

## 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 проф. др Светозара Дамјановића и проф. др Гордане Матић, о урађеној докторској дисертацији Бојане Б. Илић, молекуларног биолога и физиолога Лабораторије за генетичко испитивање при Одељењу за туморе ендокриног система и наследне канцерске синдроме, Клинике за ендокринологију, дијабетес и болести метаболизма, КЦС, под насловом „Ефекат мутације гена *VHL* на ниво експресије протеина mTOR сигналног пута у светлоћелијском карциному бубрега“ и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Горан Брајушковић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, др Ана Ђорђевић, виши научни сарадник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду и др Јасмина Марковић-Липковски, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду. Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

### ИЗВЕШТАЈ

#### Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Бојане Б. Илић под насловом „Ефекат мутације гена *VHL* на ниво експресије протеина mTOR сигналног пута у светлоћелијском карциному бубрега“ написана је на 115 страна, у оквиру којих се налази 33 табеле и 33 слике. У докторској дисертацији је цитирано 209 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** (24 стране), **Циљеви рада** (1 страна), **Материјал и методе** (28 страна), **Резултати** (26 страна), **Дискусија** (13 страна), **Закључци** (1 страна) и **Литература** (22 стране). Поред наведеног докторска дисертација у Прилозима садржи Биографију аутора, Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјаву о коришћењу.

#### Анализа докторске дисертације:

У поглављу **УВОД** кандидаткиња на систематичан начин даје приказ досадашњих сазнања из литературе која су непосредно везана за предмет докторске дисертације. Поглавље је написано тако да пружа свеобухватан увид у актуелно стање истраживања у области. Први део Увода посвећен је етиологији, епидемиологији и класификацији тумора бубрега, патохистолошким карактеристикама светлоћелијског карцинома бубрега и актуелним системима за утврђивање патохистолошких параметара. У другом делу Увода приказана су сазнања о молекуларној структури гена *VHL*, структури и функцији

протеина VHL, са посебним освртом на његову улогу у регулацији фактора индукованих хипоксијом. Посебна пажња посвећена је сигналном путу протеина mTOR (енг. *mamalian target of rapamycin*), који је предмет ове докторске дисертације, са детаљним приказом његових компоненти и механизма регулације, као и улози у одржавању хомеостазе и настанку патолошких стања.

Поглавље **ЦИЉЕВИ** садржи јасно дефинисане циљеве истраживања. Како је предмет ове докторске дисертације испитивање везе између мутација у гену *VHL* и активности сигналног пута протеина mTOR, дефинисани су посебни циљеви који обухватају утврђивање мутационог статуса гена *VHL*, метилационог статуса промоторског региона гена *VHL* и губитак хетерозиготности локуса *3p* у узорцима туморског и неизмењеног ткива бубрега, а затим утврђивање могуће корелације мутационог статуса гена *VHL* са вредностима патохистолошких параметара тумора, нивоом иРНК за HIF-2 $\alpha$  (енг. *hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$* , нивоом протеина HIF-2 $\alpha$  и PDK3 (енг. *pyruvate dehydrogenase kinase 3*), као и нивоом компоненти сигналног пута mTOR: mTOR, TSC1 (енг. *tuberous sclerosis complex1*), TSC2 (енг. *tuberous sclerosis complex2*), p70S6K1 (енг. *p70-S6kinase1*), eIF-4EBP1 (енг. *eukaryotic initiation factor-4E binding protein1*), AMPK (енг. *AMP kinase*) и REDD1 (енг. *regulated in development and DNA damage response 1*).

У поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** детаљно су описани критеријуми за одабир пацијената који су обухваћени студијом и описани су методолошки поступци који су примењени у истраживању. Описане су методе за утврђивање мутационог статуса гена *VHL*, метилационог статуса промоторског региона гена *VHL* и губитак хетерозиготности локуса *3p*. Примењене методе обухватају поступак изоловања ДНК из периферне крви и узорака ткива, умножавање фрагмената ДНК ланчаном реакцијом полимеразе (PCR; енг. *polymerase chain reaction*), секвенцирање ДНК, амплификацију вишеструко лигираних проба, фрагментну анализу микросателитских маркера и метил-специфични PCR фрагмената ДНК модификоване бисулфитним третманом. Описани су квантитативни RT-PCR који је примењен за анализу нивоа иРНК за HIF-2 $\alpha$ , Western blot и имунохистохемијска метода примењена за квантификацију протеина HIF-2 $\alpha$ , PDK3, mTOR, TSC1, p70S6K1, eIF-4EBP1, AMPK, REDD1 и TSC2. Описани су и тестови помоћу којих је урађена статистичка анализа добијених резултата.

У оквиру поглавља **РЕЗУЛТАТИ** кандидаткиња је прегледно изнела своје експерименталне резултате које је, руководећи се постављеним циљевима, поделила у четири одвојена одељка. У првом одељку представљени су резултати анализе мутационог статуса гена *VHL*, метилационог статуса промоторског региона гена *VHL* и губитка хетерозиготности локуса *3p*. У складу са добијеним резултатима, представљена је класификација узорака на туморска ткива са неизмењеним геном *VHL* (*wtVHL*) (21.3 %), моноалелном (21.3 %) и биалелном инактивацијом гена *VHL* (57.4 %, односно 87.1 % узорака са детектованом интрагенском мутацијом). Наредни одељци посвећени су резултатима анализе асоцијације мутација у гену *VHL* са патохистолошким параметарима, нивоом иРНК за HIF-2 $\alpha$ , и нивоима протеина HIF-2 $\alpha$ , mTOR, TSC1, p70S6K1, eIF-4EBP1, REDD1, AMPK, PDK3 и TSC2. Најважнији резултати могу се сумирати на следећи начин:

- Узорци туморског ткива са *wtVHL* геном имали су статистички значајно већи Фурманов градус у односу на узорке тумора са моноалелном и биалелном инактивацијом гена *VHL*.
- У узорцима туморског ткива са геном *wtVHL* запажен је статистички значајно виши ниво протеина REDD1 у односу на туморе са моноалелном инактивацијом гена *VHL*, као и виши ниво протеина PDK3 у односу на неизмењено ткиво.
- У узорцима ткива са моноалелном инактивацијом гена *VHL* уочена је значајна позитивна корелација између нивоа протеина TSC1 и REDD1. Код ових тумора показан је

статистички значајно нижи ниво протеина TSC1 и REDD1 у односу на туморе са биалелном инактивацијом, као и у односу на неизмењено ткиво бубрега.

- У узорцима туморског ткива са биалелном инактивацијом гена *VHL* уочен је значајно нижи ниво протеина mTOR и PDK3 у односу на неизмењено ткиво бубрега, а виши ниво протеина REDD1 и eIF4E-BP1 у односу на неизмењено ткиво.

- Није уочена корелација нивоа иРНК за HIF-2 $\alpha$ , и протеина HIF-2 $\alpha$ , TSC2, p70S6K1, eIF4E-BP1 и AMPK са мутацијама гена *VHL*.

- Семиквантитативном имунохистохемијском анализом код свих тумора независно од статуса гена *VHL* утврђен је значајно нижи ниво експресије протеина TSC2 у односу на неизмењено ткиво бубрега.

У последњем одељку приказани су резултати мултипле регресионе анализе за узорке туморских ткива класификованих према мутационом статусу гена *VHL*.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** сходно постављеним циљевима и представљеним резултатима, дата је упоредна анализа резултата ове докторске дисертације и података из литературе. У првом делу кандидаткиња разматра *VHL*-зависни и *VHL*-независни механизам настанка и прогресије светлоћелијског карцинома бубрега тумачењем ефекта уочених промена у гену *VHL* на структуру и функцију протеина *VHL*, као и навођењем гена који би потенцијално могли да индукују процес онкогенезе ткива код којих промене у гену *VHL* нису детектоване. Даље је дискутован резултат који сугерише присуство *VHL*-независне регулације фактора индукованих хипоксијом у узрапредовалом светлоћелијском карциному бубрега. Други део дискусије посвећен је разматрању резултата који се односе на ниво протеина mTOR, TSC1, p70S6K1, eIF-4EBP1, REDD1, AMPK, PDK3 и TSC2. Сходно томе, дискутоване су могуће импликације ових промена на активност сигналних путева mTORC1 и mTORC2, као и на ћелијски метаболизам у појединачним групама туморског ткива, односно туморском ткиву са неизмењеним геном *VHL*, туморском ткиву са моноалелном и биалелном инактивацијом гена *VHL*. У дискусији се уочава објективан и критички став кандидаткиње према сопственим резултатима, са назнакама нових експерименталних приступа који би могли да допринесу расветљавању молекуларних механизма који су укључени у процес онкогенезе бубрежног ткива. Кандидаткиња истиче да је ово прва студија на светлоћелијском карциному бубрега у којој је испитиван ниво и показана корелација протеина PDK3, као и протеина REDD1 и TSC1, са мутирањем гена *VHL*, што ову докторску дисертацију чини значајном и научно оправданом.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** кандидаткиња сажето и јасно износи најважније закључке који произилазе из добијених експерименталних резултата, на основу којих је потврђено да су остварени циљеви ове докторске дисертације. Показано је да је мутација гена *VHL* праћена губитком хетерозиготности локуса 3p у 87.1 % анализираних узорка светлоћелијског карцинома. Утврђено је да туморска ткива са неизмењеним геном *VHL* имају значајно већи Фурманов градус у односу на ткива са моноалелном и биалелном инактивацијом гена *VHL*. Показана је корелација нивоа протеина REDD1, TSC1 и PDK3 са мутирањем гена *VHL*, што није случај са иРНК за HIF-2 $\alpha$  и протеинима HIF-2 $\alpha$ , TSC2, p70S6K1, eIF4E-BP1 и AMPK.

На крају ове докторске дисертације налази се поглавље **ЛИТЕРАТУРА** у коме је дата листа од 209 библиографских јединица. Наведене научне публикације односе се на области које су од значаја за предмет ове докторске дисертације.

## Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

### Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Војана В. Илић**, Jadranka A. Antic, Jovana Z. Bankovic, Ivana T. Milicevic, Gordana S. Rodic, Dusan S. Ilic, Cane D. Tulic, Vera N. Todorovic, Svetozar S. Damjanovic. VHL Dependent Expression of REDD1 and PDK3 Proteins in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. J Med Biochem. 2018; 37: 31-38. (M23; IF=1,148)  
<https://www.degruyter.com/view/j/jomb.2018.37.issue-1/jomb-2017-0030/jomb-2017-0030.xml?format=INT>
2. Damjanovic SS, **Илић ВВ**, Beleslin Cokic BB, Antic JA, Bankovic JZ, Milicevic IT, Rodic GS, Ilic DS, Todorovic VN, Puskas N, Tulic CD. Tuberous sclerosis complex protein 1 expression is affected by VHL Gene alterations and HIF-1 $\alpha$  production in sporadic clear-cell renal cell carcinoma. Exp Mol Pathol. 2016; 101(3):323-331. (M21; IF=2,423)  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001448001630096X>

### Б2. Радови у часописима домаћег значаја

### Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Војана Илић**, Bojana Beleslin Cokic, Jovana Bankovic, Gordana Rodic, Ivana Milicevic, Jadranka Antic, Cane Tulic, Svetozar Damjanovic. Clear cell renal carcinoma as a metabolic disease. European Young Endocrine Scientist Abstract Book (pp.46). Oral presentation delivered at the 2<sup>nd</sup> EYES meeting, September 24-26, 2014, Belgrade. (M32)

### Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **В. Илић**, В. Beleslin Čokić, Ј. Antić, Ј. Banković, I. Milićević, G. Rodić, D. Ilić, V. Todorović, N. Puškaš, C. Tulić, S. Damjanović. Efekat mutacionog statusa gena VHL na nivo ekspresije proteina REDD1 u svetloćelijskom karcinomu bubrega. Peti kongres endokrinologa sa međunarodnim učešćem. 9-12. decembar 2016; p.43. Beograd (oralna prezentacija) (M62)
2. **Војана Илић**. Effects of inactivated *VHL* gene on metabolic pathways in clear cell renal carcinoma. Oral presentation delivered at the 4<sup>th</sup> Congress of Serbian Endocrinologists with international participation, December 12-15, 2014, Belgrade. (M62)

## Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација **Бојане Б. Илић** под насловом „Ефекат мутације гена *VHL* на ниво експресије протеина *mTOR* сигналног пута у светлоћелијском карциному бубрега“ представља оригинални научни рад са јасно дефинисаним циљевима заснованим на добром познавању веома значајне, али још увек недовољно истражене теме из области молекуларне биологије светлоћелијског карцинома бубрега. Истраживачки поступак докторске дисертације је прецизно планиран и успешно реализован. Резултати ове дисертације пружају информације које се односе на ниво експресије компоненти сигналног пута *mTOR* у зависности од мутирања гена *VHL*. Посебан значај за потпуније разумевање молекуларних механизма који су укључени у патогенезу светлоћелијског карцинома бубрега имају резултати који указују на корелацију нивоа протеина *REDD1*, *TSC1* и *PKD3* са мутацијом гена *VHL*. Остварени резултати публиковани су у оквиру два научна рада што потврђује њихову значајност и актуелност.

На основу свега изложеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај Извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације кандидаткиње Бојане Б. Илић.

## КОМИСИЈА:

---

др Горан Брајушковић, ванредни професор,  
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

---

др Ана Ђорђевић, виши научни сарадник,  
Институт за биолошка истраживања „Синиша  
Станковић“, Универзитет у Београду

---

др Јасмина Марковић-Липковски, редовни професор,  
Медицински факултет, Универзитет у Београду

У Београду, 29.01.2018.