

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На III редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 15.12.2020. године, на основу молбе ментора, др Марије Мојсин, вишег научног сарадника Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду и академика Милене Стевановић, научног саветника Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду и редовног професора Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одређена је комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Владанке М. Вуковић** (рођ. Топаловић) истраживача сарадника Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду под насловом: „**Епигенетички механизми регулације експресије хуманог гена *SOX3* и гена фактора плурипотентности (*SOX2*, *OCT4* и *NANOG*) током раних фаза неуралне диференцијације *Ntera2/D1* ћелија**“, у саставу: др Марија Мојсин, виши 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 и др Горан Брајушковић, редовни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет. 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 Владанке М. Вуковић је оригинално истраживање које за тему има анализу епигенетичких механизма регулације експресије гена *SOX1* и *SOX3* и гена фактора плурипотентности (*SOX2*, *OCT4* и *NANOG*) током раних фаза неуралне диференцијације *Ntera2/D1* (NT2/D1) ћелија.

Докторска дисертација Владанке М. Вуковић је урађена у Лабораторији за хуману молекуларну генетику у Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду.

Дисертација је написана на 142 стране, садржи 35 слика и 7 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, Садржај, Текст по поглављима и Прилоге. Текст дисертације садржи следећа поглавља: Увод (странице 1-35), Циљеви рада (страница 36), Материјал и методе (странице 37-53), Резултати (странице 54-83), Дискусија (странице 84-97), Закључци (страница 98) и Литература (странице 99-142). У оквиру Прилога се налазе: 4 слике, Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу. У докторској дисертацији је цитирано 594 извора литературе.

Анализа докторске дисертације

Предмет докторске дисертације Владанке М. Вуковић јесте анализа улоге епигенетичких механизма (метилације ДНК и посттранслационих хистонских модификација) у регулацији експресије гена *SOX1* и *SOX3* и гена фактора плурипотентности (*SOX2*, *OCT4* и *NANOG*) током раних фаза неуралне диференцијације NT2/D1 ћелија.

У поглављу **Увод** кандидаткиња је у оквиру 11 потпоглавља дала детаљан приказ савремених истраживања која се односе на проблематику докторске дисертације. Први део поглавља Увод посвећен је прегледу литературних података у вези са структуром, експресијом и функцијом гена *SOX1*, *SOX3* и гена фактора плурипотентности (*SOX2*, *OCT4* и *NANOG*). Посебна пажња посвећена је анализи улоге гена *SOX2*, *OCT4* и *NANOG* у процесима одржања плурипотентности и диференцијације ћелија. У наредним потпоглављима описан је сигнални пут ретиноичне киселине, као и NT2/D1 ћелијска линија хуманих ембрионалних тератокарциномских ћелија која под дејством ретиноичне киселине улази у процес неуралне диференцијације, и коришћена је као *in vitro* модел систем у дисертацији. У наредним потпоглављима изнети су литературни подаци који указују на значај *SOXB1* (*SOX1*, *SOX2* и *SOX3*) групе гена у процесу неуралне диференцијације, са посебним акцентом на механизме преко којих ови гени остварују своје улоге. У последњем потпоглављу Увода укратко су представљена досадашња сазнања из области епигенетичких механизма регулације генске експресије, укључујући модификације молекула ДНК, хистонске модификације и улогу некоридарних молекула РНК.

Поглавље **Циљеви** садржи јасно дефинисане циљеве овог истраживања. Као основни циљ дефинисано је расветљавање улоге метилације ДНК и хистонских модификација у регулацији експресије гена *SOX1*, *SOX3* и гена фактора плурипотентности (*SOX2*, *OCT4* и *NANOG*) током раних фаза неуралне диференцијације NT2/D1 ћелија. У сврху реализације наведеног циља истраживања дефинисани су следећи специфични циљеви:

1. Испитати експресионе профиле гена *SOX3* и *SOX1* и гена фактора плурипотентности (*SOX2*, *OCT4* и *NANOG*) током раних фаза неуралне диференцијације NT2/D1 ћелија

2. Испитати метилациони статус промоторских региона хуманих гена *SOX1* и *SOX3* током раних фаза неуралне NT2/D1 ћелија. Испитати профиле одабраних хистонских модификација депонованих на различитим регионима хуманог гена *SOX3*, као и на генима *SOX1*, *SOX2*, *OCT4* и *NANOG* током раних фаза неуралне диференцијације NT2/D1 ћелија *in vitro*

3. *In silico* анализом испитати профиле одабраних хистонских модификација на хуманим генима *SOX3* и *SOX1* и генима факторима плурипотентности (*SOX2*, *OCT4* и *NANOG*) у H1 ћелијској линији хуманих ембрионалних матичних ћелија и неуралним прогениторима пореклом од H1 ћелијске линије.

У поглављу **Материјал и методе** дате су све информације неопходне за репродуковање експерименталних процедура са навођењем извора. Ово поглавље обухвата 2 потпоглавља у оквиру којих је приказан експериментални материјал (NT2/D1 ћелијска линија, антитета, олигонуклеотиди и комерцијални китови коришћени у раду, компјутерски програми и базе података) и експерименталне методе. Током израде

докторске дисертације кандидаткиња Владанка М. Вуковић је користила широк спектар метода и поступака који се могу поделити на: 1. методе изолације и детекције протеина (имунолошка детекција и имунофлуоресцентна цитохемијска анализа); 2. методе изолације и квантификације РНК (семи-квантитативни RT-PCR и квантитативни PCR у реалном времену); 3. методе за детекцију метилационог статуса ДНК (бисулфитно секвенцирање и метилација-специфичан PCR); 4. методе за детекцију посттранслационих модификација хистона (хроматинска имунопреципитација праћена квантитативним PCR-ом у реалном времену). На крају овог поглавља описане су методе за статистичку обраду резултата.

У поглављу **Резултати** организованом у 14 потпоглавља представљени су резултати ове докторске дисертације документовани табеларним приказима и сликама.

У првом потпоглављу приказани су резултати анализе експресије гена *SOX3* током раних фаза неуралне диференцијације NT2/D1 ћелија. Анализа је позакала да под дејством ретиноичне киселине долази до индукције експресије овог гена након 2 дана третмана NT2/D1 ћелија, да би затим ниво експресије гена *SOX3* опао седмог дана третмана ретиноичном киселином. У следећем потпоглављу приказани су резултати *in silico* анализе секвенце промоторског региона хуманог гена *SOX3* којом је детектовано постојање 2 CpG острва у оквиру испитиваног региона. У наредним потпоглављима описани су резултати анализе метилационог статуса другог CpG острва, који су показали да је овај регион хипометиливан током раних фаза неуралне диференцијације NT2/D1 ћелија из чега је закључено да метилација ДНК не представља механизам регулације експресије гена *SOX3* у иницијалним фазама неуралне диференцијације. У следећим потпоглављима приказани су резултати анализе профила одабраних хистонских модификација (H3K4me3, H3K79me2, H2BK5ac, H2BK16ac, H2BK120ac) на 3 регулаторна региона гена *SOX3* током раних фаза неуралне диференцијације NT2/D1 ћелија индукованих ретиноичном киселином. Детектовани профили хистонских модификација анализирани су у контексту претходно детектованог експресионог профила гена *SOX3*.

У наредним потпоглављима анализирана је експресија гена *SOX1*, као и метилација и профили хистонских модификација на промоторском региону овог гена током раних фаза неуралне диференцијације NT2/D1 ћелија. Уочена је индукција експресије гена *SOX1* у четвртм дану третмана NT2/D1 ћелија ретиноичном киселином. *In silico* анализом детектовано је постојање једног CpG острва у оквиру промоторског региона овог гена, које је хипометиливано у свим испитиваним временским интервалима. Анализа профила одабраних хистонских модификација депонованих на промоторском региону гена *SOX1* није указала на везу између измене испитиваних маркера и транскрипционе активације овог гена.

Следећа потпоглавља описују резултате анализе експресије гена фактора плурипотентности *SOX2*, *OCT4* и *NANOG* и профиле хистонских модификација на промоторским регионима ових гена током раних фаза неуралне диференцијације NT2/D1 ћелија. Нивои експресије ових гена опадају са индукцијом процеса неуралне диференцијације, а такође су уочене промене у депозицији хистонских маркера које могу корелисати са променама у детектованим експресионим профилима.

Последње потпоглавље описује резултате *in silico* анализе хистонских модификација на генима *SOX3*, *SOX1* и генима факторима плурипотентности (*SOX2*, *OCT4* и *NANOG*) добијеним претрагом ENCODE базе података за H1 ћелијску линију хуманих ембрионалних матичних ћелија, које деле морфолошке и имунофенотипске сличности са

NT2/D1 ћелијама. Резултати ове анализе показали су да су хистонски маркери на промоторским регионима гена *SOX3* и *SOX1* типични за гене са слабом транскрипционом активношћу, спремне на брзу активацију по дејству индукујућег сигнала. Промоторски региони гена фактора плурипотентности *SOX2*, *OCT4* и *NANOG* богати су хистонским маркерима који корелишу са транскрипционо активним генима.

У поглављу **Дискусија** организованом у 5 потпоглавља кандидаткиња је дала критички осврт на добијене резултате, поредећи их са савременим научним сазнањима из релевантних научних области. На основу интерпретације добијених резултата може се закључити да кандидаткиња добро познаје проблематику приказаног истраживања. У оквиру првог потпоглавља кандидаткиња је дискутовала динамику експресије гена *SOX3*, *SOX1* и гена фактора плурипотентности (*SOX2*, *OCT4* и *NANOG*) у раним фазама неуралне диференцијације NT2/D1 ћелија. Резултати ове докторске дисертације поткрепљени су литературним подацима. Уочено је да у иницијалним фазама неуралне диференцијације NT2/D1 ћелија долази до активације експресије гена *SOX1* и *SOX3*, и инхибиције експресије гена *SOX2*, *OCT4* и *NANOG*, на основу чега је кандидаткиња извела закључак да су иницијалне фазе неуралне диференцијације кључне за даљи ток неурогенезе, и да их карактеришу глобалне измене генске експресије које за последицу имају иреверзибилно опредељивање ћелија ка неуралним ћелијским типовима.

У наредном потпоглављу дискутован је значај метилације ДНК као механизма регулације експресије хуманих гена *SOXB1* групе (*SOX1*, *SOX2*, *SOX3*) у раним фазама неуралне диференцијације NT2/D1 ћелија. Резултати ове анализе показали су хипометилацију промоторских региона гена *SOX3* и *SOX1* у свим испитиваним временским интервалима, а посебно су дискутовани постојећи литературни подаци о метилацији регулаторних региона гена *SOX2*, који су такође хипометилловани у раним фазама неуралне диференцијације NT2/D1 ћелија, да би у каснијим фазама пролазили интензивно епигенетичко ремоделовање. На основу резултата проистеклих из ове докторске дисертације и литературних података кандидаткиња је извела закључак да метилација ДНК није механизам регулације гена *SOXB1* групе у иницијалним фазама неуралне диференцијације NT2/D1 ћелија, и да су ови гени у пермисивном стању, односно спремни да брзо одговоре на активациони стимулус.

У трећем потпоглављу дискутоване су уочене измене у профилима хистонских посттранслационих модификација на генима *SOXB1* групе у иницијалним фазама неуралне диференцијације NT2/D1 ћелија. Кандидаткиња је, поред осврта на релевантне литературне податке, приказала и биоинформатичку анализу података из ENCODE базе за хистонске маркере присутне на генима *SOXB1* групе у H1 хуманим ембрионалним матичним ћелијама и неуралним прогениторима пореклом из H1 ћелија. Кандидаткиња је на основу анализа и литературних података извела закључак да су регулаторни региони гена *SOX2* у плурипотентним ћелијским типовима богати активирајућим хистонским модификацијама. Са друге стране, посебно су дискутовани резултати који указују на „бивалентну“ природу гена *SOX1* и *SOX3*, односно истовремено постојање активирајућих H3K4me3 и репримирајућих H3K27me3 маркера на регулаторним регионима поменутих гена у плурипотентним ћелијским типовима.

У четвтом потпоглављу кандидаткиња је дискутовала уочене разлике у регулацији експресије гена *SOXB1* групе у иницијалним фазама неуралне диференцијације NT2/D1 ћелија. Кандидаткиња је ране фазе неуралне диференцијације NT2/D1 ћелија поделила у два стадијума које је окарактерисала на основу експресионих профила поменутих гена, и

истакла сличности и разлике у профилима хистонских модификација детектованих на регулаторним регионима ових гена које се уочавају између наведених стадијума. У наставку је дала увид у досадашње литературне податке везане за регулацију експресије гена *SOXB1* групе током процеса неуралне диференцијације, посебно истичући значајан допринос резултата ове докторске дисертације не само у сагледавању улоге епигенома у контроли експресије гена *SOXB1* групе, већ и у пољу регулације експресије гена *SOX1* током процеса хумане неурогенезе, о чему су литературни подаци веома ограничени.

У последњем потпоглављу дискутовани су резултати анализе епигенетичке регулације експресије гена *OCT4* и *NANOG* у раним фазама неуралне диференцијације NT2/D1 ћелија, поткрепљени доступним подацима из литературе. Претходне студије показале су да су регулаторни региони ових гена неметиловани у плурипотентним NT2/D1 ћелијама, а постепени пораст у нивоу метилације уочава се од четвртог дана третмана ретиноичном киселином. На основу поменуте студије и профила хистонских маркера добијених анализом у овој докторској дисертацији кандидаткиња је извела закључак да измене у хистонским маркерима на регулаторним регионима гена *OCT4* и *NANOG* делују пре промена на нивоу метилације ДНК. Такође, на основу добијених резултата и литературних података кандидаткиња је сугерисала постојање разлика у епигенетичкој контроли експресије гена *OCT4* и *NANOG*.

У поглављу **Закључци** су на јасан и адекватан начин сумирани резултати приказаног истраживања. Добијени закључци су у складу са постављеним експерименталним циљевима и сумирани су у 5 тачака:

1. Ране фазе неуралне диференцијације NT2/D1 ћелија карактеришу динамичне измене у експресионим профилима гена *SOX1* и *SOX3* и гена фактора плурипотентности (*SOX2*, *OCT4* и *NANOG*)

2. Ретиноична киселина индукује експресију гена *SOX1* и *SOX3*, а репримира експресију гена *SOX2*, *OCT4* и *NANOG* у раним фазама неуралне диференцијације NT2/D1 ћелија

3. Резултати указују да регулација експресије гена *SOX1* и *SOX3* током раних фаза неуралне диференцијације NT2/D1 ћелија индукованих ретиноичном киселином није зависна од метилације ДНК

4. Измене у депозицији H3K4me3 и H2B-ацетил маркера на регулаторним регионима гена *SOX3*, *SOX2*, *OCT4* и *NANOG* у корелацији су са профилима експресије ових гена у раним фазама неуралне диференцијације NT2/D1 ћелија индуковане ретиноичном киселином, док таква корелација за ген *SOX1* није уочена

5. Хистонски обрасци на регулаторним регионима гена *SOX1* и *SOX3* и гена фактора плурипотентности (*SOX2*, *OCT4* и *NANOG*) детектовани *in silico* анализом у H1 линији хуманих ембрионалних матичних ћелија и неуралним прогениторима пореклом из H1 ћелија одговарају профилима хистонских маркера у раним фазама неуралне диференцијације NT2/D1 ћелија индукованих ретиноичном киселином.

У поглављу **Литература** дата је листа од 594 библиографске јединице. Наведени радови су актуелни и адекватно цитирани у дисертацији.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Topalovic V.**, Krstic A., Schwirtlich M., Dolfini D., Mantovani R., Stevanovic M., Mojsin M. Epigenetic regulation of human SOX3 gene expression during early phases of neural differentiation of NT2/D1 cells. PloS One. 2017; 12(9): e0184099. (M21)
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0184099>
2. **Topalovic V.**, Schwirtlich M., Stevanovic M., Mojsin M. Histone modifications on the promoters of human OCT4 and NANOG genes at the onset of neural differentiation of NT2/D1 cells. Biochemistry-Moscow. 2017; 82(6):715-22. (M23)
<https://link.springer.com/article/10.1134/S0006297917060086>

B2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Topalovic V.**, Mojsin M., Krstic A., Scotting P.J., Mantovani R., Milivojevic M., Petrovic I., Schwirtlich M., Stevanovic M. Methylation and histone modifications of SOX3 gene during early phases of neural differentiation of NT2/D1 cells. FENS Featured Regional Meeting, Thessaloniki, Greece, October 7-10, 2015. Book of abstracts: p 33. (M34)
2. **Topalovic V.**, Mojsin M., Krstic A., Scotting P.J., Mantovani R., Milivojevic M., Petrovic I., Schwirtlich M., Stevanovic M. Epigenetic regulation of human SOX3 gene at the onset of neural differentiation of NT2/D1 cells. 11th Balkan Congress of Human Genetics, Belgrade, Serbia, September 17-20, 2015. Book of abstracts: p 86. (M34)

B3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. Švrtlih M., **Vuković V.**, Milivojević M., Stevanović M., Mojsin M. Histone marks on the promoters of human OCT4 and NANOG genes in the early phases of neural differentiation of NT2/D1 cells. 1st Congress of Molecular Biologists of Serbia, Belgrade, Serbia, September 20-22, 2017. Book of abstracts: p 78. (M64)
2. **Topalovic V.**, Mojsin M., Krstic A., Scotting P.J., Mantovani R., Milivojevic M., Petrovic I., Schwirtlich M., Stevanovic M. Epigenetic mechanisms of SOX3 gene regulation during early phases of neural differentiation of NT2/D1 cells. V Congress of the Serbian Genetic Society, Kladovo-Belgrade, Serbia, September 28 - October 02, 2014. Book of abstracts: p 128. (M64)

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата **Владанке М. Вуковић** број индекса **M3014/2011** послата је дана **23.11.2020.** на софтверску проверу оригиналности. Резултати провере оригиналности су нам достављени истог дана.

Коришћењем програма iThenticate извршена је провера оригиналности докторске дисертације Владанке М. Вуковић. Извештај је показао индекс подударност од 15%. Увидом у Извештај утврђено је подударање са 138 примарних извора. Подударање са једним извором је било 5% (NaRDUS-ом, заједничким порталом свих докторских дисертација и извештаја комисија о њиховој оцени на универзитетима у Србији), са другим примарним извором 5% (fedorabg.bg.ac.rs), са трећим примарним извором 1% (link.springer.com) док је са сваким од преосталих 135 примарних извора подударање било

мање од 1%. Подударање се највећим делом односило на стандардно присутне делове докторских дисертација (навођење назива институција, уобичајених скраћеница, стручних термина, општих фраза, назива поглавља, назива примењених метода, уређаја, реагенаса и комерцијалних китова, захвалницу), као и претходно публиковане радове кандидаткиње, а који су проистекли из њене докторске дисертације. Поред тога делимично подударање уочено је и при описивању метода и процедура које се стандардно користе у молекуларној биологији или проистичу из упутства произвођача комерцијалних китова, као и при коришћењу терминологије при статистичкој анализи података. Кандидаткиња је приликом израде дисертације поштовала академска правила цитирања и навођења литературних извора. Поред тога, увидом у Извештај потврђена је оригиналност резултата кандидаткиње.

Када се све изнето узме у обзир, извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата **Владанке М. Вуковић**, под насловом "**Епигенетички механизми регулације експресије хуманог гена *SOX3* и гена фактора плурипотентности (*SOX2*, *OCT4* и *NANOG*) током раних фаза неуралне диференцијације Ntera2/D1 ћелија**", те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација кандидаткиње Владанке М. Вуковић, под насловом „Епигенетички механизми регулације експресије хуманог гена *SOX3* и гена фактора плурипотентности (*SOX2*, *OCT4* и *NANOG*) током раних фаза неуралне диференцијације Ntera2/D1 ћелија“, представља свестрану и оригиналну научну студију. Кандидаткиња је током израде докторске дисертације показала висок степен познавања научне проблематике којом се бави докторска дисертација, јасно је дефинисала циљеве истраживања, адекватно је планирала и успешно реализовала планиране експерименте уз поштовање етичких и научних норми, критички је дискутовала добијене резултате, а закључци произилазе из добијених резултата. У оквиру дисертације кандидаткиња је на свеобухватан и детаљан начин дала увид у неке од механизма епигенетичке регулације – метилације ДНК и хистонских постраслационих модификација у регулацији експресије хуманих гена *SOX3*, *SOX1* и гена фактора плурипотентности (*SOX2*, *OCT4* и *NANOG*) у раним фазама неуралне диференцијације NT2/D1 ћелија. Имајући у виду значај испитиваних гена у процесима одржања плурипотентности и одређивања ћелијске судбине, резултати ове докторске дисертације доприносе разумевању комплексних интеракције епигенома који делују на локусима гена кључних за развиће. Резултати приказани у овој докторској дисертацији публиковани су у два оригинална рада (категорије M21 и M23) и представљени на 4 међународна и национална скупа. Владанка М. Вуковић је кроз рад на докторској дисертацији показала висок степен самосталности, истраживачку зрелост, истрајност и самокритичност. Стога Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену докторске дисертације кандидаткиње Владанке М. Вуковић, под насловом „ Епигенетички механизми регулације експресије хуманог гена *SOX3* и гена фактора плурипотентности (*SOX2*, *OCT4* и *NANOG*) током раних фаза неуралне диференцијације Ntera2/D1 ћелија “ и кандидату омогући јавну одбрану рада.

КОМИСИЈА:

У Београду,
08.01.2021. године

др Марија Мојсин, виши 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 Горан Брајушковић, редовни професор, Универзитет
у Београду - Биолошки факултет