тепу-*

бутикхидрокиноном (tBHQ), примена инхибитора Erk и Akt није мењала експримирање *gstp1-2* индуковано са tBHQ, нити је tBHQ мењао активност ове две киназе. Са друге стране, у условима оксидативног стреса изазваног коришћењем PMA, долази до повећања фосфорилације Erk и Akt, а примена инхибитора Erk је довела до повећања експримирања *gstp1-2* код ембриона третираних са PMA. Даље је показано да примена форсколина, активатора сигналног пута cAMP/PKA/CREB, показује сличан ефекат који испољава Erk, односно активација овог сигналног пута инхибише експримирање *gstp1-2* током ране ембриогенезе риба зебрица. Показано је и да инхибиција Erk доводи до смањења, док примена PMA повећава активацију Creb. Идентификована су и везна места за Creb у промоторском региону гена *gstp1-2* код риба зебрица, посредством којих осовина Erk-Creb може да инхибише експримирање овог гена код риба зебрица. Ови резултати показују по први пут могући механизам који контролише експримирање *gstp1-2* у нормални услови и током оксидативног стреса код ембриона риба зебрица. Коришћењем фармаколошких инхибитора и активатора сигналних путева и праћењем фосфорилације Erk, Akt и Creb, показано је следеће: (1) у неометаним условима ране ембриогенезе, до 48 сати након фертилизације, Erk-Creb осовина делује инхибиторно на експримирање *gstp1-2*. Инхибиторни ефекат ове осовине на *gstp1-2*, гену одговорном за одржавање редокс равнотеже, омогућава формирање више оксидативне средине у ембрионима риба зебрица у првих 48 сати после фертилизације; (2) овај ефекат је пролазног карактера и након 48 сати после фертилизације инхибиторни ефекат ове осовине се губи и експримирање *gstp1-2* постаје искључиво зависно од транскрипционог фактора Nrf2a; (3) повећање фосфорилације Erk током оксидативног стреса доводи до супресије експримирања *gstp1-2* и представља противтежу Nrf2a, позитивном регулатору експримирања овог гена.

У наставку ове докторске дисертације показани су резултати улоге Pkc током раног развоја ембриона риба зебрица. Примена PMA, активатора сигналног пута Pkc, је довела до појаве већег броја деформитета код ембриона риба зебрица и повећане смртности ембриона. Такође је показана и појава апоптозе код целих ембриона риба зебрица и повећано експримирање апоптотичних гена *puma* (енгл. p53 upregulated modulator of apoptosis) и *casp9* (каспаза 9) након третмана са PMA. Пошто је апоптоза уочена у главеној регији ембриона, испитивано је експримирање више маркера развоја мозга код ембриона риба зебрица. Резултати су показали да PMA доводи до смањења експримирања *rax2* који је маркер за оптичку стабљику, границу између средњег мозга и задњег мозга, оптичке везикуле и неурона кичмене мождине. Такође, PMA доводи до смањења експримирања гена за два антиоксидативна ензима, супероксид дисмутазу 2 (Sod2) и каталазу (Cat), указујући на појаву оксидативног стреса. Даља испитивања су ишла у правцу дефинисања улоге сигналног пута Pkc у негативним ефектима PMA код ембриона риба зебрица. Примена GFX, инхибитора Pkc, је довела до побољшања стопе преживљавања и смањења апоптозе, међутим није спречила појаву деформитета код ембриона риба зебрица третираних са PMA. Додавање, инхибитора Erk и ROS није довела до побољшања преживљавања, нити је спречила апоптозу и појаву деформитета код ембриона риба зебрица третираних са PMA.

Поглавље **ДИСКУСИЈА** прати начин приказа резултата. Резултати истраживања су објашњени и сагледани у светлу релевантних литературних података и поређени са резултатима других истраживања из дате области. Кандидаткиња је показала изузетно

добро познавање проблематике истраживања, критичку моћ и способност сагледавања резултата са различитих аспеката. У првом делу кандидаткиња дискутује добијене резултате о улози Erk и Akt на експримирање гена за ензиме I и II фазе метаболизма ксенобиотика као и гена за антиоксидативне ензиме гена ембриона риба зебрице. Такође кандидаткиња дискутује и резултате везане за улогу Erk у регулацији *gstp1-2* током оксидативног стреса. Резултати ових испитивања показују да Erk делује инхибиторно на експримирање *gstp1-2* и *sup1a* током неоматане ембриогенезе. Такође, активација Erk спречава оксидативним стресом изазвано повећање експримирања *gstp1-2*. Истакнута је веза измеђи Erk и Creb и њиховог негативног ефекта на *gstp1-2* код ембриона риба зебрица, а резултати су дискутовани у светлу налаза објављених код адултних ћелија. Кандидаткиња је представила могући механизам регулације експримирања *gstp1-2* током ране ембриогенезе и оксидативног стреса и дискутовала значај за развој ембриона. У наставку овог поглавља кандидаткиња дискутује добијене резултате о улози активације Pkc на развој ембриона риба зебрица. Посебно се обрађују и дискутују механизми преко којих PMA остварује свој негативни ефекат на развој ембриона риба зебрица. Посебан акценат је стављен на појаву апоптозе и развоју мозга код ембриона риба зебрица са приказаном улогом Pkc у тим процесима. На крају поглавља је истакнут значај и допринос добијених резултата у бољем сагледавању механизма контроле развоја ембриона.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** јасно су сумирани следећи закључци истраживања: Erk делују инхибиторно на експримирање *gstp1-2* и *sup1a* код ембриона и ларви риба зебрица. Erk и Akt нису укључене у регулацију експримирања изоформи ензима Gst класа *Alpha* и *Mi* као ни у регулацију експримирања гена за антиоксидативне ензиме. Erk специфично инхибише експримирање гена *gstp1*, али не и *gstp2*. Повећање активности Erk током оксидативног стреса спречава позитиван ефекат транскрипционог фактора Nrf2a на експримирање гена *gstp1-2* код ембриона риба зебрица. Активација сигнализације cAMP/Pka/Creb показује инхибиторни ефекат на експримирање гена *gstp1-2* током раног развоја ембриона риба зебрица. Erk делују инхибиторно на експримирање гена *gstp1-2*, путем активације транскрипционог фактора Creb који се везује за Creb везно место у промоторском региону гена *gstp1-2* код риба зебрица. Сигнализација Erk/Creb преко инхибиције експримирања гена *gstp1* учествује у контроли редокс равнотеже током ембриогенезе риба зебрице. Примена PMA током ране ембриогенезе проузрокује повећану стопу смртности, појаву различитих врста деформитета и апоптозу у можданој регији код ембриона риба зебрица. Појава апоптозе је последица повећаног експримирања проапоптотичних гена *puma* и *casp9*. Смањење експримирања гена *rax2* код ембриона риба зебрица третираних са PMA указује на поремећаје у развоју оптичке стабљике, границе између средњег и задњег мозга, оптичке везикуле и неурона кичмене мождине. Активација Pkc је одговорна за појаву апоптозе и смањење стопе преживљавања код ембриона риба зебрица третираних са PMA.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** садржи 313 библиографских јединица које су једнообразно приказане и адекватно цитиране у тексту дисертације.

## Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

### Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Jelena Hrubik, Branka Glisic, Dragana Samardzija, Bojana Stanic, **M21a**  
Kristina Pogrmic-Majkic, Svetlana Fa, Nebojsa Andric (2016): Effect of PMA-induced protein kinase C activation on development and apoptosis in early zebrafish embryos. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*; 190:24-31;  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1532045616300916?via%3Dihub>
2. Jelena Hrubik, Branka Glisic, Svetlana Fa, Kristina Pogrmic-Majkic, **M21**  
Nebojsa Andric (2016): Erk-Creb pathway suppresses glutathione-S-transferase pi expression under basal and oxidative stress conditions in zebrafish embryos. *Toxicology letters*, 240(1):81-92;  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427415300771?via%3Dihub>

### Б2. Радови у часописима домаћег значаја

1. -

### Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Hrubik J., Glisic B., Andric N. Erk-Creb Pathway Suppresses Glutathione-S-Transferase Pi Expression in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. **M34**  
*55<sup>th</sup> Society of Toxicology Annual Meeting and ToxExpo*, 13-17.03.2016., New Orleans, Louisiana, USA, Book of abstracts, p. 308, poster No. 236.
2. Hrubik J., Takac V., Glisic B., Andric N. Role of Erk and PI3/Akt signaling **M34**  
pathways in regulation of glutathione-S-transferase gene expression in zebrafish embryos. *4<sup>th</sup> Young Environmental Scientist Meeting*, 14-19.03.2015. Petnica Science Center, Petnica, Serbia, Book of abstract, p. 52.

### Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. Hrubik J., Glisic B., Kovacevic R. New zebrafish facility at University of **M64**  
Novi Sad. *SCOPE Valorization Grant workshop*, 22-24.04.2013., Novi Sad, Serbia, Book of abstracts, p. 05 short presentation.

## Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата Јелене Д. Петровић, број индекса М3008/2017, послата је дана 26. јуна 2019. године на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио дана 27. јуна 2019. године.

Утврђено подударање текста износи 24%. Овај степен подударности претежно је последица подударања имена и афилијација ментора и чланова Комисије; имена аутора, наслова радова и других библиографских података о коришћеној литератури; назива гена, протеина, биолошких врста, хемијских једињења; симбола којима се означавају гени и протеини; назива коришћених метода; појединих детаља експерименталних процедура, као што су дужине и температуре инкубирања, брзина центрифугирања и сл; случајних синтагми, као што је „Резултати су показали да“, „Статистички значајне разлике“ и сл. Сматрамо да су све пронађене подударности прихватљиве и да ни на који начин не утичу на оригиналност ове докторске дисертације.

Када се све изнето узме у обзир, извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата **Јелене Д. Петровић**, под насловом „**Улоге сигналних путева киназе регулисане екстрацелуларним сигнаlima, протеинских киназа РКВ и РКС у развоју и експресији гена ембриона рибе зебрице**“, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

## Мишљење и предлог Комисије:

Увидом у докторску дисертацију Јелене Петровић (девојачко Хрубик) закључујемо да је дисертација у потпуности написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме. Дисертација је израђена у складу са принципима научно-истраживачког рада и садржи све релевантне елементе неопходне за овакву врсту рада. Постављени циљеви истраживања су успешно реализовани. Добијени резултати су прегледни и јасно критички дискутовани. Комисија сматра да су резултати приказани у овој докторској дисертацији оригинално научно дело и да представљају значајан допринос у расветљавању улоге сигнализације Erk, Akt и Pkc у раном развоју ембриона риба зебрица. Ово мишљење Комисије потврђује квалитет часописа у којима су објављени резултати докторске дисертације кандидаткиње Јелене Петровић (девојачко Хрубик). Истраживања у оквиру ове докторске дисертације реализована су делом помоћу средстава са пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије под називом „Ксенобиотици са хормонском активношћу: репродуктивни, метаболички, развојни одговори и механизам дејства код одабраних модел организама и ћелијских линија“ (број пројекта: ОИ 173037), а делом од SCOPES пројекта под називом „*Establishing and developing of an ecotoxicology platform in Serbia and Croatia*” a focus on zebrafish (*Danio rerio*)” Швајцарске националне фондације за науку (број пројекта: SCOPES IZ73Z0\_128025). Докторска дисертација је прошла софтверску проверу оригиналности.

На основу укупне оцене дисертације, увида у истраживачки рад кандидата и сагласно свим претходно изнетим чињеницама у овом Извештају, Комисија предлаже Наставно-научном Већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да се докторска дисертација под називом „Улоге сигналних путева киназе регулисане екстрацелуларним сигнаlima, протеинских киназа РКВ и РКС у развоју и експресији гена ембриона рибе зебрице“ кандидата Јелене Петровић (девојачко Хрубик) прихвати, а кандидату одобри одбрана докторске дисертације.

#### КОМИСИЈА:

---

др Радмила Ковачевић, професор емеритус,  
Природно-математички факултет, Универзитета у Новом Саду

---

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

---

др Кристина Погрмић-Мајкић, виши научни сарадник,  
Природно-математички факултет, Универзитета у Новом Саду

У Београду, 22.07.2019. године