

NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA

UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 03.11.2014. godine, broj 4600/11, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**“Ekspresija neuralnih adhezionih molekula (NCAM)
u zdravom i obolelom bubrežnom tkivu”
("Expression of neural adhesion molecules (NCAM)
in healthy and diseased renal tissue")**

kandidata Sanje irovi , diplomiranog molekularnog biologa i fiziologa, zaposlene na Institutu za patologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu kao stru ni saradnik. Mentor je prof. dr Jasmina Markovi -Lipkovski.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Claudia Müller, profesor Medicinskog fakulteta Eberhard Karl Univerziteta, Tübingen, SR Nema ka,
2. Prof. dr Jovan Vasiljevi , profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu,
3. Prof. dr Svetislav Tati , profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Na osnovu analize priloženog rukopisa doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicnskog fakulteta slede i

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija diplomiranog molekularnog biologa i fiziologa Sanje irovi , napisana je na 106 strana i podeljena je na slede a poglavlja: Uvod, Ciljevi rada, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaklju ci i Literatura. Disertacija sadrži ukupno 38 slika, 5

shema i 12 tabela. Doktorska disertacija je napisana na engleskom jeziku i sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i jedan prilog (CodonCod Aligner software).

U **Uvodu** su definisane različite patološke promene u bubrezima koje vode ka bubrežnoj intersticijskoj fibrozi i tubulskoj atrofiji, što predstavlja morfološki supstrat hronične bubrežne insuficijencije. Epitelno-mezenhimna transformacija je delom odgovorna za nastanak hronične bubrežne insuficijencije, ali i za nastanak malignih tumora bubrega porekla tubulskog epitela. Detaljno je opisan neuralni elijski adhezioni molekul (NCAM), njegova genska i proteinska struktura kao i različite NCAM izoforme. Zatim je prikazana uloga NCAM-a u medijaciji homofilne i heterofilne elijske adhezije.

Istaknut je značaj NCAM-a za diferencijaciju bubrega tokom embrionalnog i fetalnog razvoja. Dat je kratak osvrt na mezenhimalno-epitelnu transformaciju tokom razvoja nefrona, osnovne jedinice građevine bubrega. Ukazano je da bi NCAM mogao biti marker fetalnih renalnih stem/progenitorskih elija. U Uvodu je iznet mogućnost da eventualno aberantno ispoljavanje NCAM molekula u adultnom bubregu kao i u tumorima porekla tubulskog epitela zapravo predstavlja marker dediferencijacije.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se u ispitivanju ekspresije NCAM izoformi u: fetalnom bubrežnom tkivu, adultnom zdravom tkivu bubrega, adultnom bubrežnom tkivu sa postojanjem intersticijskom fibrozom, karcinomu bubrežnih elija i renalnim elijskim kulturama. Dalja imunomorfološka karakterizacija NCAM⁺ elija sa drugim dobro definisanim markerima imala je za cilj da se utvrdi eventualna uloga NCAM⁺ elija u intersticijskoj fibrozi ili NCAM⁺ elije kao potencijalne renalne progenitorske elije. Zatim se težilo ka identifikaciji i karakterizaciji novih markera - antitela na renalnom tkivu, upotrebom novih monoklonskih antitela W5C4C5, W8B2 - potencijalnih mezenhimalnih markera kao i novog potencijalnog antitela za NCAM, W1C3 (dobijenih u laboratoriji prof. dr J.H. Bühringa, Univerzitet u Tübingen-u) sa ciljem bolje karakterizacije NCAM⁺ renalnih elija.

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da su eksperimenti raeni u Centru za medicinska istraživanja (ZMF) Eberhard Karl Univerziteta u Tübingen-u i na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Eksperimenti su sprovedeni u skladu sa etimkim principima Medicinskog fakulteta u Beogradu (odluka br. 29/VI-7). Detaljno je opisana metodologija imunohistohemijskog bojenja renalnog fetalnog, fibroznog i tumorskog tkiva upotrebom više različitih NCAM klonova (antitela) u cilju detektovanja NCAM izoformi. Korišćeni su i drugi markeri: CDH9, CD34 i W1C3. Dvostruka imunofluorescentna tehnika upotrebljena je radi ispitivanja kolokalizacije NCAM-a sa drugim markerima kao na primer: CD24, CD133, PSA-NCAM, Ki-67, FGFR1, integrin $\alpha 5$, EpCAM, Six2 i dr. Opisana je i priprema ćelijskih kultura za prototipnu citometriju (FACS), izolacija proteina iz tkiva bubrega upotrebom RIPA lizacionog pufera, kao i dalje određivanje specifičnih NCAM izoformi putem Western blot-a i imunoprecipitacijskih analiza, zatim izolacija RNK iz tkiva bubrega, reverzna transkripcija i sinteza cDNK, kao i RT-PCR amplifikacija specifičnih NCAM izoformi i sekvencionisanje dobijenih RT-PCR produkata. Semikvantitativnom metodom određivan je broj NCAM+FGFR1+ ćelija u tumorima bubrega, kao i broj NCAM+ ćelija u tkivu sa po etnom intersticijskom fibrozom. Prilikom statističke obrade podataka korišćen je IBM SPSS softver.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati. Poglavlje sadrži 38 slika i 3 tabele, koje precizno prikazuju kolokalizaciju NCAM-a i markera renalnih progenitora, kao i prisustvo posttranslacione modifikacije NCAM molekula u indukovanim mezenhimalnim ćelijama. Takođe je jasno dokumentovana aberentna ekspresija NCAM i FGFR1 u renalnim tumorima. Pronađeno je statistički značajno povećanje broja NCAM+ intersticijskih ćelija u po etnoj intersticijskoj fibrozi, ali i heterogenost NCAM+ intersticijskih ćelija.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije. Poglavlje Diskusija podeljeno je u 3 dela: a) diskusija fokusirana na ko-ekspresiju i ko-lokalizaciju NCAM-a u fetalnom i neonatalnom tkivu; b) diskusija vezana za ekspresiju NCAM molekula u renalnim tumorima i

c) diskusija vezana za heterogenost populacije NCAM+ renalnih intersticijskih elija i njihovu ulogu u intersticijskoj fibrozi.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **Literatura** sadrži spisak od 119 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Ovo istraživanje je primenom specifičnih primera za RT-PCR pokazalo prisustvo NCAM-120/-140/-180 izoformi u zdravom i obolelom bubrežnom tkivu. Takođe je primećeno da NCAM ekspresija na renalnim elijskim linijama zavisi od gustine elija u kulturi, naime pri gustini između 40-50% elije ne ekspresiraju NCAM, dok je prisustvo NCAM-a detekтовano tek ako je gustina u kulturi veća od 70%.

Dvostrukim imunofluorescentnim bojenjem na fetalnim bubrežima pokazana je kolokalizacija NCAM-a sa markerom adultnih renalnih progenitora CD24, na elijama prekursorima nefrona, ali ne i koekspresija CD133, takođe sa markerom adultnih stem elija, sa NCAM-om na istim prekursorima, kao i koekspresija NCAM-a sa markerom epitelijalnih elija (EpCAM, CD326), kako bi lakše bile identifikovane elije kod kojih je došlo do završetka mezenhimalno-epitelne transformacije. Interesantno je ista i da je NCAM molekul koji je prisutan na elijama kondenzovanog mezenhima i njegovim derivatima (pretubulski agregat, renalna vezikula, "Comma" i "S-shaped body") tj. prekursorskim elijama nefrona posttranslaciono modifikovan polisijalinskom kiselinom (eng. PSA). Rezultati koekspresije NCAM-a i navedenih markera ukazuju na to da humani fetalni prekursori mogu biti podeljeni u najmanje 2 populacije: a) PSA-NCAM⁺CD24⁺CD326⁻ tj. nefron progenitorske elije i b) NCAM⁺PSA-NCAM⁻CD24⁻CD326⁻ potencijalne prekursorske elije bubrežne strome.

Rezultati ove disertacije takođe su pokazali i aberantnu ekspresiju NCAM molekula u tumorskom bubrežnom tkivu, kao i u tkivu sa intersticijskom fibrozom. Kod oba navedena tkiva uočena je koekspresija NCAM-a i tirozin kinaznog receptora FGFR1 odgovornog za elijsku proliferaciju i agresivno ponašanje u nekim tumorima epitelijalnog porekla. Prisustvo membranoznog i citoplazmatskog NCAM/FGFR1 ispoljavanja detekтовano je u karcinomima

bubrežnih elija (eng. RCC), kako u svetlo elijskom, papilarnom, tako i u hromofobnom, dok je u onkocitomu lokalizacija NCAM/FGFR1 interakcija bila isključivo citoplazmatska. Imaju i u vidu činjenicu da je RCC maligni tumor, a onkocitom benigni, različita lokalizacija NCAM i FGFR1 molekula sugeriše na multifunkcionalnu ulogu NCAM/FGFR1 interakcija u tumorima bubrega.

Značajan rezultat ove disertacije predstavlja i detekcija povećanog ispoljavanja NCAM na intersticijskim elijama u ranoj fazi bubrežne intersticijske fibroze. Tako je konstatovana povećana koekspresija NCAM+ elija sa nekim markerima relevantnim za razvoj fibroze, kao što su integrin $\alpha 5 \beta 1$ i FGRF1. Kakva je ta uloga NCAM+ pozitivnih renalnih intersticijskih elija ostaje još nerazjašnjeno.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Relativno mali broj radova je ispitivao ekspresiju NCAM izoformi u bubrežnom tkivu. Jedan od prvih koji je opisao NCAM ekspresiju bio je rad na mišjim embrionima (Klein i sar., 1988), koji je pokazao prisustvo tri NCAM izoforme, NCAM-120, NCAM-140 i NCAM-180, koje nestaju posle rođenja. Rezultati prikazani u ovoj disertaciji su u saglasnosti sa istraživanjem Klein-a i sar. Interesantno je ista i da rezultati Western blota i imunoprecipitacije prikazani u ovom radu pokazuju i prisustvo NCAM molekula većih od 180 kDa, tj. u rasponu od 140-250 kDa, sugerišu i da je u humanom fetalnom bubrežnom tkivu NCAM molekul posttranslaciono modifikovan polisijalinskom kiselinom (PSA). Prisustvo PSA-NCAM-a pokazano je i u radovima drugih autora, dodatno ukazuju i na specifičnosti PSA modifikacije NCAM molekula (Omer i sar., 2013)

Prisustvo NCAM-a u humanim renalnim progenitorima ispitivano je uglavnom na elijskim kulturama. Upotrebom FACS analize pokazano je postojanje različitih populacija renalnih progenitora koje ekspimiraju NCAM (Metsuyanim i sar., 2009). Znatno manji broj radova je ispitivao ulogu NCAM+ elija u renalnim progenitorima *in vitro* tj. u samom fetalnom tkivu bubrega. U ovoj disertaciji dvostrukom imunofluorescencom detektovani su PSA-NCAM+EpCAM+ progenitori, prekursori nefrona, kao i NCAM+EpCAM- elije, najverovatnije progenitorske elije strome, što je u korelaciji sa rezultatima Metsuyanim i sar.

Tako e je pokazana koekspresija NCAM-a i CD24 markera renalnih progenitora, ali i ekspresija CD133 (Ivanova i sar., 2010; Bussolati i sar., 2005), kao i stem elijskog markera TRA-160 (Fesenko i sar., 2010) u fetalnom renalnom tkivu. Za razliku od adultnih renalnih progenitora koji ekspimiraju i CD24 i CD133 (Lindgren i sar., 2011; Sagrinati i sar., 2006), elije koje bi bile pozitivne na CD24, CD133 i NCAM nisu detektovane u fetalnom tkivu.

U ovoj disertaciji pokazano je prisustvo specifi nih NCAM isoformi u tumorima bubrega, što je u korelaciji sa radovima drugih autora (Gattenlöhner i sar., 2009). Tako e je potvr ena zna ajna uloga aberantne re-ekspresije NCAM molekula u tumorima bubrega (Daniel i sar., 2003; irovi i sar., 2012), kao i ekspresija FGFR1 (Tsimafeyeu i sar., 2011). Zatim, funkcionalna interakcija NCAM/FGFR1, ina e dobro prou ena u nervnim elijama (Francavilla i sar., 2009; Kiselyov i sar., 2005; Kiselyov i sar., 2003) i ovarijalnim tumorima (Zecchini i sar., 2011), u ovoj disertaciji je po prvi put detektovana u tumorima bubrega.

Specifi ne NCAM izoforme (120, 140, 180) detektovane su RT-PCR analizom u adultnom tkivu bubrega (Gattenlöhner i sar., 2009) kao i u ovoj disertaciji. U ovom radu je pokazana pove ana ekspresija NCAM+ intersticijskih elija u ranoj fazi intersticijske fibroze (Markovi -Lipkovski i sar., 2009), kao i heterogenost NCAM+ intersticijskih elija, koje koeksprimiraju FGFR1 (Kochoyan i sar., 2008) ali i integrin 5 1 (Schmid i sar., 2009; Takagi i sar., 2003).

D) Objavljeni rad koji ini deo doktorske disertacije

1. **Sanja irovi** , Jelena Vještica, Claudia A Mueller, Svetislav Tati , Jovan Vasiljevi , Sanja Milenkovi , Gerhard A Mueller, Jasmina Markovi -Lipkovski. NCAM and FGFR1 coexpression and colocalization in renal tumors. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7(4):1402-1414.

E) Zaključak (obrazloženje nau nog doprinosa)

Doktorska disertacija “**Ekspresija neuralnih adhezionih molekula (NCAM) u zdravom i obolelom bubrežnom tkivu**” kandidata Sanje irovi , diplomiranog molekularnog biologa i fiziologa, predstavlja originalni nau ni doprinos u razumevanju uloge NCAM molekula u fetalnom, adultnom fibroti nom, kao i tumorskom tkivu bubrega. Ovim istraživanjem

rasvetljena je ekspresija specifičnih NCAM izoformi u fetalnom i adultnom bubrežnom tkivu. Tako je detektovano prisustvo posttranslacione modifikacije NCAM molekula (PSA-NCAM) u fetalnom tkivu u toku diferencijacije bubrega. Pokazana je kolokalizacija NCAM-a sa drugim markerima kao što su FGFR1, CD24, CD326, $\alpha 5$ 1-integrin. Rezultati ove doktorske disertacije mogu biti korisni u daljem istraživanju i identifikaciji fetalnih i adultnih renalnih progenitora. Tako je rezultati dobijeni na tumorima bubrega mogu da pomognu u rasvetljavanju uloge NCAM/FGFR1 interakcija u tumorskim ćelijama.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući i zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom vešću u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju diplomiranog molekularnog biologa i fiziologa Sanje Petrović i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka (oblast molekularna medicina).

U Beogradu, 20.11.2014.

Članovi Komisije:

Prof. dr Claudia Müller

Prof. dr Jovan Vasiljević

Prof. dr Svetislav Tatić

Mentor:

Prof. dr Jasmina Marković-Lipković
