

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 15.06.2020. godine, broj 9700/08-JRS, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Karakterizacija genetičke osnove zaostajanja u razvoju i intelektualnih poteškoća kod dece“

kandidata Jelene Ruml Stojanović, zaposlene na Univerzitetskoj dečjoj klinici u Beogradu. Mentor je Doc. dr Goran Čuturilo, komentor je Prof. dr Ivana Novaković.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Doc. dr Dragana Bogićević, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Ivana Kavečan, Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu
3. Doc. dr Nela Maksimović, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija Jelene Ruml Stojanović napisana je na ukupno 144 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija,

zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 10 tabela i 15 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **uvodu** su predstavljene definicije i klasifikacija zaostajanja u razvoju i intelektualnih poteškoća, dosadašnja saznanja o genetičkoj etiologiji i patofiziologiji ovih entiteta, metodološki pristupi za analizu promena u broju kopija (analiza kariotipa, fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH), višestruko umnožavanje proba zavisno od ligacije (MLPA), metoda molekularnog kariotipa) i identifikaciju genskih varijanti (genski paneli, kliničko egzomsko sekvenciranje, sekvenciranje celog egzoma i sekvenciranje celog genoma). Na adekvatan način je predstavljen značaj postavljanja uzročne dijagnoze, opisane su specifične terapije neurorazvojnih bolesti, a napravljen je i osvrt na preklapanje fenotipa neurorazvojnih bolesti. Prikazane su trenutno aktuelne preporuke i vodiči za testiranje pacijenata sa zaostajanjem u razvoju i intelektualnim poteškoćama

Ciljevi rada su precizno definisani, a odnose se na utvrđivanje uzročnih varijanti, njihovog tipa i učestalosti kod dece sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama, ispitivanje korelacije genotipa i fenotipa, kao i korelacije kliničkih parametara i uzročnih varijanti identifikovanih analizom molekularnog kariotipa i kliničkog egzomskog sekvenciranja sa ciljem kreiranja dijagnostičkog algoritma.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o studiji koja je uključila 220 pacijenata sa srednje teškim/teškim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama. Istraživanje je sprovedeno na Univerzitetnoj dečjoj klinici u saradnji sa Institutom za neurologiju Kliničkog centra Srbije, Centrom za mendelovsku genomiku, Kliničkog instituta za medicinsku genetiku iz Ljubljane, Institutom za humanu genetiku, Medicinskog fakulteta u Beogradu i laboratorijom Qgenomics iz Španije. Precizno su definisani kriterijurimi za učešće pacijenata u studiji. Za analizu promena u broju kopija korišćene su MLPA metoda i metoda molekularnog kariotipa, dok je za analizu genskih varijanti korišćena metoda kliničkog egzomskog sekvenciranja. Za prikaz i analizu podataka korišćene su deskriptivne i analitičke statističke metode. Roditelji/staratelji svih pacijenata su, nakon detaljnog informisanja o istraživanju, potpisali saglasnost za učešće pacijenata u

studiji. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog odbora Univerzitetske dečje klinike (odluka doneta 18.12.2015., org.jed. 017/6, broj 26/357) kao i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (odluka doneta 13.03.2017., broj 29/III-7).

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 289 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Analiza subtelomernih regiona hromozoma je urađena kod 110 pacijenata koristeći kitove SALSA MLPA P036 i SALSA MLPA P070. Promena u broju kopija je identifikovana kod njih 13: delecija je identifikovana kod osam pacijenata, duplikacija kod dvoje, dok je istovremeno prisustvo delecije i duplikacije detektovano kod tri pacijenta. Jedina rekurentna aberacija, delecija 1p36.33 regiona, identifikovana je kod tri pacijenta. Identifikovane varijante su detaljnije okarakterisane i dodatno potvrđene metodom molekularnog kariotipa kod 11 pacijenata sa pozitivnim MLPA nalazom. Kod devet pacijenata su promene u broju kopija okarakterisane kao patogene, dok su kod dva pacijenta okarakterisane kao varijante nepoznatog značaja. Ukupno, MLPA analiza je identifikovala promene u broju kopija kod 13 (11,8%, 13/110) pacijenata. S obzirom na to da su dalja testiranja pokazala da se kod dva pacijenta radi o varijantama nepoznatog značaja, oni su isključeni prilikom izračunavanja dijagnostičke moći metode koja iznosi 10% (11/110).

Analiza molekularnog kariotipa je urađena kod 110 pacijenata. Patogena promena u broju kopija je identifikovana kod njih 29, čime je postignuta stopa detekcije od 26,4% (29/110). Prisustvo delecije je detektovano kod 17 pacijenata (58,6%, 17/29), prisustvo duplikacije kod sedam pacijenata (24,1%, 7/29), dok je kod pet pacijenata identifikovano prisustvo delecije i duplikacije (17,3%, 5/29). Najmanja identifikovana varijanta je bila veličine 487 Kb a najveća 22,1 Mb. Sve identifikovane patogene i verovatno patogene

delecije i duplikacije su nastale *de novo*, osim u slučaju jednog pacijenta koji je deleciju 15q13.3 regiona nasledio od oca. Kod 19 pacijenata je postavljena dijagnoza dobro definisanog mikrodelecionog ili mikroduplikacionog sindroma, dok su kod preostalih identifikovane retke delecije/duplikacije ili prisustvo dve patogene promene u broju kopija. Analizom korelacije kliničkih parametara i rezultata molekularnog kariotipa je utvrđeno da postoji korelacija između prisustva multiplih *major* mana i mikrocefalije i patološkog nalaza molekularnog kariotipa. Analizom korelacije različitih kombinacija kliničkih parametara i rezultata molekularnog kariotipa pokazano je da postoji statistički značajna korelacija između prisustva multiplih *major* mana i normalnog longitudinalnog rasta i patološkog nalaza molekularnog kariotipa.

Kliničko egzomsko sekvenciranje je urađeno kod 110 pacijenata. Patogena ili verovatno patogena varijanta (klasa V i IV) je identifikovana kod 48 pacijenata, čime je postignuta stopa detekcije od 43,6% (48/110). Autozomno-dominantan obrazac nasleđivanja je bio prisutan kod 60,4% (29/48) pacijenata, autozomno-recesivan kod 33,3% (16/48) pacijenata, dok je X-vezano recesivno i X-vezano dominantno nasleđivanje opisano kod dva (4,2%, 2/48) i jednog (2,1%, 1/48) pacijenata respektivno. Ukupno je detektovano 55 varijanti kod 48 pacijenata, od toga 37 novih varijanti koje prethodno nisu opisane u literaturi. Od identifikovanih varijanti najzastupljenije su bile *missense* varijante (23/55, 41,8%) i *nonsense* varijante (23,6%, 13/55). *Frameshift*, *splice-site* varijante i *in-frame* delecije su identifikovane deset (18,2%, 10/55), šest (10,1%, 6/55) i tri (5,4%, 3/55) puta respektivno. Samo kod jednog pacijenta su identifikovane varijante u dva gena, kod svih ostalih pacijenata detektovane su varijante u jednom genu. Jedina varijanta koja je identifikovana kod više od jednog pacijenta je NM_207346.2:c.919G>T p.Ala307Ser u *TSEN54* genu. Sve identifikovane varijante su asocirane sa dobro okarakterisanim bolestima iz OMIM baze (engl., *Online Mendelian Inheritance in Man*) (Hamosh *et al.*, 2005). Specifičnu kliničku dijagnozu je imalo 19 (17,3%, 19/110) pacijenata pre testiranja metodom kliničkog egzomskog sekvenciranja. Kod sedam (36,8%, 7/19) od njih je dijagnoza potvrđena, kod četiri (21%, 4/19) je postavljena nova dijagnoza, a osam (41,2%, 8/19) je imalo negativan nalaz kliničkog egzomskog sekvenciranja. Analizom korelacije kliničkih parametara i rezultata kliničkog egzomskog sekvenciranja utvrđeno je

da postoji korelacija između prisustva jedne *major* mane i patološkog nalaza kliničkog egzomskog sekvenciranja. Analizom korelacije različitih kombinacija kliničkih parametara i rezultata kliničkog egzomskog sekvenciranja pokazano je da postoji statistički značajna korelacija između prisustva jedne *major* mane i normalnog longitudinalnog rasta, i prisustva patoloških genskih varijanti.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

U ovom istraživanju MLPA analiza subtelomernih regiona je omogućila postavljanje dijagnoze kod 11 (10%, 11/110) pacijenata. Većina dosadašnjih studija je pokazala da se stopa detekcije primenom MLPA analize subtelomernih regiona kod pacijenata sa zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama kreće oko 5% (Wu *et al.*, 2010; Behjati and Tarpey, 2013; Mundhofir *et al.*, 2013; Medina *et al.*, 2014; Damnjanovic *et al.*, 2015). U pojedinim studijama, postignute su i više stope detekcije od 7,3% (Pohovski *et al.*, 2013), 8,9% (Santa María *et al.*, 2016) i 10% (Palomares *et al.*, 2006). Primenom analize molekularnog kariotipa je dobijena stopa detekcije od 26,4% (29/110), što je u skladu sa literaturnim podacima koji ukazuju da dijagnostička moć ove metode kod pacijenata sa zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama varira od 13,2% (Shoukier *et al.*, 2013) do 30% (Cappuccio *et al.*, 2016). Dijagnostička moć kliničkog egzomskog sekvenciranja od 43,6% (48/110) postignuta u našoj studiji je u okviru raspona iz prethodno publikovanih studija koji se kreće od 24,6% do 50% za metode kliničkog egzomskog sekvenciranja i sekvenciranja celog egzoma (Yang *et al.*, 2014; Fitzgerald *et al.*, 2015; Wright *et al.*, 2015; Kuperberg *et al.*, 2016; Okazaki *et al.*, 2016; Bowling *et al.*, 2017; Chérot *et al.*, 2018; Gieldon *et al.*, 2018; Pajusalu *et al.*, 2018). Stopa detekcije dobijena u našem istraživanju ukazuje na to da se kliničko egzomsko sekvenciranje može uspešno koristiti kod pacijenata sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama, i da dijagnostička moć kliničkog egzomskog sekvenciranja parira onoj kod sekvenciranja celog egzoma.

Prema trenutno važećim preporukama, prvi dijagnostički test kod pacijenata sa intelektualnim zaostajanjem, urođenim anomalijama, i bolestima iz spektra autizma je

analiza molekularnog kariotipa (Miller *et al.*, 2010; South *et al.*, 2013). Međutim, rezultati nedavno sprovedenih istraživanja ukazuju da bi kod pacijenata sa genetičkim bolestima, uključujući tu i neurorazvojne bolesti, u prvom koraku trebalo uraditi analizu sekvenciranja celog egzoma/genoma (Clark *et al.*, 2018; Srivastava *et al.*, 2019). Konkretni vodiči još uvek ne postoje. Korelacija multiplih malformacija sa patološkim nalazom molekularnog kariotipa je pokazana u nekoliko studija (Shoukier *et al.*, 2013; Caramaschi *et al.*, 2014; Caballero Pérez *et al.*, 2017). Korelacija malformacija srca sa patološkim nalazom molekularnog kariotipa je više puta potvrđena, i to ventrikularnog septalnog defekta (Roselló *et al.*, 2014; Maini *et al.*, 2018), atrijalnog septalnog defekta (Cappuccio *et al.*, 2016) i generalno kongenitalnih srčanih mana (Shoukier *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2018; Maini *et al.*, 2018). Druge fenotipske karakteristike koje su publikovane u više različitih studija su dismorfizmi (generalno, lica i šaka, ili samo lica) (Caramaschi *et al.*, 2014; Preiksaitiene *et al.*, 2014; Roselló *et al.*, 2014; D'Arrigo *et al.*, 2016; Caballero Pérez *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 2018; Maini *et al.*, 2018), pozitivna porodična istorija (Cappuccio *et al.*, 2016; D'Arrigo *et al.*, 2016; Caballero Pérez *et al.*, 2017), hipotonija (Caballero Pérez *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 2018; Maini *et al.*, 2018), cerebelarne malformacije (Preiksaitiene *et al.*, 2014; Maini *et al.*, 2018) i mikrocefalija (Shoukier *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2018). Podaci o korelaciji fenotipskih karakteristika sa patološkim rezultatima metoda sekvenciranja nove generacije su veoma oskudni. Većina publikovanih radova je imala za cilj određivanje stope detekcije za specifične grupe pacijenata, kao što su oni sa epilepsijom, intelektualnim poteškoćama ili autizmom. Podgrupe na osnovu kliničkih karakteristika su vrlo retko formirane i analizirane. Studija Geldon i saradnika je pokazala da je stopa detekcije uzročnih varijanti primenom kliničkog egzomskog sekvenciranja veća kod pacijenata sa intelektualnim poteškoćama koji nemaju epilepsiju, u odnosu na one koji je imaju (Gieldon *et al.*, 2018). To je neobično ako se uzme u obzir da literaturni podaci ukazuju na vrlo visoke stope detekcije metoda sekvenciranja nove generacije kod pacijenata sa epilepsijom (Helbig *et al.*, 2016; Demos *et al.*, 2019). Od ostalih ispitivanih fenotipskih karakteristika, veća stopa detekcije je pokazana kod pacijenata sa specifičnom kliničkom dijagnozom pre testiranja (Gieldon *et al.*, 2018; Pajusalu *et al.*, 2018). Pokazano je i da veću verovatnoću detekcije metodom kliničkog egzomskog sekvenciranja imaju

pacijenti sa neurodegenerativnim bolestima (Chérot *et al.*, 2018), dok na značajno veću detekcionu moć egzomskog sekvenciranja kod pacijenata sa negativnom porodičnom anamnezom (38%) u odnosu na one sa pozitivnom porodičnom anamnezom (19,5%), ukazuje studija Bovling i saradnika (Bowling *et al.*, 2017).

U našoj studiji je utvrđena korelacija jedne *major* mane sa patološkim nalazom kliničkog egzomskog sekvenciranja i korelacija multiplih *major* mana i mikrocefalije sa patološkim nalazom molekularnog kartiopa. Smatramo da je ovo u skladu sa literaturnim podacima s obzirom na to da su mutiple kongenitalne anomalije često asociirane sa promenama u broju kopija koje obično obuhvataju veliki broj gena pa se samim tim očekuju i promene na više organskih sistema (Rosenfeld and Patel, 2016; Maini *et al.*, 2018). Sa druge strane, izolovane srednje teške i teške nesindromske intelektualne poteškoće su u najvećem broju slučajeva uzrokovane *de novo* intragenjskim alteracijama (Rauch *et al.*, 2012). Dismorfizmi su u našoj studiji češći kod pacijenata sa normalnim nalazom kliničkog egzomskog sekvenciranja, ipak, nije dobijena statistička značajnost. Takođe, u našoj studiji, korelacija dismorfizama sa patološkim nalazom molekularnog kariotipa nije ustanovljena. Iako nespecifični, i često prisutni čak i u opštoj populaciji, mnogobrojne studije ipak pokazuju da dismorfizmi jesu u korelaciji sa patološkim nalazom molekularnog kariotipa (Caramaschi *et al.*, 2014; Preiksaitiene *et al.*, 2014; Roselló *et al.*, 2014; D'Arrigo *et al.*, 2016; Caballero Pérez *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 2018; Maini *et al.*, 2018).

Za pacijente sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama, na osnovu rezultata koji su dobijeni u ovoj studiji i njihovog poređenja sa podacima iz literature (Shoukier *et al.*, 2013; Caramaschi *et al.*, 2014; Caballero Pérez *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 2018; Geldon *et al.*, 2018; Pajusalu *et al.*, 2018), formiran je algoritam genetičkog testiranja.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Stojanovic JR, Miletic A, Peterlin B, Maver A, Mijovic M, Borlja N, Dimitrijevic B, Soldatovic I, Cuturilo G. Diagnostic and Clinical Utility of Clinical Exome Sequencing in

Children With Moderate and Severe Global Developmental Delay/Intellectual Disability. *J Child Neurol.* 2020;35(2):116-131.

(doi: 10.1177/0883073819879835)

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Karakterizacija genetičke osnove zaostajanja u razvoju i intelektualnih poteškoća kod dece“ Jelene Ruml Stojanović, kao prvi ovakav rad u našoj populaciji predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju genetičke osnove zaostajanja u razvoju i intelektualnih poteškoća. Testiranje pacijenata sa zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama prema dijagnostičkom algoritmu koji je formiran na osnovu rezultata ovog istraživanja omogućiće unapređenje kliničke prakse kroz optimalnu primenu tehnologija, smanjenje troškova i ubrzanje dijagnostičke procedure. Takođe, u ovoj studiji su opisane četiri nove retke promene u broju korpija, kao i 37 novih genskih varijanti, čime su dopunjena dosadašnja saznanja o korelaciji genotipa i fenotipa, i omogućen dodatni uvid u veliku genetičku i kliničku heterogenost zaostajanja u razvoju i intelektualnih poteškoća. Dodatno, sve identifikovane genske varijante su objavljene u javno dostupnoj bazi ClinVar čime je dat doprinos široj naučnoj zajednici.

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

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju Jelene Ruml Stojanović i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 24.06.2020.

Članovi Komisije:

Doc. dr Dragana Bogićević

Prof. dr Ivana Kavečan

Doc. dr Nela Maksimović

Mentor:

Doc. dr Goran Čaturilo

Komentor:

Prof. dr Ivana Novaković
