

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VIII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 13. јуна 2014. године, прихваћен је извештај ментора др Исидоре Петровић о урађеној докторској дисертацији Милене Ц. Миливојевић, истраживача сарадника у Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, под насловом „Улога *Sonic hedgehog* сигналног пута у регулацији експресије *SOX18* гена у HeLa ћелијама, као модел систему карцинома грлића материце“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

др Исидора Петровић, научни сарадник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду

др Душанка Савић Павићевић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду

др Милена Стевановић, научни саветник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, дописни члан САНУ

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Наставно-научном већу Биолошког факултета подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Милене Миливојевић урађена је у Лабораторији за хуману молекуларну генетику Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду. Докторска дисертација „Улога *Sonic hedgehog* сигналног пута у регулацији експресије *SOX18* гена у HeLa ћелијама, као модел систему карцинома грлића материце“ написана је на 150 страна, садржи 29 слика и 2 табеле. Дисертација је подељена на 7 поглавља: Увод (35 страна), Циљ рада (2 стране), Материјал и методе (19 страна), Резултати (46 страна), Дискусија (19 страна), Закључци (2 стране) и Литература (27 страна, 290 цитираних библиографских јединица).

Hedgehog сигнални пут има важну улогу током раних фаза ембрионалног развића. Овај сигнални пут се код сисара активира једним од три позната лиганда: *Sonic Hedgehog* (SHH), *Indian Hedgehog* (IHH) и *Desert Hedgehog* (DHH). Делујући као морфоген, SHH лиганд контролише развој нервне цеви, удова, кичмене мождине, таламуса и има важну улогу у процесима хематопоезе и *de novo* васкуларизације неких ембрионалних ткива. Такође, код адултног организма овај пут је укључен у одржавање плурипотентног и прогениторског стања матичних ћелија. Последњих година показано је да промене у регулацији SHH сигналног пута, као и мутације компоненти овог сигналног пута, доводе

до развоја различитих врста тумора код човека. Поремећаји у регулацији SHH сигналног пута доказани су у меланомима, сквамозном карциному плућа, туморима простате, дојке, јајника и хроничној мијелоидној леукемији. Такође, показано је да је експресија гена који кодирају компоненте *Hedgehog* сигналне каскаде повећана у ћелијама сквамозног карцинома грлића материце и преканцерогеним лезијама у поређењу са нормалним ткивом.

У предходном периоду хумани *SOX18* ген клониран је и окарактерисан у Лабораторији за хуману молекуларну генетику, Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство. Такође, дефинисан је минимални промотор овог гена као и транскрипциони фактори битни за регулацију његове транскрипције. *SOX18* протеин је транскрипциони фактор, одговоран за спецификацију и диференцијацију ендотелијалних ћелија током развића васкуларног и лимфног система. Током адултног периода, *SOX18* транскрипциони фактор има важну улогу у регулацији ангиогенезе у физиолошким и патолошким стањима организма. Последњих година су проучавања његове функције у канцерогенези усмерена ка испитивању улоге у ширењу тумора путем регулације ангиогенезе и лимфангиогенезе. Међутим, најновија истраживања показују да експресија *SOX18* гена није ограничена само на ендотел који се налази у окружењу тумора, већ је повећање нивоа експресије уочено и у самим туморским ћелијама. Показана је позитивна корелација између нивоа експресије *SOX18* гена и степена малигнитета.

У оквиру ове докторске дисертације анализирана је улога SHH сигналног пута у регулацији експресије хуманог *SOX18* гена у HeLa ћелијама, као модел систему карцинома грлића материце. Анализирана је улога *GLI* (eng. Glioma associated oncogene) транскрипционих фактора у регулацији транскрипције *SOX18* гена у HeLa ћелијама. Употребом специфичних агониста и антагониста модулисана је активност SHH сигналног пута и испитиван је ефекат модулација на пролиферацију вијабилност и миграцију ћелија карцинома грлића материце *in vitro*. Такође, испитиван је ефекат модулација овог сигналног пута на експресију *SOX18* гена. Потом је испитивана и улога *SOX18* транскрипционог фактора у регулацији пролиферације, вијабилности и миграције HeLa ћелија, као и у регулацији експресије одабраних компоненти SHH сигналног пута. На основу добијених резултата утврђено је да постоји функционална веза између SHH сигналног пута и експресије *SOX18* гена, чиме је *SOX18* ген препознат као нови циљни ген SHH сигналне каскаде у *in vitro* модел систему карцинома грлића материце.

Анализа докторске дисертације:

Увод докторске дисертације почиње целином у којој су сажето представљени општи молекуларни механизми регулације експресије гена код еукариота. У оквиру Увода обрађена је и тема која се бави молекуларним механизмима преноса сигнала кроз ћелију са освртом на основне принципе. У следећем делу Увода изнет је општи преглед *Hedgehog* сигналног пута. Детаљно су описане најважније компоненте *Hedgehog* каскаде укључене у пренос сигнала у ћелија. У истој целини посебна пажња је посвећена улози *Hedgehog* сигналног пута активираним SHH лигандом у ембриогенези и у адултном организму. У складу са чињеницом да мутације компоненти SHH сигналног пута и промене у регулацији овог сигналног пута код адулта доводе до развоја различитих тумора, детаљно је описана улога *Sonic hedgehog* сигналног пута у канцерогенези.

У Уводу су затим представљени подаци о основним особинама везаним за структуру *SOX* протеина као и преглед функције ових транскрипционих фактора у различитим процесима током ембрионалног развића. Детаљније је обрађена *SOXF* генска фамилија

којој припада *SOX18* ген.

Посебан фокус у Уводу усмерен је на представљање досадашњих сазнања везаних за *SOX18* ген. Представљени су подаци који се односе на регулацију експресије *SOX18* гена, као и улогу овог гена током физиолошких и патофизиолошких стања. Разматрана је улога *SOX18* гена у канцерогенези и регулацији туморске ангиогенезе и лимфангиогенезе. Имајући у виду да је у раду као модел систем коришћена HeLa ћелијска линија, пореклом од карцинома грлића материце, на самом крају Увода сажето је описан поменути карцином са тренутним епидемиолошким параметрима и досадашњим подацима везаним за механизам настанка.

У складу са постојећим сазнањима из ове области, систематично представљеним у Уводу, постављени су следећи **Циљеви рада**:

- I) Одређивање улоге GLI транскрипционих фактора, као ефектора SHH сигналног пута, у регулацији експресије *SOX18* гена у HeLa ћелијама, која је укључила:
 - Ia) *in silico* анализу *SOX18* промотора у циљу идентификације потенцијалних везивних места за GLI транскрипционе факторе,
 - Iб) функционалну анализу улоге GLI транскрипционих фактора у регулацији активности *SOX18* промотора,
 - Iв) испитивање *in vitro* везивања GLI транскрипционих фактора за потенцијална везивна места,
 - Iг) анализу утицаја GLI транскрипционих фактора на ендогену експресију *SOX18* гена.
- II) Модулације SHH сигналног пута комерцијалним агонистима (пурморфамином) и антагонистима (циклопаминим) ове сигналне каскаде, која је укључила:
 - IIa) Модулацију активности сигналног пута циклопаминим и испитивање његовог утицаја на пролиферацију, вијабилност и миграцију HeLa ћелија,
 - IIб) Модулацију SHH сигналног пута циклопаминим и испитивање утицаја на експресију *SOX18* гена,
 - IIв) Модулацију активности сигналног пута пурморфамином и испитивање његовог утицаја на пролиферацију, вијабилност и миграцију HeLa ћелија,
 - IIг) Модулацију SHH сигналног пута пурморфамином и испитивање утицаја на експресију *SOX18* гена.
- III) Генерисање и функционална анализа конструката који експримирају *wild-type* и скраћену, доминантно-негативну форму форму *SOX18* протеина,
- IV) Испитивање улоге *SOX18* гена у процесима пролиферације, вијабилности и миграције HeLa ћелија,
- V) Анализа утицаја *SOX18* протеина на експресију компоненти SHH сигналног пута.

У оквиру поглавља **Материјал и методе** наведени су бактеријски сојеви, плазмидни вектори, плазмидни конструкти, олигонуклеотиди, антитела и комерцијални агенси за модулацију SHH сигналног пута који су коришћени у овом раду. У раду је коришћена перманентна HeLa ћелијска линија, пореклом од хуманог аденокарцинома грлића материце, која је комерцијално доступна (American Type Culture collection, Manassas, VA 20108, USA-ATCC br.CCL2) и као таква не подлеже одлукама Етичког комитета.

У поглављу Материјал и методе описане су молекуларно-биолошке методе коришћене за реализацију задатих циљева. Коришћењем програма MatInspector, анализиран је оптимални промоторски регион *SOX18* гена на присуство потенцијалних везивних места за GLI транскрипционе факторе, док је претраживање база података доступних секвенци миша и њихово међусобно поређење урађено коришћењем програма NCBI/BLAST и ClustalW.

Улога GLI1, GLI2 и GLI3 протеина у регулацији транскрипције *SOX18* гена у HeLa ћелијама праћена је и анализом активности промоторског региона овог гена у условима повећане експресије појединачних GLI транскрипционих фактора. Функционална анализа утицаја GLI транскрипционих фактора укључила је транзијентну трансфекцију HeLa ћелија методом калцијум фосфатне преципитације и примену есеја за испитивање активности репортерских ензима бета-галактозидазе и хлорамфеникол ацетилтрансферазе (CAT).

Везивање GLI протеина за потенцијална везивна места у оквиру оптималног *SOX18* промоторског региона анализирано је техником смањене електрофоретске покретљивости у гелу (EMSA) уз коришћење обележених олигонуклеотидних проба, једарних протеина и укупних ћелијских протеина изолованих из HeLa ћелија. Интеракција GLI1 протеина са испитиваним везивним местима додатно је потврђена експериментима смањене електрофоретске покретљивости у гелу у присуству антитела (*supershift*).

Како би се испитао утицај GLI транскрипционих фактора на ендогену експресију *SOX18* гена, HeLa ћелије су транзијентно трансфектоване експресионим векторима за GLI транскрипционе факторе. Утицај повећане експресије ових транскрипционих фактора на ендогени ниво експресије *SOX18* гена праћен је Western blot методом на изолованим укупним ћелијским протеинима. Имуноцитохемијском анализом на нивоу појединачних ћелија које су предходно адекватно припремљене за анализу (фиксирани и пермеабелизовани) праћен је утицај GLI транскрипционих фактора на ендогени ниво *SOX18* протеина. Такође, утицај повећане експресије GLI1, GLI2 и GLI3 транскрипционих фактора на ниво експресије ендогеног *SOX18* гена испитан је RT-PCR методом која је подразумевала изолацију укупне РНК, ослобађање од геномске ДНК, реверзну транскрипцију и умножавање специфичним прајмерима. Набројане методе су детаљно описане у овом поглављу.

За потребе модулације SHH сигналног пута ћелије су третиране комерцијалним агенсима, специфичним активатором и инхибитором сигналног пута. Ефекта ових модулација на ендогену експресију *SOX18* гена анализиран је PCR-ом у реалном времену коришћењем специфични олигонуклеотида. Western blot анализа је примењена за проучавање ефеката модулација SHH сигналног пута у HeLa ћелијама коришћењем укупних ћелијских лизата ових ћелија и антитела специфичних за *SOX18* и тубулин. Стопа раста ћелија након модулације сигналног пута анализирана је применом теста за одређивање пролиферативног капацитета ћелија (MTT тест), док је способност миграције ћелија након модулације праћен применом миграторног есеја *Wound scratch*.

У овом раду је анализиран и ефекат *SOX18* протеина на пролиферацију, вијабилност и миграцију HeLa ћелија као и на компоненте анализираних сигналног пута. Како би се пратио ефекат *SOX18* генерисани су конструкти који експримирају нативну и скраћену, доминантно-негативну форму овог протеина. Експресиони конструкти су, затим, проверавани у функционалним есејима помоћу есеја за испитивање активности луциферазног репортерског ензима. Такође Western blot методом је испитивана ефикасност експресије нативне и скраћене форме протеина, а способност везивања је проверавана техником EMSA. Утицај на експресију компоненти SHH пута праћен је употребом кванитативног RT-PCR-а у реалном времену.

Поглавље **Резултати** је организовано у складу са постављеним циљевима и садржи образложење експерименталних приступа и детаљно приказане резултате експеримената. Резултати су прегледно документовани сликама које су јасно објашњене у легендама.

На почетку овог поглавља представљени су резултати везани за улогу SHH сигналног пута у регулацији експресије хуманог *SOX18* гена у HeLa ћелијама као модел систему карцинома грлића материце. Биоинформатичком анализом оптималног промоторског региона *SOX18* гена идентификовано је седам потенцијалних везивних

места за GLI транскрипционе факторе, ефекторе SHH сигналног пута. Резултати функционалне анализе улоге GLI1, GLI2 и GLI3 транскрипционих фактора на активност *SOX18* оптималног промоторског конструкта у HeLa ћелијама су показали да су GLI1 и GLI2 активатори промоторске активности *SOX18* гена, док GLI3 није показао утицај на активност *SOX18* оптималног промотора. Анализом повећане експресије GLI1, GLI2 и GLI3 транскрипционих фактора на ниво експресије ендогеног *SOX18* гена у HeLa ћелијама примећено је да GLI1 и GLI2 доводе до повећања експресије ендогеног *SOX18* гена, како на нивоу РНК, тако и на нивоу протеина, док GLI3 не утиче на ендогену експресију *SOX18* гена. Анализом интеракције једарних протеина из HeLa ћелија и коришћењем антитета на GLI1 транскрипциони фактор показано је специфично везивање овог протеина за три од седам потенцијалних везивних места у *in vitro* условима. На овај начин показано је да GLI1 транскрипциони фактор, поред индиректног утицаја, може и директно да учествује у регулацији транскрипције *SOX18* гена везујући се за специфичне секвенце у оквиру промотора овог гена.

У следећем делу приказани су резултати модулације SHH сигналног пута у HeLa ћелијама. Успостављени су услови за модулацију SHH сигналног пута специфичним инхибитором циклопамином, као и специфичним активатором, пурморфамином. Испитиван је њихов утицај на пролиферацију, вијабилност и миграцију HeLa ћелија након чега је показано да се модулацијом овог сигналног пута утиче на поменуте процесе. Како је у предходном делу овог поглавља показано да GLI регулаторни протеини учествују у регулацији транскрипције *SOX18* гена, праћен је ефекат модулације SHH сигналне каскаде на експресију испитиваног *SOX* гена. Показано је да модулације SHH сигналног пута утичу на експресију хуманог *SOX18* гена, чиме је потврђено да је *SOX18* ген нови циљни ген SHH сигналне каскаде.

Како је предходно дефинисана улога SHH сигналне каскаде у регулацији експресије *SOX18* гена, у последњем делу поглавља Резултати представљени су резултати испитивња утицаја *SOX18* гена на SHH сигнални пут. Генерисани су и функционално окарактерисани конструкти који експримирају нативну и доминантно- негативну форму *SOX18* протеина и праћен је ефекат повећане експресије ових форми *SOX18* протеина на ниво експресије компоненти SHH сигналног пута, као и на процесе пролиферације, вијабилности и миграције HeLa ћелија. Резултати представљени у овом делу показују да *SOX18* протеин нема утицаја на пролиферацију и вијабилност али утиче на миграцију HeLa ћелија. Такође, резултати показују да *SOX18* утиче на смањење експресије GLI транскрипционих фактора и SHH лиганда указујући да функционална интеракција између SHH сигналног пута и *SOX18* транскрипционог фактора можда укључује регулацију негативном повратном спрегом.

У поглављу **Дискусија**, добијени резултати су критички дискутовани и упоређени са доступним литературним подацима. Најпре су дискутовани резултати везани за улогу SHH сигналног пута у регулацији експресије хуманог *SOX18* гена. Посебно је анализиран ефекат GLI транскрипционих фактора у транскрипционој регулацији *SOX18* гена, с обзиром да је у овој докторској тези први пут описана улога GLI транскрипционих фактора у регулацији транскрипције *SOX18* гена у HeLa ћелијама. Такође дат је приказ литературних података везаних за улогу овог сигналног пута у регулацији експресије различитих *SOX* гена. У одвојеним деловима поглавља Дискусија разматрани су и критички анализирани резултати модулације SHH сигналног пута на пролиферацију, вијабилност и миграцију HeLa ћелија. Такође, дискутовани су резултати утицаја модулације сигналног пута на ендогену експресију *SOX18* гена. Посебна пажња је посвећена утицају *SOX18* протеина на SHH сигнални пут, при чему је критички анализиран утицај *SOX18* протеина на одређене компоненте SHH сигналног пута. Поред тога анализирани су и дискутовани резултати везани за улогу *SOX18* протеина током

пролиферације и миграције HeLa ћелија, и поређени са досадашњим резултатима из литературе.

У поглављу **Закључци**, на јасан начин је изнето 10 закључака који у потпуности произилазе из добијених резултата и одговарају задатим циљевима:

1. У оквиру оптималног промотора *SOX18* гена *in silico* анализом идентификовано је седам потенцијалних везивних места за фамилију GLI транскрипционих фактора. Анализа интеракције једарних протеина изолованих из HeLa ћелија са ДНК пробама, које обухватају потенцијална везивна места за GLI транскрипционе факторе, показано је да се GLI1 транскрипциони фактор специфично везује за три потенцијална везивна места у оквиру региона оптималног *SOX18* промотора на позицијама -289 до -285 и од -221 до -209 у односу на старт транскрипције.
2. Функционалном анализом је показано да повећана експресија GLI1 и GLI2 транскрипционих фактора доводи до повећања активности оптималног *SOX18* промотор-репортерског конструкта у HeLa ћелијама. Повећана експресија GLI3 транскрипционог фактора не доводи до промене активности оптималног *SOX18* промотор-репортерског конструкта у истом модел систему. Закључено је да су транскрипциони фактори GLI1 и GLI2 позитивни регулатори активности *SOX18* промотора.
3. Повећана експресија GLI1 и GLI2 транскрипционих фактора у HeLa ћелијама довела је до повећања експресије ендогеног *SOX18* гена, како на нивоу РНК тако и на нивоу протеина, потврђујући активаторски утицај ових транскрипционих фактора експресију *SOX18* гена. Транзијентна трансфекција истог модел система GLI3 експресионим вектором није довела до промене експресије ендогеног *SOX18* гена на РНК и протеинском нивоу.
4. Третман HeLa ћелија инхибитором SHH сигналног пута, циклопамином, довео је до смањења степена пролиферације и вијабилности HeLa ћелија. Осим тога показано је да модулација SHH сигналног пута циклопамином смањује способност миграције HeLa ћелија.
5. Третман HeLa ћелија циклопамином довео је до смањења експресије *SOX18* гена, на РНК и протеинском нивоу, чиме је још једном потврђено да SHH сигнални пут учествује у регулацији експресије *SOX18* гена.
6. Активација SHH сигналног пута пурморфамином довео је до повећања степена пролиферације и вијабилности HeLa ћелија. Такође, третман HeLa ћелија пурморфамином повећао је миграцију HeLa ћелија.
7. Модулацијом SHH сигналне каскаде пурморфамином у HeLa ћелија детектовано је повећање експресије *SOX18* гена.
8. Генерисани конструкти који експримирају нативни, *wild type* као и нови доминантно-негативни *SOX18* протеин, који поседује ДНК везујући домен и мањи део трансактивационог домена. Показано је да генерисани конструкти ефикасно експримирају нативну и скраћену форму *SOX18* протеина у HeLa модел систему. Функционалном анализом је потврђено да нативни *SOX18* делује као транскрипциони активатор, док скраћени *SOX18* показује доминантно-негативан ефекат.
9. У оквиру овог рада показано је да повећана експресија нативне и скраћене форме *SOX18* протеина не утиче на пролиферацију и вијабилност HeLa ћелија. Са друге стране, појачана експресија нативног *SOX18* протеина довела је до повећања способности миграције HeLa ћелија у поређењу са појачаном експресијом скраћеног *SOX18* протеина.
10. Повећана експресија нативног *SOX18* протеина смањује експресију SHH гена, као и GLI1, GLI2 и GLI3 компоненти SHH сигналне каскаде, упућујући на постојање потенцијалне негативне повратне спреге.

У поглављу **Литература**, наведен је списак цитираних страних и домаћих научних

часописа и књига.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Milivojevic M.**, Petrovic I., Kovacevic-Grujicic N., Popovic J., Mojsin M. and Stevanovic M. Construction and functional analysis of novel dominant-negative mutant of human SOX18 protein. *Biochemistry (Moscow)*, 2013, 78 (11), 1287-1292. **M23**

Б2. Радови у часописима домаћег значаја

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Milivojevic M.**, Petrovic I., Kovacevic-Grujicic N., Popovic J., Mojsin M., Drakulic D., Stevanovic M. Construction and functional analysis of novel dominant-negative mutant of the human SOX18 protein. 10th Balkan congress of human genetics 2nd Alpe Adria meeting of human genetics, 10.–12. October, 2013, Bled, Slovenia, P6.2. **M34**
2. Petrovic I., **Milivojevic M.**, Mojsin M., Drakulic D., Kovacevic-Grujicic N., Topalovic V., Davidovic S., Stevanovic M. The role of Hedgehog signaling pathway in the regulation of *SOX18* gene expression in cervical carcinoma cell line. 23rd Biennial Congress of the European association for cancer research, 5-8. July, 2014, Munich, Germany, S 120 (499). **M34**

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

Радови и конгресна саопштења из уже научне области:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Milivojević M.**, Nikčević G., Kovačević-Grujičić N., Krstić A., Mojsin M., Drakulić D. and Stevanović M. Involvement of ubiquitous and TALE transcription factors, as well as liganded RXR α in the regulation of human *SOX2* gene expression in NT2/D1 embryonal carcinoma cell line, *Archives of Biological Sciences*, Belgrade, 2010, 62 (2), 199-210. **M23**
2. Mojsin M., Kovacevic-Grujicic N., Krstic A., Popovic J., **Milivojevic M.** and Stevanovic M. Comparative analysis of SOX3 protein orthologs: expansion of **M23**

homopolymeric amino acid tracts during vertebrate evolution, *Biochemical Genetics*, 2010, 48 (7-8), 612-623.

3. Petrović I., Kovačević-Grujičić N., Popović J., Krstić A., **Milivojević M.**, Stevanović M. Members of the CREB/ATF and Ap1 family of transcription factors are involved in the regulation of *SOX18* gene expression. *Archives of Biological Sciences*, Belgrade, 2011, 63 (3), 517-525. **M23**
4. Cuturilo G., Drakulic D., Krstic A., Gradinac M., Ilisic T., Parezanovic V., **Milivojevic M.**, Stevanovic M., Jovanovic I. The role of modern imaging techniques in the diagnosis of malposition of the branch pulmonary arteries and possible association with microdeletion 22q11.2. *Cardiology in the Young*, 2013, 23 (02), 181-188. **M23**

B2. Радови у часописима домаћег значаја

B3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Bocić M.**, Drakulić D., Seović M., Sretenović Z. and Stevanović M. Rapid prenatal diagnosis of most common numeric chromosomal abnormalities on uncultured amniotic fluid using fluorescent in situ hybridization (FISH), 7th Balkan meeting on human genetics, 31 August - 2 September, 2006, Skopje, Republic of Macedonia. *Balkan Journal of Medical Genetics*, Vol. 9 (3&4), Supplement: 120. **M34**
2. Seović M., Drakulić D., **Bocić M.**, Branković-Nikšić S. and Stevanović M. Detection of Prader-Willi syndrome using Fluorescent in situ Hybridization, 7th Balkan meeting on human genetics, 31 August - 2 September, 2006, Skopje, Republic of Macedonia. *Balkan Journal of Medical Genetics*, Vol. 9 (3&4), Supplement: 60 **M34**
3. **Milivojević M.**, Nikčević G., Kovačević-Grujičić N., Krstić A., Mojsin M., Drakulić D., Petrovic I., Stevanović M. Involvement of ubiquitous and TALE transcription factors, as well as liganded RXR α in the regulation of human *SOX2* gene expression in NT2/D1 embryonal carcinoma cell line, 2nd EMBO conference series on cellular signaling & molecular medicine, 21.-26. May, 2010, Cavtat, Croatia, Program and abstract book: P61, pp **M34**

4. Drakulić D., Krstić A., Nikčević G., **Milivojević M.**, Stevanović M. **M34**
 Characterization of SOX2- overexpressing NT2/D1 cell clones. International Symposium: One hundred years of Ivan Djaja's (Jean Giaja) Belgrade school of physiology, 10.-14. September, 2010, Belgrade Neurophys 11, pp 131.
5. **Milivojević M.**, Nikčević G., Kovačević-Grujičić N., Krstić A., Mojsin M., Drakulić D., Petrović I., Stevanović M. **M34**
 Ubiquitous and TALE transcription factors, as well as liganded RXR up-regulate the human SOX2 gene expression in the NT2/D1 cell line. International Symposium: One hundred years of Ivan Djaja's (Jean Giaja) Belgrade school of physiology, 10.-14. September, 2010, Belgrade, Neurophys 12, pp 132.
6. Popović J., **Milivojević M.**, Petrović I., Klajn A., Nikčević G., Stevanović M. **M34**
 Regulation of human SOX14 gene expression by SHH signaling pathway. International Symposium: One hundred years of Ivan Djaja's (Jean Giaja) Belgrade school of physiology, 10.-14. September, 2010, Belgrade, Neurophys 11, pp 133.
7. Petrović I., Kovačević-Grujičić N., **Milivojević M.** and Stevanovic M. **M34**
 The role of transcription factors ZBP-89, SP3, NF-Y and EGR1 in the regulation of the SOX18 promoter activity. Frontiers in cardiac and vascular regeneration, May 30.- June 2, 2012, Trieste, Italy, pp 81.
8. **Milivojevic M.**, Petrović I., Nikčević G., Zarić J., Ruegg C. and Stevanovic M. **M34**
 VEGF and TNF up-regulate, NSAID down-regulate SOX18 protein level in HUVEC. Frontiers in cardiac and vascular regeneration, May 30.- June 2, 2012, Trieste, Italy, pp 80.
9. Drakulic D., Cuturilo G., Jovanovic I., **Milivojevic M.**, Kalanj J., Medjo B., Popovic J., Stanisavljevic D., Topalovic V., Stevanovic M. **M34**
 Characterization of 22q11.2 regionin patients with congenital heart malformations. 10th Balkan congress of human genetics 2nd Alpe Adria meeting of human genetics, 10.–12. October, 2013 Bled, Slovenia, P2.4

10. Kovačević-Grujičić N., Mojsin M., Popović J., Petrović I., Topalović V., **Milivojević M.**, Stevanović M. CREB (cyclic amp response element binding) protein acts as a positive regulator of *SOX3* gene expression in NT2/D1 cells. 6th Congress of the Serbian neuroscience society, 14.-16.November, 2013, Belgrade, pp 41. **M34**
11. Marjanovic J., Stanisavljevic S., Popovic J., Drakulic D., Mojsin M., Davidovic S., Petrovic I., **Milivojevic M.** and Stevanovic M. Analysis of SOXB1 expression during neural differentiation of embryonal carcinoma NT2/D1 cells.EU FP7 Project GlowBrain Workshop „Application of biomaterials and in vivo imaging in stem cell research“, 27. – 29, March, 2014, Zagreb, Croatia, p13. **M34**

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

Б5. Монографска студија/поглавље у тематском зборнику међународног значаја

Мишљење и предлог Комисије:

На основу увида у докторску дисертацију **Милене Ц. Миливојевић**, чији је приказ дат у овом Извештају и на основу непосредног увида у рад кандидаткиње током реализације докторске дисертације дајемо следеће мишљење и предлог.

Докторска дисертација Милене Миливојевића, студенткиње докторских студија Биолошког факултета Универзитета у Београду, под насловом „Улога *Sonic hedgehog* сигналног пута у регулацији експресије *SOX18* гена у *HeLa* ћелијама, као модел систему карцинома грлића материце“ представља оригиналан и научно вредан допринос расветљавању функционалне везе *Sonic hedgehog* сигналног пута и *SOX18* транскрипционог фактора у *in vitro* модел систему карцинома грлића материце. Кандидаткиња је у својој докторској дисертацији успешно испунила постављене циљеве истраживања кроз опсежан експериментални рад. Област истраживања и тема којом се бави ова докторска дисертација веома су актуелне и добијени резултати представљају значајан допринос разјашњењу улоге наведених молекуларних механизма у процесу канцерогенезе.

На основу изложене анализе докторске дисертације, Комисија закључује да су постављени циљеви докторске дисертације успешно реализовани и да су постигнути резултати оригинални и значајни са фундаменталног аспекта. Због свега изложеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати извештај о урађеној докторској дисертацији **Милене Ц. Миливојевић**, под насловом „Улога *Sonic hedgehog* сигналног пута у регулацији експресије *SOX18* гена у *HeLa* ћелијама, као модел систему карцинома грлића материце“ и овај рад узме као основ за јавну одбрану и стицање звања доктора биолошких наука.

Комисија за преглед и оцену докторске дисертације предлаже да Комисија за одбрану докторске дисертације буде у следећем саставу:

1. др Исидора Петровић, научни сарадник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду
2. др Душанка Савић Павићевић, ванредни професор Биолошки факултет, Универзитет у Београду
3. др Милена Стевановић, научни саветник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду, дописни члан САНУ.

Београд, 25.08.2014. године

КОМИСИЈА:

др Исидора Петровић, научни сарадник ИМГТИ
Универзитет у Београду

др Душанка Савић Павићевић, ванредни професор
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

др Милена Стевановић, научни саветник ИМГТИ
Универзитет у Београду,
дописни члан САНУ