

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ		
1. Датум и орган који је именовано комисију: 25.05.2021. Наставно-научно веће Медицинског факултета Универзитета Нови Сад		
2. Састав комисије у складу са <i>Правилима докторских студија Универзитета у Новом Саду</i> :		
1. Проф. др Драгојевић Симић Викторија	Редовни Професор	Фармакологија са токсикологијом, 28.02.2013.
презиме и име	звање	ужа научна област и датум избора
Медицински факултет ВМА Универзитета одбране у Београду		Председник комисије
установа у којој је запослен-а		функција у комисији
2. Проф. др Васовић Велибор	Редовни Професор	Фармакологија са токсикологијом, 15.01.2014.
презиме и име	звање	ужа научна област и датум избора
Катедра за фармакологију Медицинског факултета у Новом Саду		Члан комисије
установа у којој је запослен-а		функција у комисији
3. Доц. др Катанић Јасмина	Доцент	Биохемија, 24.01.2019.
презиме и име	звање	ужа научна област и датум избора
Катедра за биохемију Медицинског факултета у Новом Саду		Члан комисије
установа у којој је запослен-а		функција у комисији
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ		
1. Име, име једног родитеља, презиме: Исидора, Нинослав, Тошић		
2. Датум рођења, општина, држава: 05.06.1991. Нови Сад, Нови Сад, Република Србија		
3. Назив факултета, назив претходно завршеног нивоа студија и стечени стручни/академски назив: Медицински Факултет Универзитета у Новом Саду, Интегрисане академске студије фармације, магистар фармације		
4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија: 2016. Докторске академске студије - Претклиничка истраживања.		
III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:		

Утицај in vitro излагања СТАТ3-активираних малигнух ћелија дојке вишеслојним наночестицама обложеним поли-L-глутаминском киселином

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Навести кратак садржај са назнаком броја страница, поглавља, слика, схема, графикона и сл.

Кратак садржај:

1. Увод

Поглавље увод је написано на 30 страна, укључујући укупно 10 слика и 2 графикона.

2. Циљеви и хипотезе

Поглавље циљеви и хипотезе је представљено на две стране текста, где су приказани циљеви постављени у односу на податке приказане у уводном поглављу, а из наведених циљева проистичу основне хипотезе истраживања.

3. Методе, узорци и место експерименталног истраживања

У овом поглављу су детаљно описани материјали, методе, начин одабира узорка и место експерименталног истраживања на укупно 16 страница дисертације и укључују 4 табеле, 4 слике и 7 графикона.

4. Резултати

Поглавље резултати обухвата 46 страна докторске дисертације, у оквиру којих су резултати истраживања приказани у виду две табеле и укупно 36 микроскопских и Western blot слика, као и 91 графикон.

5. Дискусија

Поглавље дискусија је написано на 15 страна, у којем је детаљно извршена анализа добијених резултата и поређење са публикованим студијама.

6. Закључци

Закључци изведени из добијених резултата дисертације су приказани на три стране текста, са укупно 10 закључака.

1-6. Сажетак дисертације обухвата сва претходно наведена поглавља је представљен на српском језику на 26 страна.

7. Списак скраћеница

Списак свих скраћеница коришћених у рукопису дисертације је наведен на 6 страна у виду табеле и обухвата пуно име скраћеница на српском и енглеском језику.

8. Литература

Референце (укупно 290 навода) коришћене у изради дисертације су наведене према Ванкуверским правилима и изложене на 21 страни дисертације.

Целокупна дисертација садржи укупно 8 поглавља; 165 страница; 4 табеле; 67 фигура на којима је приказано укупно 105 графикона и 50 слика (дигиталне фотомикрографије, Western blot слике и биолошке схеме).

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

У поглављу Увод су приказана актуелна сазнања о епидемиологији, молекуларним типовима и терапијском приступу малигнитетима дојке. Описани су молекуларни аспекти развоја малигнух обољења, укључујући поремећаје генске експресије и активности транскрипционих фактора, са акцентом на

транскрипциони фактор сигнални преносилац и активатор транскрипције 3 (енгл. *signal transducer and activator of transcription 3*, СТАТ3). Детаљно су приказана сазнања из савремених научних радова о различитим ћелијским последицама патолошке СТАТ3 активације, укључујући ефекте на ћелијско преживљавање, апоптозу, миграцију, имуни одговор, и деловање на метаболизам малигну ћелија. Размотрене су могућности циљаног терапијског деловања на СТАТ3 и представљене предности и ограничења тренутно развијаних СТАТ3 инхибитора. Такође је размотрен потенцијал примене наночестица (НП) у терапији карцинома дојке и приказани су тренутно развијани наносистеми у циљаном терапијском приступу малигним обољењима дојке са посебним освртом на троструко-негативни карцином дојке (енгл. *triple-negative breast cancer*, ТНБЦ).

У односу на податке који су изнесени у уводном поглављу дисертације, постављени су јасни циљеви из којих произилазе хипотезе истраживања. Основни циљеви дисертације обухватају следеће:

1. Испитивање СТАТ3-модулираног ћелијског липидног профила коришћењем масене спектрометрије након индукције или инхибиције СТАТ3 у два различита ћелијска система ткива дојке, укључујући ТНБЦ ћелијску линију.
2. Идентификација модификације НП са афинитетом циљаног везивања за ћелије са абнормалном СТАТ3 активношћу скринингом библиотеке вишеслојних (енгл. *Layer-by-Layer*, ЛБЛ) наночестица помоћу флуоресцентне микроскопије.
3. Квантификација ћелијског везивања СТАТ3-циљајућих НП проточном цитометријом и валидација резултата у укупно три ћелијске линије дојке коришћењем различитих методолошких приступа.
4. Карактеризација дистрибуције НП у тродимензионалним органоидима ћелија епитела дојке конфокалном микроскопијом.
5. Процена транслационог потенцијала претходних налаза испитивањем ефеката третмана НП са инкорпорираним цисплатином на ћелијску апоптозу помоћу Анексин V/ДАПИ бојења и проточно-цитометријске анализе.
6. Испитивање ефекта акутне терапије гама зрачењем на СТАТ3-зависност ћелијског везивања наночестица.

У поглављу Методе, узорци и место експерименталног истраживања су јасно дефинисани начин и критеријуми избора узорка за истраживање. Да би се обезбедила поновљивост истраживања, детаљно су описани коришћени ћелијски системи и наночестице, као и лабораторијске технике коришћене у истраживању. Том приликом су детаљно описане методе течне хроматографије купловане са тандемском масеном спектрометријом коришћене при одређивању СТАТ3-зависног метаболичког профила ћелија епитела дојке, метода трансфекције ћелија коришћењем малих интерферирајућих РНК (енгл. *small interfering RNA*, сиРНК), микроскопска и проточно цитометријска испитивања ћелијског везивања наночестица, методе одређивања ћелијске вијабилности, као и СТАТ3 експресије и активности применом Western blot и методом квантитативне ланчане реакције полимеразе са реверзном транскриптазом (енгл. *quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction*, qRT-PCR), начин култивације тродимензионалних органоида ћелија епитела дојке, извођење експеримената са гама радијацијом ћелија, а такође су наведене све коришћене активне супстанце и њихове концентрације и инкубациони период при третману ћелија. У овом поглављу је

такође описан начин примене софтверских пакета ImageJ, FlowJo и GSEA и наведени су извори експресионих база података коришћени у биоинформатичким испитивањима. На крају поглавља су наведене статистичке методе и софтвери коришћени за обраду добијених података. У овом поглављу је такође назначено место експерименталног истраживања.

У поглављу Резултати су приказани резултати истраживања у виду текста, табела и фигура које укључују графиконе, Western blot слике и микрографије. Табеларно и графички су представљени резултати испитивања СТАТ3-зависног липидног профила две ћелијске линије епитела дојке, коришћењем три терапијска приступа за инхибицију или активацију СТАТ3. На основу резултата овог испитивања, откривени су N-ацил таурин и арахидонска киселина као метаболити који најзначајније зависе од СТАТ3 активности, те су они даље испитани биоинформатичким методама. Методом анализе обогаћења генске сигнатуре је потврђена и представљена корелација између СТАТ3 активности и експресије ензима који каталишу синтезу или метаболизам ових метаболита коришћењем базе експресије гена 129 узорака тумора пацијената оболелих од карцинома дојке. С обзиром да таурин и арахидонска киселина учествују у модулацији састава и особина плазма мембране, истражена је могућност циљаног везивања наночестица за ћелије са карактеристичним особинама ћелијске мембране као последицом активираних СТАТ3. На основу дате хипотезе је испитана библиотека од 12 различито обложених вишеслојних наночестица, са циљем одређивања спољашњег слоја наночестица који показује преференцијално везивање за ћелије епитела дојке са високом СТАТ3 активношћу. Скринингом библиотеке наночестица флуоресцентном микроскопијом и квантификацијом ћелијског везивања сваке од наночестица у нетрансформисаним и СТАТ3-трансформисаним, односно малигним MCF-10A ћелијама, показано је да наночестице обложене поли-L-глутаминском киселином (ПЛЕ, ПЛЕ-НП) показују преференцијално везивање за СТАТ3-активираних ћелија карцинома дојке. Прецизна квантификација ћелијског везивања ПЛЕ-НП је извршена проточном цитометријом у контролним нетрансформисаним и СТАТ3-трансформисаним MCF-10A ћелијама, а СТАТ3-зависност селективног ћелијског везивања је доказана одсуством датог ефекта приликом инхибиције СТАТ3 фосфорилације (коришћењем руксолитиниба) или транскрипционе активности (коришћењем пириметамини). При датим испитивањима је верификована инхибиција СТАТ3 фосфорилације и транскрипционе активности приказивањем резултата Western blot и qRT-PCR анализе које су рађене паралелно са експериментима ћелијског везивања наночестица. Преференцијално везивање ПЛЕ-НП за СТАТ3-трансформисане MCF-10A ћелије је такође потврђено у системима тродимензионалних органа оида ових ћелија. Дистрибуција и дубинска пенетрација НП у органа оиде су приказани микрографијама и приказом флуоресценције по X, Y и Z осима. НП флуоресценција је квантификована кроз све три димензије коришћењем макро наредбе и за ове сврхе креираним аутоматизованим моделом обраде слика у софтверу ImageJ. Резултати квантификације флуоресценције и микрографије су јасно представљени и укључују расподелу флуоресценције по све три осе у тродимензионалним органа оидима. У поглављу резултати је затим испитан потенцијал примене ПЛЕ-

НП у циљаном деловању на ТНБЦ, чије ћелије генерално показују конститутивну СТАТ3 активацију и тренутно немају циљане терапијске опције. Притом су јасно представљени резултати проточно цитометријског испитивања ћелијског везивања ПЛЕ-НП у две ТНБЦ ћелијске линије са конститутивном активацијом СТАТ3. СТАТ3-зависност ћелијског везивања ПЛЕ-НП је утврђена статистички значајним смањењем везивања НП за ћелије са утишаном СТАТ3 мРНК експресијом, која је изведена засебним коришћењем две сиРНК-е различите јединствене олигонуклеотидне секвенце. Затим су приказани резултати испитивања транслационог потенцијала примене датих наночестица. У датим експериментима је одређиван цитотоксични ефекат цисплатина достављеног путем ПЛЕ-НП и две врсте нециљајућих наночестица, као и слободног неенкапсулираног цисплатина на нетрансформисане и СТАТ3-трансформисане МСF-10А ћелије као и ТНБЦ ћелије SUM159PT независно трансфектоване са две СТАТ3 сиРНК-е или контролном нециљајућом сиРНК-ом. На основу датих испитивања, јасно су приказани резултати израженијег цитотоксичног дејства цисплатина достављеног путем ПЛЕ-НП на СТАТ3-активираних ћелија, а специфичност датог запажања је потврђена недостатком таквог ефекта нециљајућих наночестица. Додатно су представљени резултати ћелијског везивања ПЛЕ-НП за нетрансформисане и СТАТ3-трансформисане МСF-10А ћелије третиране наночестицама након акутне радијације са три различите дозе гама зрачења, чија оптимална доза је претходно утврђена и представљена у резултатима дисертације. Том приликом је забележен синергистички ефекат између гама радијације и степена селективности при везивању ових наносистема за СТАТ3-активираних ћелија.

У поглављу Дискусија су тумачени добијени резултати и упоређивани са подацима из доступне литературе. Детаљно су описана актуелна сазнања о липидном метаболизму малигних ћелија дојке и корелацији утврђених СТАТ3-модулираних метаболита са литературним подацима о њиховом значају у малигним обољењима. Такође су представљена савремена сазнања о утицају СТАТ3 активности на метаболизам липида малигних ћелија, са посебним освртом на ћелије карцинома дојке. Представљени су савремени научни радови на развијању циљане терапије за малигнитете са патолошком прекомерном активношћу СТАТ3. У потпоглављу дискусије о карактеристикама и могућностима примене наночестица, приказана су актуелна сазнања о особинама коришћених вишеслојних наночестица, са посебним акцентом на тренутно познате карактеристике вишеслојних наночестица обложених поли-Л-глутаминском киселином и њиховом понашању у биолошким, односно ћелијским и *in vivo* системима. С обзиром да су наночестице обложене ПЛЕ показале тумор-циљајућа својства и у системима карцинома јајника, биоинформатички је испитана и представљена корелација између степена оваквог циљаног дејства и СТАТ3 активности у испитиваним ћелијским линијама, користећи јавно доступну базу података о карактеристикама малигних ћелијских линија (*Cancer Cell Line Encyclopedia*, CСLE). Предочена је могућност примене резултата истраживања у терапији карцинома дојке, нарочито ТНБЦ којима тренутно недостају циљани терапијски приступи, и размотрен је потенцијал синергистичког дејства са радиотерапијом.

У поглављу Закључци су јасно и концизно наведени закључци који произилазе из резултата истраживања.

У поглављу Литература су наведени савремени извори информација, који су коришћени за припрему истраживања и дискусију резултата, а који су цитирани у тексту докторске дисертације по Ванкуверским правилима.

VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ:

Таксативно навести називе радова, где и када су објављени. Прво навести најмање један рад објављен или прихваћен за објављивање у складу са *Правилима докторских студија Универзитета у Новом Саду* који је повезан са садржајем докторске дисертације. У случају радова прихваћених за објављивање, таксативно навести називе радова, где и када ће бити објављени и приложити потврду уредника часописа о томе.

Радови објављени у научним часописима међународног значаја:

1. **Tošić I**, Heppler LN, Egusquiaguirre SP, Boehnke N, Correa S, Costa DF, et al. Lipidome-based Targeting of STAT3-driven Breast Cancer Cells Using Poly-l-glutamic Acid-coated Layer-by-Layer Nanoparticles. *Mol Cancer Ther.* 2021;20(4):726-38. (M21, IF= 5.615)
2. Liu S, Gandler HI, **Tošić I**, Ye DQ, Giaccone ZT, Frank DA. Mutant KRAS Downregulates the Receptor for Leukemia Inhibitory Factor (LIF) to Enhance a Signature of Glycolysis in Pancreatic Cancer and Lung Cancer. *Mol Cancer Res.* 2021. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-20-0633. (M22, IF= 4.630)
3. Lapidot M, Case AE, Larios D, Gandler HI, Meng C, **Tošić I**, et al. Inhibitors of the Transcription Factor STAT3 Decrease Growth and Induce Immune Response Genes in Models of Malignant Pleural Mesothelioma (MPM). *Cancers (Basel).* 2020;13(1):7. (M21, IF= 6.126)
4. Egusquiaguirre SP, Liu S, **Tošić I**, Jiang K, Walker S, Nicolais M, et al. CDK5RAP3 is a Co-factor for the Oncogenic Transcription Factor STAT3. *Neoplasia.* 2020;22(1):47-59. (M21, IF= 5.696)
5. Cerulli R, Shehaj L, **Tosic I**, Jiang K, Wang J, Frank D, et al. Cytosolic delivery of peptidic STAT3 SH2 domain inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2020; 28(12):115542. (M21, IF= 3.073)
6. Stevens AM, Xiang M, Heppler LN, **Tošić I**, Jiang K, Munoz JO, et al. Atovaquone is Active Against AML by Upregulating the Integrated Stress Pathway and Suppressing Oxidative Phosphorylation. *Blood Adv.* 2019;3(24):4215-27. (M21, IF= 4.910)

Радови у часописима националног значаја:

1. **Tošić IN**, Mikov MM, Stankov KM. Application of nanomedical technology in breast cancer treatment. *Hospital Pharmacology.* 2020;7(1):883-94. (M52)

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА:

1. Квалитативном и квантитативном анализом метаболичког профила СТАТ3-активираних ћелија епитела дојке утврђено је да СТАТ3 врши активну модулацију липидне структуре ћелија карцинома дојке. Најизраженије конзистентне метаболичке промене су забележене у ћелијским нивоима

деривата N-ацил таурина и арахидонске киселине.

2. СТАТ3 генска сигнатура је високо обogaћена у узорцима пацијената са карциномом дојке који показују низак ниво мРНК експресије цистатионин гама лиазае (ЦТХ) и цистеин диоксигеназе (ЦДО1), два ензима потребна за биосинтезу таурина из хомоцистеина. Дато откриће указује на то да СТАТ3 може негативно регулисати транскрипцију наведених ензима, што последично резултује смањењем ћелијског садржаја N -ацил таурина.

3. СТАТ3 генска сигнатура је високо обogaћена у узорцима пацијената са карциномом дојке који имају високу мРНК експресију циклооксигеназе 2 (COX-2) и арахидонат 5-липооксигеназе (5-LOX, ALOX-5), два ензима који катализују конверзију арахидонске киселине у еикозаноиде. Са друге стране, СТАТ3 генска сигнатура није у корелацији са експресијом фосфолипазе A2 (PLA2G4A), ензима потребног за ослобађање арахидонске киселине из фосфолипидног двослоја ћелијске мембране. Дата открића указују на то да СТАТ3 може позитивно регулисати транскрипцију COX-2 и 5-LOX, што резултује смањењем ћелијског нивоа арахидонске киселине.

Таурин и арахидонска киселина су укључени у ремоделовање плазма мембране, пружајући начин диференцијације између СТАТ3-активираних ћелија карцинома дојке и немалигног ткива које генерално одликује низак ниво активности СТАТ3.

4. Скринингом библиотеке од 12 вишеслојних, „слој-по-слој“ (енгл. *Layer-by-Layer*) наночестица које се разликују у структури спољашњег слоја, откривено је да наночестице пресвучене поли-Л-глутаминском киселином (ПЛЕ) показују висок афинитет везивања ка СТАТ3-трансформисаним ћелијама карцинома дојке, док се истовремено знатно мање везују за нетрансформисане ћелије. Специфичност дате интеракције је утврђена одсуством сличног ефекта код наночестица обложених другим површинским хемијским структурама.

5. Карактеризација субћелијске локализације ПЛЕ-НП коришћењем микроскопије високе резолуције указује на то да се ове честице превасходно везују за ћелијску плазма мембрану и нису нужно интернализоване у цитосол.

6. Квантитативном анализом проточне цитометрије утврђено је да се ПЛЕ-НП преференцијално везују за СТАТ3-трансформисане MCF-10A ћелије, показујући 50% већу флуоресценцију наночестица везаних за СТАТ3-трансформисане малигне MCF-10A ћелије у поређењу са флуоресценцијом наночестица везаних за нетрансформисане MCF-10A ћелије. Наведена појава се у потпуности заустављена инхибицијом транскрипционе активности (коришћењем пириметаминa) или фосфорилације СТАТ3 (употребом руксолитиниба), потврђујући СТАТ3-зависност тумор-циљајућих својстава ових наночестица.

7. Наночестице обложене ПЛЕ могу се користити као алат за циљану терапију троструко-негативних карцинома дојке (ТНБЦ), јер показују изражено везивање за ТНБЦ ћелијске линије SUM159PT и MDA-MB-231. Ћелијско везивање је значајно умањено генетском инхибицијом СТАТ3 експресије коришћењем било које од две различите сиРНК секвенце.

8. Анализом дистрибуције ПЛЕ-НП у тродимензионалним органоидима ћелија епитела дојке је откривено да ове наночестице продиру у дубину

тродимензионалних ћелијских структура примарно СТАТ3-трансформисаних ћелијских органоида. Упркос чињеници да СТАТ3-трансформисани органоиди образују густе и масивне тродимензионалне структуре у поређењу са не-трансформисаним органоидима, за шта се могло очекивати да омета продор НП, ови органоиди показују већу квантитативну ПЛЕ-НП флуоресценцију по органоиду (за 40%) као и по запремини органоида (за 73%).

9. Транслациони потенцијал ове студије представљен је знатно израженијим цитотоксичним ефектом цисплатина испорученог путем ПЛЕ-НП у СТАТ3-активираних ћелија у поређењу са ћелијама којима недостаје активирани СТАТ3. Супротно томе, ћелије са активираним СТАТ3 укључујући ТНБЦ ћелије, показале су или већу отпорност или генералну резистенцију на неспецифичне облике терапије као што су слободни цисплатин и НП са енкапсулираним цисплатином којима недостаје површински слој или су обложене структуром без циљајућих својстава, декстран сулфатом.

10. Гама зрачење је значајно смањило везивање ПЛЕ-НП за не-трансформисане ћелије епитела дојке, док је имало минималан ефекат на везивање ПЛЕ-НП за СТАТ3-активираних ћелија. Наведен ефекат је довео до дозно зависног повећања разлике у везивању ПЛЕ-НП, са коначним двоструким повећањем разлике у везивању између не-трансформисаних и СТАТ3-трансформисаних ћелија након радијације гама зрацима у дози од 5Gy.

У закључку, ЛБЛ наночестице са терминалним слојем поли-Л-глутаминске киселине представљају нову класу носача лекова који преференцијално интерагују са СТАТ3-трансформисаним ћелијама епитела дојке и могу понудити синергију са радиотерапијом. Резултати ове дисертације пружају обећавајућу полазну тачку за развој рационалног, циљаног приступа лечењу троструко-негативних карцинома дојке, којима тренутно недостају такве терапијске опције.

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА:

Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.

Начин приказа и тумачења резултата истраживања се оцењује позитивном оценом од стране чланова Комисије.

IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме?

Дисертација је написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе?

Дисертација садржи све битне елементе, укључујући сва потребна поглавља и свеобухватне оригиналне резултате истраживања.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?

Дисертација је оригиналан допринос науци јер представља први познати научни рад у коме је доказано селективно везивање наночестица прекривених поли-L - глутаминском киселином за малигне СТАТ3-активирани хелије. Транслациони потенцијал је доказан преференцијалним цитотоксичним дејством цисплатина достављеног путем ПЛЕ-НП на СТАТ3-активирани хелије, док су неселективни облици доставе терапије имали знатно слабије дејство на такве малигне хелије. Такође, резултати дисертације указују на синергију између циљаног деловања ПЛЕ-НП и терапије гама зрачењем, често коришћене терапије у третману пацијената са карциномом дојке. Узимајући у обзир да 70% карцинома дојке и практично све хелије ТНБЦ показују конститутивну активацију СТАТ3, дата открића представљају обећавајућу полазну тачку за развој принципа селективне доставе хемиотерапеутика малигним хелијама путем СТАТ3-циљајућих ПЛЕ-обложених наночестица.

4. Који су недостаци дисертације и какав је њихов утицај на резултат истраживања?

У истраживању дисертације су коришћене адекватне и вишеструке контроле како би се осигурала робусност резултата и избегло извођење неоснованих закључака. При сваком експерименту је паралелно коришћено више различитих биолошких тј. фармаколошких третмана са истим дејством, као и различити системи наночестица и хелијских линија како би се потврдио испитивани биолошки механизам и осигурала репродуктивност резултата. Сваки биолошки експеримент је изведен најмање два пута, а сваки узорак у анализи је имао најмање три репликае. Самим тиме, мишљење Комисије јесте да нема недостатака у истраживању дисертације који би могли утицати на резултате истраживања.

X ПРЕДЛОГ:
На основу наведеног, комисија предлаже:
а) да се докторска дисертација прихвати, а кандидату одобри одбрана;
б) да се докторска дисертација врати кандидату на дораду (да се допуни односно измени);
в) да се докторска дисертација одбије.

Нови Сад, _____

1. Проф. др Викторија Драгојевић Симић

_____, председник

2. Проф. др Велибор Васовић

_____, члан

3. Доц. др Јасмина Катанић

_____, члан

НАПОМЕНА: Члан комисије који не жели да потпише извештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извештај образложење односно разлоге због којих не жели да потпише извештај и да исти потпише.

DOCTORAL DISERTATION EVALUATION REPORT

I COMMITTEE INFORMATION		
1. Date and body that assigned the committee: 25.05.2021. Committee for education and science, Faculty of Medicine, University Novi Sad		
2. Committee members information in accordance with regulations for doctoral studies at University Novi Sad:		
1. Prof. dr Dragojević Simić Viktorija	Full Professor	Pharmacology and toxicology, 28.02.2013.
Surname and name	Title	Scientific field and date of election
Medical Faculty MMA, University of defence in Belgrade		Chair of the committee
Institution of employment		Committee member role
2. Prof. dr Vasović Velibor	Full Professor	Pharmacology and toxicology, 15.01.2014.
Surname and name	Title	Scientific field and date of election
Department of pharmacology, Faculty of Medicine, University Novi Sad		Member of the committee
Institution of employment		Committee member role
3. Doc. dr Katanić Jasmina	Assistant Professor	Biochemistry, 24.01.2019.
Surname and name	Title	Scientific field and date of election
Department of biochemistry, Faculty of Medicine, University Novi Sad		Member of the committee
Institution of employment		Committee member role
II CANDIDATE INFORMATION		
1. Name, name of one parent, surname: Isidora, Ninoslav, Tošić		
2. Date, municipality and country of birth: 05.06.1991. Novi Sad, Novi Sad, Serbia		
1. Name of the academic institution, previously completed academic program and the title acquired: Faculty of Medicine, University Novi Sad, Integrated academic studies of pharmacy, Master of Pharmacy		
2. Year of enrollment into doctoral studies and name of the PhD study program: 2016. Doctoral academic studies – Preclinical research studies.		
III TITLE OF THE DOCTORAL DISSERTATION:		

Targeting STAT3-driven breast cancer cells using poly-L-glutamic acid-coated Layer-by-Layer nanoparticles

IV OVERVIEW OF THE DOCTORAL DISSERTATION:

Concisely summarize the dissertation content with indicated number of pages, chapters, figures, images, charts etc.

Dissertation content:

1. Introduction

Chapter Introduction is written on 30 pages, including contain a total of 10 images and 2 charts.

2. Aims and hypotheses

Chapter aims and hypotheses is presented on two pages, indicating aims which were set according to findings described in the introductory chapter and from which the main hypotheses were derived.

3. Methods, samples and place of experimental research

This chapter describes in detail used materials, methods, means of sample selection and place of experimental research. It is written on 16 pages of dissertation and includes 4 tables, 4 images and 7 charts.

4. Results

Chapter Results includes 46 pages of the doctoral dissertation, in which research results were presented in the form of two tables and a total of 36 microscopic and Western blot images, as well as 91 charts.

5. Discussion

Chapter Discussion is written on 15 pages of dissertation and represents a detailed analysis of the research results and how they compare with published literature.

6. Conclusions

Conclusions derived from the experimental results are described on three pages of text, with a total of 10 conclusions.

1-6. Summary of the doctoral dissertation encompassing all previously listed chapters is written in Serbian language on 26 pages of text.

7. Abbreviation list

List of all abbreviations used in the dissertation manuscript is indicated in a tabular form (6 pages) and includes the non-abbreviated names in both Serbian and English language.

8. References

Literature (290 references) used in preparation and writing of the dissertation were cited according to Vancouver citation style and are listed on 21 pages of the dissertation.

The doctoral dissertation contains a total of 8 chapters; 165 pages; 4 tables; 67 figures that display a total of 105 charts and 50 images (digital photomicrographs, Western blot images and biological schemes). Number of used and referenced literatures is 290.

V EVALUATION OF INDIVIDUAL DISSERTATION CHAPTERS:

Chapter Introduction describes novel insights into epidemiology, molecular

characteristics and therapeutic approaches in treatment of breast malignancies. Molecular aspects of malignant disorders are explained, including gene expression abnormalities and roles of transcription factors, with focus on transcription factor signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). Thereby, data from novel scientific publications were used to describe the current understandings of various cellular consequences of pathological STAT3 activation, including effects on cell survival, apoptosis, migration, immune response, and effects on metabolism of malignant cells. Possibilities of targeted therapeutic approach to STAT3 are further discussed, with focus on the benefits and limitations of currently developed STAT3 inhibitors. This chapter also describes the therapeutic potentials of nanoparticle (NP) application in development of targeted treatment for breast cancers, with particular focus on triple-negative breast cancers (TNBCs).

Based on the data presented in the introductory chapter of the dissertation, main aims are set in a clear and concise manner. Research hypotheses are directly derived from the set aims. The main aims of the dissertation include the following:

1. Investigation of STAT3-modulated cellular lipid architecture by performing mass spectrometry following induction or inhibition of STAT3 in two different breast cellular systems, including a TNBC cell line.
2. Identification of the optimal NP modification with targeting affinity towards STAT3-driven cells by screening a library of LbL nanoparticles using fluorescent microscopy.
3. Quantification of the STAT3-targeting NP-cell binding by flow cytometry and validation in a total of three breast cell lines.
4. Characterization of NP penetration into the three-dimensional breast cellular organoids by confocal microscopy.
5. Evaluation of the translational potential of these findings by testing the effects of cisplatin-loaded NP treatment on cellular apoptosis by Annexin V/DAPI staining and flow cytometric analysis.
6. Investigation of the effect of acute gamma radiation therapy to NP-cellular binding.

In the chapter Methods, samples and place of experimental research, the means and criteria for sample selection are clearly defined. To ensure the reproducibility of the research, cellular systems, nanoparticles and laboratory techniques used in the research are comprehensively described. With that regard, the following techniques are described in detail: liquid chromatography methods coupled with tandem mass spectrometry used in determining STAT3-dependent metabolic profile of breast epithelial cells; cell transfection methods using small interfering RNAs (siRNA); microscopic and flow cytometric assays for investigating nanoparticle-cell interaction; assays for determining cell viability; STAT3 protein expression and transcriptional activity using Western blot and quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR); three-dimensional cultivation of breast epithelial cell organoids and experiments with gamma irradiation of the cells. In addition, all active substances, their concentrations and incubation period for cell treatments are clearly indicated. This chapter also describes the application of software packages ImageJ, FlowJo and GSEA and provides the sources of expression databases used in bioinformatic analyses. Finally, this chapter includes the statistical methods and software used to process the obtained data, as well as the location of the experimental research.

The dissertation research results are displayed in the Results chapter, in form of text, tables and figures that include graphs, Western blot images and micrographs. The results of investigating STAT3-dependent lipid profile of two breast epithelial cell lines are presented in tabular and graphical form, and were generated by applying three therapeutic approaches for inhibition or activation of STAT3. Based on the results of these experiments, N-acyl taurine and arachidonic acid were identified as metabolites most significantly dependent on STAT3 activation, and these findings were further verified using bioinformatic approaches. The correlation between STAT3 activity and expression of enzymes that catalyze the synthesis or metabolism of these metabolites was determined and confirmed by gene set enrichment analysis (GSEA) using the gene expression database of 129 breast cancer patient samples. Since taurine and arachidonic acid modulate composition and properties of the plasma membrane, the author further investigated possibility of targeted nanoparticle binding to cells with characteristic cell membrane properties as a consequence of activated STAT3. Based on this hypothesis, a library of 12 differently coated Layer-by-Layer (LbL) nanoparticles was examined using fluorescent microscopy, with the aim of determining the nanoparticle composition that shows preferential binding to breast epithelial cells with high STAT3 activity. NP library screen and cell binding quantification of each of the nanoparticles in non-transformed and STAT3-transformed MCF-10A cells showed that NPs coated with poly-L-glutamic acid (PLE, PLE-NP) preferentially bind to STAT3-driven breast cancer cells. Precise quantification of differential PLE-NP cell binding was further determined by flow cytometry in MCF-10A cells and is presented in the form of graphs and histograms. Furthermore, STAT3 dependency of NP selective cellular binding was demonstrated by the absence of such an effect in cells in which STAT3 phosphorylation or transcriptional activity were inhibited using ruxolitinib or pyrimethamine, respectively. In the aforementioned assays, STAT3 phosphorylation and transcriptional inhibition were verified by Western blot and qRT-PCR analyses performed in parallel with NP-cell binding experiments. Preferential PLE-NP binding to STAT3-transformed MCF-10A cells was also confirmed in the three-dimensional organoids of these cells. The distribution and NP penetration into organoids are shown by micrographs and NP fluorescence across X, Y, and Z axis of the organoid. NP fluorescence was quantified throughout all three dimensions using a macro command and an automated image processing model created in ImageJ software for this purpose. The results of organoid NP fluorescence quantification and micrographs are clearly presented by images and charts. Since TNBC cells display constitutive STAT3 activation, this section includes the results of investigating the potential of PLE-NP application in targeted approach to TNBCs, which currently lack such therapeutic options. The results of flow cytometric testing of PLE-NP cell binding to two different TNBC cell lines with constitutive STAT3 activation are clearly presented as flow cytometric histograms and quantification charts. STAT3 dependency of PLE-NP cell binding was confirmed by a statistically significant decrease in NP binding to cells with silenced STAT3 mRNA expression, which was individually performed using two single oligonucleotide sequence siRNAs. Additionally, this section includes the results of investigating the translation potential of these nanoparticles. In the given experiments, the cytotoxic effect of cisplatin delivered via PLE-NP or two types of non-targeting nanoparticles, as well as non-encapsulated cisplatin was investigated in

non-transformed and STAT3-transformed MCF-10A cells, as well as TNBC cells SUM159PT transfected with two different siRNAs to STAT3 or non-targeting siRNA control. The results of these experiments are clearly displayed and indicate a greater cytotoxic effect of cisplatin delivered via PLE-NP on STAT3-activated cells, while lack of such an effect with any of the non-targeted forms of treatment confirms the specificity of STAT3 targeting by PLE-NPs. Finally, this chapter includes the results of assays investigating the effects of acute gamma radiation on STAT3-dependent PLE-NP cellular binding. In these experiments, the cells with induced STAT3 (or non-transformed control cells) were treated with three previously optimized doses of gamma radiation, after which were treated with PLE-NPs. The results of the following flow cytometric PLE-NP cell binding quantification indicate a synergistic effect between gamma radiation and the degree of selectivity in binding of these nanosystems to STAT3-activated cells.

In the Discussion chapter, the obtained results are interpreted, discussed and compared with the data from the recently published literature. Current knowledge on lipid metabolism of breast malignant cells is discussed in detail, together with literature findings about identified STAT3-modulated metabolites and their importance in malignant progression. Novel findings on the effects of STAT3 activity on cancer cells lipid metabolism are also described, with emphasis on breast cancers. Additionally, recently developed targeted therapies for STAT3-driven malignancies are discussed. This chapter also includes a subchapter about the characteristics and potentials of nanoparticle application, current understandings of the properties of Layer-by-Layer nanoparticles, with emphasis on the established features of PLE-coated nanoparticles and their behavior in biological and cellular systems. Since PLE-NPs also showed tumor-targeting properties in ovarian cancer systems, the correlation between the degree of such targeted affinity and STAT3 activity in the tested cell lines was examined by computational tools and employment of expression data available in Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE). Application of radiotherapy in breast cancer treatment as well as synergistic NP and radiation effects are discussed in this chapter. Finally, potentials of utilizing the results of this research in treatment of breast cancers and TNBCs in particular, were highlighted at the end of this chapter.

The conclusions directly derived from the dissertation study results are clearly and concisely stated in the chapter Conclusions.

The chapter References lists novel sources of scientific publications which were used for the preparation of research and discussion of results. References are cited in the text of the doctoral dissertation according to the Vancouver citation style.

VI LIST OF SCIENTIFIC AND PROFESSIONAL MANUSCRIPTS PUBLISHED OR ACCEPTED FOR PUBLICATION, WHICH ARE BASED ON THE RESULTS OF THE DOCTORAL RESEARCH:

Manuscript publications in scientific journals of international relevance:

1. **Tošić I**, Heppler LN, Egusquiaguirre SP, Boehnke N, Correa S, Costa DF, et al. Lipidome-based Targeting of STAT3-driven Breast Cancer Cells Using Poly-l-glutamic Acid-coated Layer-by-Layer Nanoparticles. *Mol Cancer Ther.* 2021;20(4):726-38. (M21, IF= 5.615)
2. Liu S, Gandler HI, **Tošić I**, Ye DQ, Giaccone ZT, Frank DA. Mutant KRAS Downregulates the Receptor for Leukemia Inhibitory Factor (LIF) to Enhance a

- Signature of Glycolysis in Pancreatic Cancer and Lung Cancer. *Mol. Cancer Res.* 2021. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-20-0633. (M22, IF= 4.630)
3. Lapidot M, Case AE, Larios D, Gandler HI, Meng C, **Tošić I**, et al. Inhibitors of the Transcription Factor STAT3 Decrease Growth and Induce Immune Response Genes in Models of Malignant Pleural Mesothelioma (MPM). *Cancers (Basel)*. 2020;13(1):7. (M21, IF= 6.126)
 4. Egusquiaguirre SP, Liu S, **Tošić I**, Jiang K, Walker S, Nicolais M, et al. CDK5RAP3 is a Co-factor for the Oncogenic Transcription Factor STAT3. *Neoplasia*. 2020;22(1):47-59. (M21, IF= 5.696)
 5. Cerulli R, Shehaj L, **Tosic I**, Jiang K, Wang J, Frank D, et al. Cytosolic delivery of peptidic STAT3 SH2 domain inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2020; 28(12):115542. (M21, IF= 3.073)
 6. Stevens AM, Xiang M, Heppler LN, **Tošić I**, Jiang K, Munoz JO, et al. Atovaquone is Active Against AML by Upregulating the Integrated Stress Pathway and Suppressing Oxidative Phosphorylation. *Blood Adv.* 2019;3(24):4215-27. (M21, IF= 4.910)

Manuscript publications in scientific journals of national relevance:

1. **Tošić IN**, Mikov MM, Stankov KM. Application of nanomedical technology in breast cancer treatment. *Hospital Pharmacology*. 2020;7(1):883-94. (M52)

VII CONCLUSIONS AND RESEARCH RESULTS:

1. Qualitative and quantitative analysis of STAT3-driven metabolic profile in breast cellular systems revealed that STAT3 actively modulates the lipid structure of breast cancers. The most consistent and potent metabolic alterations are observed with the cellular abundance of N-acyl taurine and arachidonic acid derivatives.
2. STAT3 gene expression signature is highly enriched in the breast cancer patient samples that have low expression of cystathionine gamma lyase (CTH) and cysteine dioxygenase (CDO1), the two enzymes required for taurine biosynthesis from homocysteine. This finding indicate that STAT3 may negatively regulate transcription of these enzymes, resulting in reduction of cellular N-acyl taurine content.
3. STAT3 gene expression signature is highly enriched in the breast cancer patient samples that have high expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) and arachidonate 5-lipoxygenase (5-LOX, ALOX-5), the two enzymes that catalyzes the conversion of arachidonic acid into eicosanoids, and does not correlate with the expression of phospholipase A2 (PLA2G4A), the enzyme required for release of arachidonic acid from phospholipid bilayer of cell membrane. These findings indicate that STAT3 may positively regulate transcription of COX-2 and 5-LOX, resulting in reduction of cellular arachidonic acid content.
Both taurine and arachidonic acid are involved in plasma membrane remodeling, providing a plausible distinction between STAT3-driven breast cancer cells and non-malignant tissue.
4. By screening a library of 12 differently coated Layer-by-Layer nanoparticles, we identified poly-L-glutamic acid coated nanoparticles to display targeting affinity towards STAT3-transformed breast cancer cells, while showing attenuated binding

to non-transformed counterparts. The specificity of this NP-cell interaction is displayed by absence of a similar effect with nanoparticles coated with other surface chemistries.

5. Characterization of PLE-NPs subcellular distribution by high resolution microscopy indicates that these particles primarily bind to the cellular plasma membrane, and may not necessarily be internalized into the cytosol.
6. Quantitative flow cytometry analysis indicates that PLE-NPs preferentially bind to STAT3-transformed MCF-10A cells, displaying 50% greater cell-associated nanoparticle fluorescence compared to their non-transformed counterparts. This event is completely reversed with STAT3 transcriptional (using pyrimethamine) and phosphorylation (using ruxolitinib) inhibition, confirming STAT3-dependency of tumor-targeting properties of these nanoscale systems.
7. PLE-coated nanoparticles could be used as the targeting agent for triple-negative breast cancers, as they show strong binding to TNBC cell lines SUM159PT and MDA-MB-231. The cellular binding is significantly attenuated with genetic inhibition of STAT3 using each of the two different siRNA sequences.
8. Analyses of the PLE-NP effect in three dimensional breast cellular organoids revealed that these nanoparticles potently penetrate in depth of three dimensional cancer structures. Despite the fact that STAT3-transformed organoids grew in denser and massive three-dimensional structures than non-transformed organoids, which may have been expected to impede the NP penetration, these organoids showed greater quantitative PLE-NP fluorescence per organoid (by 40%) as well as per organoid volume (by 73%).
9. The translational potential of this study is presented by significantly stronger cytotoxic effect of cisplatin delivered via PLE-NPs to STAT3-driven cells compared to cells lacking activated STAT3. On the contrary, cells with activated STAT3, including TNBC cells, showed either greater resistance or non-responsiveness to non-specific treatments, including free cisplatin and cisplatin-loaded NPs lacking the surface layer or complemented with non-targeting dextran sulfate.
10. Gamma irradiation significantly reduced the binding of PLE-NPs to non-transformed mammary epithelial cells, while having minimal effect on binding to STAT3-induced cells. This led to radiation dose-dependent increase in differential cell binding of PLE-NPs, resulting in 2-fold increase in binding difference between non-transformed and STAT3-transformed cells following 5 Gy radiation.

In conclusion, LbL nanoparticles with a terminal poly-L-glutamic acid layer represent a new class of drug carriers that preferentially interact with STAT3-transformed mammary epithelial cells, and may offer synergy with radiation therapy. These findings provide a promising starting point for the development of a rational, targeted approach to treating triple-negative breast cancers, which currently lack such therapeutic options.

VIII EVALUATION OF STUDY RESULTS PRESENTATION AND INTERPRETATION:

Explicitly indicate positive or negative assessment of study results presentation and interpretation.

Dissertation evaluation committee indicates a positive assessment of the study results presentation and interpretation.

IX FINAL ASSESSMENT OF DOCTORAL DISSERTATION:

Explicitly state if the dissertation is or is not written in accordance with submitted dissertation proposal, as well as does it contain all the important elements. Provide clear, precise and concise answers to questions 3 and 4:

1. Is the dissertation written in accordance with previously submitted dissertation proposal?

Dissertation is written in accordance with previously submitted dissertation proposal.

2. Does the dissertation contain all the important elements?

Dissertation contains all the important elements, including all necessary chapters and comprehensive original research results.

3. Why does this dissertation provide original contributions to science?

Dissertation provides original contributions to science, as it represents the first known scientific publication that demonstrates selective binding of poly-L-glutamic acid-coated nanoparticles to malignant STAT3-driven cells. Translational potential of these findings is evidenced by preferential cytotoxic effect of cisplatin delivered via PLE-NPs to STAT3-driven cells, while non-targeted forms of treatment cause little effect to such malignant cells. Results of this study further indicate a synergy between targeting ability of PLE-NPs and therapy with gamma irradiation, a frequently used form of breast cancer treatment. Considering that 70% of breast cancers and almost all TNBC display constitutive STAT3 activation, findings from this dissertation represent a promising starting point for development of system for selective delivery of chemotherapies to malignant cells using STAT3-targeting PLE-coated nanoparticles.

4. What are the limitations of this dissertation and what are their effects on research results?

To assure robustness of the study and avoid any biased conclusions, multiple adequate controls were used in the dissertation research. Within each of the experiments, multiple different pharmacological or biological treatments with the same effect were used in parallel, as well as different cellular and nanoparticle systems. This resulted in multiple confirmations of the examined biological mechanisms and assured reproducibility of the results. Each biological experiment was conducted at least two times and each sample in the analysis had at least three replicates. Therefore, opinion of the Committee is that there are no limitations which could have affected the results of the study.

X PROPOSAL:
Based on the indicated information, committee is proposing:
Ⓐ acceptance of the dissertation and permission for dissertation defense;
b) dissertation revisions by the candidate (amendments and/or modifications);
b) doctoral dissertation rejection.

Novi Sad, _____

1. Prof. dr Viktorija Dragojević Simić
_____, Committee chair

2. Prof. dr Velibor Vasović
_____, Committee member

3. Doc. dr Jasmina Katanić
_____, Committee member

NOTE: Committee member that does not share the opinion of the majority of committee and does not want to sign the dissertation evaluation form is obligated to amend this form by explaining why he or she does not approve the dissertation evaluation form and signing the amended document.