

+

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

На V редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 10.03.2017. године, прихваћен је извештај ментора др Валентине Ђорђевић и др Драгице Радојковић о урађеној докторској дисертацији **Маје Ж. Гвозденов**, истраживача сарадника у Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду, под насловом „**Функционална анализа генских варијанти F11c.1787G>A (протромбин Београд) и F11c.\*64\_\*66del и њихова повезаност са тромбофилијом**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу др Валентина Ђорђевић, виши научни сарадник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, др Душанка Савић-Павићевић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Драгица Радојковић, научни саветник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду. Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и на основу анализе приложене докторске дисертације Већу подноси следећи:

**ИЗВЕШТАЈ**

**1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ**

Докторска дисертација **Маје Ж. Гвозденов** под насловом „**Функционална анализа генских варијанти F11c.1787G>A (протромбин Београд) и F11c.\*64\_\*66del и њихова повезаност са тромбофилијом**“, написана је на 139 стране, у оквиру којих се налази 10 табела и 32 слике. У докторској дисертацији је цитирано 265 извора литературе. 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, Списак скраћеница, Садржај, Текст по поглављима и Прилоге. Текст дисертације садржи следећа поглавља: **Увод** (1-26 страна), **Циљ рада** (27-28 страна), **Материјал и методе** (29-63 страна), **Резултати** (64-93 страна), **Дискусија** (94-119 страна), **Закључци** (120-122 страна) и **Литература** (123-139 страна). У оквиру Прилога се налазе: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу.

**2. АНАЛИЗА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Поглавље **Увод** садржи два потпоглавља и у њему је дат сажет приказ досадашњих сазнања из литературе која су непосредно везана за предмет докторске дисертације. Описане су карактеристике гена за протромбин, структурна организација протромбина, као и његово превођење у активну форму-тромбин. Детаљно је описана прокоагулантна и

антикоагулантна функција протромбина и његова улога у регулацији процеса хемостазе, коју овај протеин остварује кроз бројне интеракције са различитим протеинима. Прегледно су представљени постојећи подаци о поремећајима функције или расположивог нивоа протромбина, који су повезани са појавом хипо- или хиперкоагулације, а посебна целина је посвећена улози протромбина у патогенези тромбофилије. У другом поглављу, истакнута је специфична неканонска организација 3' краја гена за протромбин и представљени су елементи у овом региону који су укључени у регулацију генске експресије. Такође, су описане најзначајније, до сада идентификоване, генске варијанте у 3' крају гена за протромбин и механизми њиховог деловања.

Анализа недавно описаних FIIc.1787G>A (протромбин Београд) и FIIc.\*64\_\*66del варијанти у 3' крају гена за протромбин, расветљавање њихових механизма деловања и улоге у патогенези тромбофилије су били предмет изучавања ове докторске дисертације. У складу са тим, у поглављу **Циљеви рада** јасно су дефинисана четири главна научна циља:

- да се одреде учесталости генских варијанти FIIc.1787G>A и FIIc.\*64\_\*66del код пацијената са тромбофилијом и у одговарајућој контролној групи здравих испитаника у српској популацији.

- да се одреди утицај FIIc.1787G>A и FIIc.\*64\_\*66del варијанти на расположиви ниво и функцију протромбина *ex vivo*.

- да се *in vitro* испитају механизми FIIc.1787G>A и FIIc.\*64\_\*66del варијанти кроз одређивање њиховог утицаја на профил експресије протромбина.

- да се испита значај FIIc.1787G>A и FIIc.\*64\_\*66del варијанти као потенцијалних маркера тромбофилије.

Поглавље **Материјал и методе** је организовано у три целине, написано прегледно, и садржи све информације неопходне за репродуковање експерименталних процедура. Описане су карактеристике испитаника укључених у истраживање и дат је преглед биолошког материјала, ћелијских линија, бактеријских сојева, плазмидних вектора, антитела, олигонуклеотида и компјутерских програма коришћених у раду. У првој целини су описане методе коришћене за детекцију FIIc.1787G>A и FIIc.\*64\_\*66del варијанти (изолација ДНК, *PCR-RFLP*, секвенцирање) и статистичку обраду података. Методе за *ex vivo* анализу испитиваних варијанти на узорцима плазме испитаника обухватиле су: тест активности протромбина, одређивање количине протромбина методом релативне квантификације резултата *Western blot* анализе, тест генерације тромбина, тест резистенције на антитромбин и тест резистенције на тромбомодулин. У оквиру *in vitro* анализа описане су методе које су коришћене у раду са бактеријама (култивација бактерија, *in situ PCR* диригована мутагенеза, трансформација компетентних бактеријских ћелија, изолација циљне плазмидне ДНК) и са перманентним ћелијским линијама (култивација ћелија и транзијентна трансфекција ћелија у култури). Утицај испитиваних варијанти на експресију гена за протромбин је праћена на нивоу РНК методом квантитативног *PCR*-а у реалном времену, а на нивоу протеина квантификацијом резултата *Western blot* анализе. Детаљно су описане коришћене *in silico* анализе, као и

метода за испитивање протеин/ДНК интеракције (*FP-PCR*). Врло детаљно је описан принцип и експериментални поступак методе за испитивање везивање малих РНК за регион од интереса, која је први пут коришћена у оквиру ове докторске дисертације, а базира се на модификованој *FP-PCR* методи.

У поглављу **Резултати** изложени су добијени резултати груписани у три целине и прегледно документовани сликама и табелама. У првом делу су приказани резултати асоцијативне студије FIIc.1787G>A и FIIc.\*64\_\*66del варијанти. Показано је да су обе варијанте веома ретке у испитиваним групама пацијената, док у контролној групи носиоци нису детектовани. Поред мале учесталости, статистички значајно повећана учесталост детектована је за FIIc.1787G>A варијанту код пацијената са комбинованим тромботичким поремећајима. Друга целина је обухватила резултате *ex vivo* анализа у узорцима плазме испитаника, које су примењене с циљем да се одреди утицај испитиваних варијанти на функцију и расположиви ниво протромбина у плазми. Добијени резултати су показали да носилаци FIIc.1787G>A варијанте, у односу на неносиоце, имају смањену протромбинску активност, без промене у нивоу протромбина, повећани ендогени потенцијал тромбина, резистенцију на антитромбин и тромбомодулин. Са друге стране, резултати за FIIc.\*64\_\*66del варијанту су показали да присуство ове варијанте нема значајан утицај на испитиване параметре. У трећој целини су приказани резултати *in vitro* анализа FIIc.1787G>A и FIIc.\*64\_\*66del варијанти. На моделу транзијентно трансфековане ћелијске линије Cos-7 показано је да FIIc.1787G>A варијанта не утиче на експресију гена за протромбин, док је FIIc.\*64\_\*66del варијанта доводи до смањеног нивоа експресије на нивоу иРНК и протеинског продукта. Такође, утврђено је да је низводни регулаторни елемент (ДСЕ) у оквиру 3' краја гена за протромбин укључен у механизам којим FIIc.\*64\_\*66del варијанта утиче на експресију гена за протромбин. *In silico* предикција је указала на постојање места везивања за Sam68 протеин и hsa-miR-2052 у региону FIIc.\*64\_\*66del варијанте, што је даље испитивано у *in vitro* анализама. Применом *FP-PCR* методе није детектовано везивање протеина изолованих из HepG2 ћелијске линије за регион у коме се налази FIIc.\*64\_\*66del варијанта. Модификацијом ове методе одређивано је потенцијално везивање малих РНК за овај фрагмент. Показано је да долази до везивања неке од малих РНК изолованих из HepG2 ћелијске линије за регион FIIc.\*64\_\*66del варијанте, као и да се добијено место везивања преклапа са секвенцом која је добијена *in silico* предикцијом за hsa-miR-2052.

У поглављу **Дискусија** дата је упоредна анализа оригиналних резултата ове докторске дисертације и података из литературе. Дискусија је добро структурирана и састоји се из четири целине. У оквиру прве три дискутовани су резултати асоцијативне студије, *ex vivo* и *in vitro* анализа, док су у оквиру четврте целине дискутоване смернице за даље функционалне анализе FIIc.1787G>A и FIIc.\*64\_\*66del варијанти. Кандидаткиња добро познаје област и детаљно је упозната са релевантном литературом. Добијени резултати су критички анализирани и интерпретирани у светлу досадашњих сазнања, и јасно је сагледан њихов значај. Истакнуто је да FIIc.1787G>A (протромбин Београд) варијанта има веома сложен протромбогени механизам и представља значајни тромбофилни маркер за пацијенте који имају изражену склоност ка тромботичким

поремећајима. Посебно је дискутована и хипотеза о потенцијалној улози микро РНК у регулацији експресије гена за протромбин, проистекла из резултата *in silico* предикције и експерименталних резултата који указују на постојање места везивања малих РНК у региону FIIc.\*64\_\*66del варијанте. У последњем одељку овог поглавља кандидаткиња је дала смернице за даље функционалне анализе како би се у потпуности расветлили механизми испитиваних варијанти.

У поглављу **Закључци**, сажето и јасно су изнети најважнији закључци до којих је кандидаткиња дошла анализирањем добијених експерименталних резултата. Добијени резултати су сумирани у укупно девет закључака:

1. У групи пацијената са тромбофилијом и у групи здравих испитаника одређене су учесталости FIIc.1787G>A и FIIc.\*64\_\*66del варијанти у српској популацији:
  - У групи здравих испитаника FIIc.1787G>A и FIIc.\*64\_\*66del варијанте нису детектоване.
  - Учесталост FIIc.1787G>A варијанте у целокупној групи пацијената износи 0,57%; у групи пацијената са комбинованим тромботичким поремећајима 4,08%, док у осталим групама носиоци нису детектовани.
  - Учесталост FIIc.\*64\_\*66del варијанте у целокупној групи пацијената износи 1,13%; у групи пацијената са изолованим плућним емболизмом 0,96%, у групи пацијенткиња са спонтаним побачајима 2,83%, док у осталим групама нису детектовани носиоци ове варијанте.
  - Повећана учесталост FIIc.1787G>A и FIIc.\*64\_\*66del варијанти је детектована код пацијената у односу на контролну групу, али је то повећање статистички значајно само за FIIc.1787G>A варијанту у групи пацијената са комбинованим тромботичким поремећајима ( $P=0,03$ )
2. *Ex vivo* анализе су показале да FIIc.1787G>A варијанта има комплексни протромбогени механизам. У плазми носилаца ове варијанте, у односу на неносиоце, детектовано је статистички значајно ( $P<0,001$ ):
  - смањење протромбинске активности, без утицаја на ниво протромбина
  - повећање ендогеног потенцијала тромбина
  - смањење инактивације тромбина- резистенција на антиромбин
  - смањење интеракције са тромбомодулином- резистенција на тромбомодулин
3. *Ex vivo* анализе у плазми испитаника су показале да FIIc.\*64\_\*66del варијанта нема изражени протромбогени механизам, јер не утиче на промене у активности и нивоу протромбина и доводи до благо повећаног ендогеног потенцијала у односу на неносице ове варијанте.
4. *In vitro* анализама на систему транзијентно трансфектованих Cos-7 ћелија показано је да FIIc.1787G>A варијанта не доводи до промене у експресији гена за протромбин.

5. *In vitro* анализама на систему транзијентно трансфековане Cos-7 перманентне ћелијске линије је показано да FIIc.\*64\_\*66del варијанта утиче на статистички значајно смањење експресије гена за протромбин на нивоу иРНК (P=0,001) и протеина (P=0,028).
6. Присуство низводног регулаторног елемента (ДСЕ) модулише ефекат FIIc.\*64\_\*66del варијанте и доприноси додатном смањењу експресије протромбина на нивоу иРНК.
7. У овој студији је по први пут примењена модификована *FP-PCR* метода, за испитивање везивања малих РНК за једноланчани олигонуклеотид. Показано је да у региону FIIc.\*64\_\*66del варијанте постоји место везивања мале РНК које се преклапа са предикованим местом везивања за hsa-mir-2052.
8. FIIc.1787G>A варијанта представља значајни тромбофилни маркер, док FIIc.\*64\_\*66del варијанта не представља маркер тромбофилије.
9. FIIc.1787G>A варијанту треба укључити у панел тромбофилних тестова код пацијената који имају изражену склоност ка тромбозама, упркос смањеној прокоагулантној активности протромбина.

У поглављу **Литература** дата је листа од 265 библиографских јединица. Списак литературе је адекватан, актуелан и довољно широк да покрива све аспекте истраживања и дискусије резултата. Навођења литературе у самом тексту дисертације су јасна и примерена, како по садржају тако и по месту. На крају поглавља литератива дат је преглед коришћених електронских база и *online* програма.

### 3. БИБЛИОГРАФИЈА

#### Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

##### Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **M23 - Gvozdenov M**, Pruner I, Tomic B, Aradjanski M, Antonijevic N, Radojkovic D, Djordjevic V. (2015). Prothrombin 3'end gene variants in isolated pulmonary embolism--the first report of FIIc.\*64\_\*66del and FIIc.\*303T>C variants. *Acta Cardiol*, 70(2):177-182.
2. **M23 - Gvozdenov M**, Pruner I, Tomic B, Kovac M, Radojkovic D, Djordjevic V. (2017). The effect of FIIc.1787G>A (prothrombin Belgrade) mutation on prothrombin gene expression *in vitro*. *Mol Biol*, 51(1):49-52.
3. **M21a - Miljic P, Gvozdenov M**, Takagi Y, Takagi A, Pruner I, Dragojevic M, Tomic B, Bodrozic J, Kojima T, Radojkovic D, Djordjevic V. (2017). Clinical and biochemical characterization of the Prothrombin Belgrade mutation in a large Serbian pedigree: new insights into antithrombin resistance mechanism. *J Thromb Haemost*, doi:

10.1111/jth.13618.

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **M34 - Gvozdenov M**, Pruner I, Tomic B, Radojkovic D, Kovac M, Miljic P, Takagi A, Takagi Y, Kojima T, Djordjevic V. The FII c.1787G>A variant (prothrombin Belgrade)-The first case of antithrombin resistance in a Caucasian population. 11th Balkan Congress of Human Genetics, Belgrade, Serbia, September 17-20, 2015, Abstract book, p.52.
2. **M34 - Gvozdenov M**, Pruner I, Tomic B, Kovac M, Radojkovic D, Djordjevic V. In vitro analysis of FII c.1787G>A (prothrombin Belgrade) mutation effect on prothrombin gene expression. 1st European Congress on Thrombosis and Haemostasis (ECTH), Hague, the Netherlands, September 28-30, 2016, Abstract book, p.215.

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **M64 - Gvozdenov M**, Djordjevic V, Pruner I, Tomic B, Aradjanski M, Kovac M, Radojkovic D. Screening of 3'end of FII gene in patients with isolated pulmonary embolism and first report of FII c.\*64\_66del gene variant. V Congress of the Serbian Genetic Society, Beograd, Srbija, 28. septembar-02. oktobar, 2014, Zbornik apstrakata, strana 66.

#### 4. МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Докторска дисертација кандидаткиње **Маје Ж. Гвозденов**, под насловом „**Функционална анализа генских варијанти FIIc.1787G>A (протромбин Београд) и FIIc.\*64\_66del и њихова повезаност са тромбофилијом**“ представља оригиналан научни рад са јасно дефинисаним циљевима заснованим на добром познавању научне проблематике и са адекватно планираним и успешно реализованим експериментима, уз поштовање етичких и научних норми. Добијени резултати представљају прве податке о учесталости и комплексним механизмима FIIc.1787G>A и FIIc.\*64\_66del варијанти. FIIc.1787G>A (протромбин Београд) је једна, од укупно три описане варијанте, чији механизам укључује резистенцију на антитромбин. Како је реч о новом и још увек недовољно истраженом тромбофилном механизму, резултати функционалних анализа у оквиру ове тезе представљају значајан допринос у његовом расветљавању. Поред доприноса у сфери фундаменталног истраживања, резултати ове докторске дисертације имају и значајан потенцијал за примену у медицини. FIIc.1787G>A варијанта представља редак, али значајан генетички маркер тромбофилије, и треба га уврстити у дијагностички панел тестова.

Маја Ж. Гвозденов је кроз рад на докторској дисертацији показала зрелост, истрајност и висок степен самосталности који треба да красе сваког успешног кандидата

за стицање звања доктора наука. Део резултата ове дисертације је публикован у три оригинална рада (од којих је један из M21a категорије) и представљен на две међународне и једној националној конференцији.

На основу увида у експериментални рад, постигнуте резултате као и написану докторску тезу, закључујемо да су задаци постављени у циљевима испуњени у потпуности и са задовољством предложемо Наставно-научном већу Биолошког факултета, Универзитета у Београду, да прихвати позитивну оцену докторске дисертације **Маје Ж. Гвозденов**, под насловом „**Функционална анализа генских варијанти F1с.1787G>А (протромбин Београд) и F1с.\*64\_\*66del и њихова повезаност са тромбофилијом**“ и омогући кандидаткињи јавну одбрану рада.

У Београду, 10. 03. 2017. године.

**КОМИСИЈА:**

---

др Валентина Ђорђевић, виши научни сарадник  
Института за молекуларну генетику  
и генетичко инжењерство Универзитета у Београду

---

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

---

др Драгица Радојковић, научни саветник  
и генетичко Института за молекуларну генетику  
инжењерство Универзитета у Београду