

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На I редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 16. 10. 2020. године, на основу молбе ментора, др Милене Угрин, вишег научног сарадника на Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду, и др Соње Павловић, научног саветника на Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације Јоване Д. Комазец, истраживача сарадника на Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду, под насловом: **„Варијанте кодирајућих и некодирајућих региона гена узрочника дијабетеса адултног типа код младих као модулатори фенотипа и регулатори генске експресије“**, у саставу: др Милена Угрин, виши научни сарадник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду, ментор; др Соња Павловић, научни саветник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду, ментор; проф. др Светлана Радовић, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, члан; др Михаило Јелић, доцент, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, члан; др Вера Здравковић, доцент, Медицински факултет, Универзитет у Београду, члан.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

### ИЗВЕШТАЈ

#### Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација кандидаткиње Јоване Д. Комазец **„Варијанте кодирајућих и некодирајућих региона гена узрочника дијабетеса адултног типа код младих као модулатори фенотипа и регулатори генске експресије“** представља оригинално истраживање које за тему има проучавање генетичке основе посебног облика дијабетеса означен као дијабетес адултног типа код младих или „MODY“ дијабетес (од енглеског акронима енгл. *Maturity-onset diabetes of the young, MODY*), затим потенцијално откривање нових варијанти у генима узрочницима, као и функционалну карактеризацију одабраних варијанти детектованих код пацијената.

Ова докторска дисертација урађена је у Лабораторији за молекуларну биомедицину Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду, у

оквиру пројекта ”Ретке болести: молекуларна патофизиологија, дијагностички и терапијски модалитети и социјални, етички и правни аспекти (ИИИ 41004)”.

Докторска дисертација садржи: Насловну страну на српском и енглеском језику, Податке о менторима и члановима комисије, Резиме на српском и енглеском језику са кључним речима (10 кључних речи/појмова), Садржај, Текст по поглављима, Списак литературе и Прилоге. Докторска дисертација написана је на 115 страница, садржи 24 слике и 11 табела. Дисертација је подељена на 7 поглавља: **Увод** (странице 1-23), **Циљ рада** (странице 24-25), **Материјал и методе** (странице 26-52), **Резултати** (странице 53-70), **Дискусија** (странице 71-82), **Закључци** (странице 83-85) и **Списак литературе** (Библиографија) (странице 86-97). У прилозима се налазе: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу.

### **Анализа докторске дисертације**

Предмет докторске дисертације била је молекуларно-генетичка карактеризација пацијената са клиничким симптомима „MODY“ дијабетеса, одређивање спектра варијанти у генима узрочницима „MODY“ дијабетеса и генотип-фенотип корелација детектованих варијанти. Докторска теза укључује и функционалну карактеризацију одабраних детектованих варијанти у промоторском региону гена *GCK* и *HNFIА* које су пронађене код пацијената.

У поглављу **УВОД** приказана су општа и савремена сазнања о „MODY” дијабетесу, његовој учесталости која је различита у популацијама, и тешкоћама препознавања MODY дијабетеса међу пацијентима са дијабетесом. Указано је на значај постављања исправне дијагнозе која се пре свега огледа у давању адекватне терапије која је различита од оне која се даје у случају дијагнозе дијабетеса типа 1 или типа 2, а коју добијају непрепознати „MODY“ пацијенти. У овом поглављу је приказана проблематика везана за клиничку и генетичку хетерогеност која је последица великог броја гена који су одговорни за настанак „MODY“ дијабетеса. Детаљно су описана четири гена најчешће одговорна за настанак овог типа дијабетеса (гени *GCK*, *HNFIА*, *HNFIА* и *HNFIВ*), структура и функција гена, патофизиологија, и „MODY“ подтипови специфични за сваки ген (клиничке карактеристике и терапија која је специфична за сваки подтип). Преостали гени који су доведени у везу са „MODY“ дијабетесом, а који су одговорни за настанак веома ретких „MODY“ подтипова су описани укратко, при чему су пружене основне информације о генима и асоцираним „MODY“ подтипovima.

Поглавље **ЦИЉЕВИ** садржи јасно дефинисане циљеве овог истраживања. У Србији до сада није испитана генетичка основа „MODY“ дијабетеса, те се циљеви првог дела истраживања односе на испитивање генетичке основе клинички окарактерисаних

педијатријских „MODY“ пацијената, утврђивање спектра варијанти и одређивање генотип-фенотип корелације код пацијената. Циљеви другог дела истраживања односе се на анализу и детекцију варијанти у промоторском региону 4 „MODY“ гена - *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A* и *HNF1B*, а потом и функционалну карактеризацију варијанти и анализу интеракције потенцијалних транскрипционих фактора са регионом промотра у којима се варијанте налазе, а ради бољег разумевања ефеката ових варијанти на експресију датих гена, и последично ефекта на фенотип код пацијената.

У оквиру поглавља **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** прво су наведени Испитаници и Материјал у којем су наведени сви прајмери, пробе и ћелијске линије који су коришћени у овом истраживању. У потпоглављу Испитаници наведен је број пацијената (29) и здравих контрола (20), као и то да је клиничка дијагноза постављена на Одељењу за ендокринологију Универзитетске дечје клинике у Београду. Наведено је и да за ово истраживање постоји одобрење етичког одбора Универзитетске дечје клинике у Београду. У потпоглављу Методе описане су савремена метода секвенцирања нове генерације (енг. „NGS“), метода истовременог умножавања везаних проба (енг. „MLPA“), затим и метода ланчане рекације полимеразе (енг. „PCR“), које су коришћене за детекцију генских варијанти код пацијената. У наставку поглавља описане су методе за *in vitro* анализу промоторских региона „MODY“ гена. Описана је методологија рекомбинантне ДНК (рестрикциона дигестија, лигација), култивисање бактерија, прављење компетентних ћелија (*DH5-α E. coli*) и њихова трансформација и изоловање плазмидне ДНК. Међу методама за функционалну карактеризацију одабраних детектованих варијанти описане су следеће методе: гајење перманентних ћелија у култури (две врсте: *Rin-5F* и *HepG2*), метода трансфекције у одговарајућу ћелијску линију, „CAT“ функционални есеј (хлорамфеникол ацетилтрансферазе (*CAT*)), бета галактозидазни есеј. У наставку су описане методе за испитивање интеракција потенцијалних транскрипционих фактора са промоторским регионом у коме се налази одабрана детектована варијанта, у које спада метода успорене електрофоретске покретљивости тј. EMSA (заједно са протоколом за радиоактивно обележавање проба), као и метода за изоловање једарних протеина из ћелијских линија.

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ** кандидаткиња је изложила резултате спроведеног истраживања у два дела. Резултати су приказани и кроз слике и табеле које уз одговарајуће коментаре и објашњења описују и допуњују добијене резултате. У првом делу, који се односи на молекуларно-генетичку карактеризацију пацијената, приказана је генетичка основа 29 клинички суспектних „MODY“ пацијената. Утврђено је присуство 20 различитих варијанти у 4 гена (*GCK*, *HNF1B*, *HNF1A* и *NEUROD1*) код 22 пацијента (75,9%). Резултати су показали да су варијанте у *GCK* гену биле главни узрок настанка „MODY“ дијабетеса, присутне код 50% (11/22) пацијената. Варијанте у преосталим генима *HNF1B*, *HNF1A* и *NEUROD1* пронађене су редом код 22,7% (5/22), 9,1% (2/22) и 18,2% (4/22) пацијената. У оквиру ове студије идентификована је једна нова варијанта у гену *GCK* (p.Val199Ala), за коју је показано да до сада није била пријављена у доступној

литератури, као ни у различитим базама података. Приказани су резултати више *in silico* предикција који су недвосмислено указали на патогеност ове варијанте.

У другом делу РЕЗУЛТАТА прво су представљени резултати анализе (секвенцирања) промотрског региона 4 „MODY“ гена *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A* и *HNF1B*. Варијанте су детектоване у два гена, и то пет варијанти у *GCK* гену и једна варијанта у *HNF1A* гену, док у генима *HNF4A* и *HNF1B* нису детектоване промене. У наставку су функционално окарактерисане две одабране детектоване варијанте. Једну је чинио сет од три нуклеотидне замене у *GCK* гену (-282C>T, -194A>G, 402C>G) који као такав није био раније познат нити описан у литератури, а друга варијанта је била инсерција седам нуклеотида у промотру гена *HNF1A* (с.-154-160insTGGGGGT), о којој су постојали опречни подаци о патогености варијанте, а при томе није била урађена функционална анализа варијанте. Резултати функционалне анализе за *GCK* варијанти сет (-282C>T, -194A>G, 402C>G) показали су тренд смањења експресије репортерског конструкта са варијантним сетом у односу на репортерски конструкт који садржи *wild-type* секвенцу. Овај резултат сагледан у контексту резултата асоцијенције варијантног сета са нивоом глукозе код *GCK-MODY* пацијената, указује да варијантни сет потенцијално представља модификатор нивоа глукозе у крви, делујући тако што повећава ниво глукозе код *GCK-MODY* пацијанта. За другу анализирану варијанту (с.-154-160insTGGGGGT), у промотру гена *HNF1A*, резултати функционалне анализе, који показују смањење експресије репортерског гена у присуству варијанте, а у контексту клиничке слике пацијената (носиоца варијанте), су указали на потенцијално патогени ефекат варијанте, због чега би могла да буде асоцирана са дијабетесом код пацијента.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** резултати добијени у овој студији критички су дискутовани у светлу податка из литературе везаних за генетичку основу „MODY“ дијабетеса. Поглавље Дискусија је организовано у два главна дела. У првом делу поглавља сагледане су варијанте детектоване код пацијената, као и клиничке карактеристике носиоца тих варијанти, и продискутоване су у односу на познате информације из литературе. У другом делу поглавља Дискусија, продискутовани су резултати добијени анализом промоторских региона 4 „MODY“ гена (*GCK*, *HNF1A*, *HNF4A* и *HNF1B*). Добијени резултати су упоређени са сличним истраживањима и изнета су оригинална разматрања поткрепљена постојећим подацима из литературе. На основу резултата добијених у овој студији, а у контексту података из литературе и клиничких карактеристика пацијената, изведени су закључци о потенцијалном ефекту анализираних варијанти на експресију датих гена и њиховом доприносу фенотипу пацијената или настанку болести, као и ограничења ове студије (мали број пацијената).

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ**, јасно је изнето 15 закључака који у потпуности произилазе из добијених резултата.

У поглављу **БИБЛИОГРАФИЈА**, наведен је списак од 189 цитираних научних часописа и књига. Коришћена литература је адекватна, актуелна и довољно широка да

покрива све аспекте истраживања. Навођење литературе у самом тексту дисертације је примерено и по садржају и по месту.

## Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

### Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Komazec J, Zdravkovic V, Sajic S, Jesic M, Andjelkovic M, Pavlovic S, Ugrin M. The importance of combined NGS and MLPA genetic tests for differential diagnosis of maturity onset diabetes of the young. *Endokrynol Pol.* 2019;70:28-36. doi:10.5603/EP.a2018.0064 **(M23) (IF 1.521/2018)**  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30259503/>
2. Komazec J, Ristivojevic B, Zdravkovic V, Karan-Djurasevic T, Pavlovic S, Ugrin M. Analysis of the promoter regions of disease-causing genes in Maturity-onset diabetes of the young patients. *Mol Biol Rep.* 2020 Aug 28. doi: 10.1007/s11033-020-05734-7. **(M23) (IF 2.107/2018)**  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32860162/>

### Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Ugrin M, **Komazec J**, Zdravkovic J, Sajic S, Jesic M Andjelkovic M, Pavlovic S. Maturity onset diabetes of the young (MODY) - the importance of combined NGS and MLPA genetic testing. VI Congress of the Serbian genetic society, 13-17 October 2019, Vrnjacka Banja, Serbia. Abstract book: p 41. **(M34)**
2. **Komazec J**, Ugrin M, Anđelković M, Zukić B, Zdravković V, Sajić S, Pavlović S. Molecular characterization of maturity-onset diabetes of the young in Serbian pediatric patients. 1st Congress of Molecular Biologists of Serbia (CoMBoS), 20-22 September 2017, Belgrade, Serbia. Abstract book: p 143. **(M34)**

### Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

## Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидаткиње Јоване Д. Комазец послата је софтверску проверу оригиналности, а резултате провере ментор је добио 10.9.2020. Извештај провере оригиналности докторске дисертације указао је на индекс сличности од 23% што је највећим делом последица навођења описа и протокола коришћених метода у студији који су наведени према упутству произвођача или инструкцијама из лабораторијског

приручника праћени одговарајућом референцом, као и подударности библиографских података о коришћеној литератури. У поглављима ”Увод”, ”Циљеви”, ”Резултати”, ”Дискусија” и ”Закључци”, сличност је минимална и последица је навођења општих појмова као што су називи гена и протеина или општих делова реченица који као такви нису повезани и немају смислено значење.

Увидом у извештај закључено је да је докторска дисертација оригинално дело кандидата.

## Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација кандидаткиње Јоване Д. Комазец, под насловом „Варијанте кодирајућих и некодирајућих региона гена узрочника дијабетеса адултног типа код младих као модулатори фенотипа и регулатори генске експресије“ представља оригинално истраживање које за тему има проучавање генетичке основе дијабетеса адултног типа код младих („MODY“ дијабетес), откривање нових варијанти у генима узрочницима као и функционалну карактеризацију одабраних детектованих варијанти. Теза се одликује јасно дефинисаним циљевима и адекватно планираним и успешно реализованим истраживачким поступком. Остварени резултати објављени су у оквиру два оригинална научна рада, што потврђује актуелност и значајност добијених резултата. Такође, текст дисертације је прошао проверу оригиналности.

На основу увида у експериментални рад, постигнуте резултате, као и написану докторску тезу, Комисија закључује да су задаци постављени у циљевима испуњени, тако да позитивно оцењује докторску тезу и има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета, Универзитета у Београду, да прихвати позитивну оцену докторске дисертације Јоване Д. Комазец и омогући кандидаткињи јавну одбрану рада.

У Београду, 23. 10. 2020. године

### КОМИСИЈА:

---

др Милена Угрин, виши научни сарадник,  
Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство,  
Универзитет у Београду, ментор

---

др Соња Павловић, научни саветник  
Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство,  
Универзитет у Београду, ментор

---

др Светлана Радовић, редовни професор,  
Биолошки факултет, Универзитет у Београду, члан

---

др Михаило Јелић, доцент,  
Биолошки факултет, Универзитет у Београду, члан

---

др Вера Здравковић, доцент,  
Медицински факултет, Универзитет у Београду, члан