

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На I редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 12.10.2018. године, прихваћен је извештај ментора проф. Душанке Савић-Павићевић о урађеној докторској дисертацији **Милоша Ђ. Бркушанина**, истраживача сарадника на Универзитету у Београду-Биолошком факултету, под насловом „**Структура сегменталне дупликације 5q13.2 као модификатор фенотипа спиналне мишићне атрофије и амиотрофичне латералне склерозе**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу др Душанка Савић-Павићевић, редовни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет, др Горан Брајушковић, ванредни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет, др Ведрана Милић-Рашић, редовни професор, Универзитет у Београду-Медицински факултет и др Зорица Стевић, редовни професор, Универзитет у Београду-Медицински факултет.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата/кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Милоша Ђ. Бркушанина** под насловом „**Структура сегменталне дупликације 5q13.2 као модификатор фенотипа спиналне мишићне атрофије и амиотрофичне латералне склерозе**“ написана је на 156 страна (проред 1,5), у оквиру којих се налази 25 слика и 11 табела. У докторској дисертацији је цитиран 141 извор литературе. Докторска дисертација садржи: Насловну страну на српском и енглеском језику, Информације о ментору и члановима комисије за одбрану докторске дисертације, Захвалницу, Резиме докторске дисертације на српском и енглеском језику са кључним речима, Листа скраћеница, Садржај, Текст по поглављима, Литературу и Прилоге. Текст дисертације садржи следећа поглавља: **Увод** (стр. 1-15), **Циљеве рада** (стр. 16), **Материјал и методе** (стр. 17-46), **Резултати** (стр. 47-79), **Дискусија** (стр. 80-93), **Закључци** (стр. 94), **Литература** (стр. 95-107) и **Прилози** (стр. 108-151). Поред наведеног докторска дисертација садржи Биографију аутора (стр. 152) и непагиниране делове који обухватају: Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјаву о коришћењу.

Анализа докторске дисертације:

У својој докторској дисертацији **Милош Ђ. Бркушанин** изучава геномску структуру, типове реаранжмана и епигенетичке ознаке сегменталне дупликације 5q13.2 као модификатора фенотипа болести моторног неурона, и то дечије спиналне мишићне атрофије (СМА) и спорадичне форме амиотрофичне латералне склерозе (САЛС).

Увод докторске дисертације садржи три потпоглавља. У њему су сажето приказани литературни подаци који су представљали полазиште за дефинисање предмета изучавања ове докторске дисертације. У првом потпоглављу кандидат дефинише сегменталне дупликације и даје карактеристике сегменталне дупликације 5q13.2 - велики број гена који се одликују варијацијама у броју копија, сложена структура, чести генетички реаранжмани. Истиче да варијације у броју копија гена садржаних у овој сегменталној дупликацији чине основу и потенцијалне факторе ризика за болести моторног неурона изучаваних у овој докторској дисертацији. У другом потпоглављу кандидат описује клиничке и генетичке карактеристике СМА, болести која је најчешћи моногенски узрочник смртности деце и узрокована је хомозиготним одсуством гена *SMN1* у теломерном делу сегменталне дупликације 5q13.2. У њеном центромерном делу налази готово истоветан ген *SMN2* који даје ~10% функционалног протеина SMN и сматра се генетичким модификатором болести. Описана је варијабилна клиничка презентација СМА у погледу времена појаве симптома, њихове тежине, постигнутих моторних вештина и дужине живота. Такође, описана је подела дечије форме СМА на типове I, II и III у складу са претходно наведеним критеријумима. Од посебног интереса за полазиште ове тезе је да хомогеност узрочне мутације и изражена фенотипска хетерогеност указују на постојање генетичких, епигенетичких и срединских фактора који модификују фенотип СМА, што кандидат детаљно образлаже. Укратко, висока стопа неједнаких хромозомских реаранжмана у сегменталној дупликацији 5q13.2 доводи до варијација у броју копија и структурних промена не само гена *SMN*, већ и других присутних гена, попут *SERF1* и *NAIP*, који би могли утицати на ток и тежину болести. Додатно, кандидат наводи да све копије гена *SMN2* нису функционално једнаке, и да је један од узрока различит степен метилације промотора овог гена. Треће потпоглавље се односи на АЛС која представља адултну, неизлечиву болест са врло прогресивним током, и непознатом генетичком основом када је у питању спорадична форма ове болести. Кандидат наводи да је велика пажња међу генима кандидатима за настанак и прогресију САЛС усмерена на гене *SMN*, истичући да је она последица сличности патолошких промена и учешћа протеина SMN и протеина асоцираних са фамилијарном формом АЛС у заједничким молекуларним путевима упркос разликама у времену појаве симптома и тока СМА и САЛС, што је такође било од значаја за полазиште ове докторске тезе. Поред тога, у овом потпоглављу описани су клинички фактори за процену тежине презентације и времена преживљавања САЛС болесника, што је у складу са једним од циљева тезе да се клинички показатељи допуне генетичким факторима како би се ток болести, посебно преживљавање САЛС болесника, могао веродостојније предвидети.

У складу са описаним полазиштима тезе, у поглављу **Циљеви** дефинисано је шест специфичних циљева ове докторске дисертације:

1. Описати хромозомске реаранжмане и реконструисати структуру теломерног дела сегменталне дупликације 5q13.2 код болесника са спиналном мишићном атрофијом типа I, II и III и родитеља болесника из популације Србије.
2. Испитати корелацију броја копија гена *SMN2*, *SERF1* и *NAIP* са типом спиналне мишићне атрофије.
3. Испитати удружени ефекат броја копија гена *SMN2*, *SERF1* и *NAIP* на фенотипску варијабилност спиналне мишићне атрофије.
4. Испитати степен и образац метилације промоторског региона гена *SMN2* око првог места почетка транскрипције код болесника са спиналном мишићном атрофијом из Србије и могућа ограничења у методолошким приступима.
5. Испитати асоцијацију броја копија гена *SMN1*, *SMN2*, *SERF1* и *NAIP* са ризиком за појаву спорадичног облика амиотрофичне латералне склерозе код болесника из Србије.

6. Испитати удружени ефекат испитиваних генетичких, демографских и клиничких фактора на време преживљавања болесника са спорадичним обликом амиотрофичне латералне склерозе из Србије.

Поглавље **Материјал и методе** организовано је у четири потпоглавља. У првом потпоглављу дат је детаљан опис испитаника. Група СМА болесника обухватила је 99 болесника који су испуњавали клиничке критеријуме за дијагнозу СМА и код којих је молекуларно-генетичким анализама потврђено хомозиготно одсуство егзона 7 гена *SMN1*. Основни критеријум за сврставање болесника у одговарајући тип болести била је њихова способност/немогућност да самостално седе/ходају. На овај начин 23 болесника су сврстана у тип I (нису имали способност самосталног седења), 37 у тип II (имали способност самосталног седења, али не и ходања) и 39 у тип III (имали способност самосталног ходања коју су касније изгубили). Студија је обухватила и 122 родитеља СМА болесника који су дали сагласност за учешће у истраживању. Група АЛС болесника обухватила је 154 болесника који су испунили ревидиране El Escorial критеријуме дате од стране Светске федерације неуролога за постављање дијагнозе АЛС. У сврху израде ове докторске тезе сачињен је локални регистар АЛС болесника који је садржао седеће податке: социодемографске (пол, датум рођења), старост на почетку болести, симптоми на почетку болести (спинални, булбарни, респираторни), место почетка болести за болеснике са спиналним почетком (руке/ноге/руке и ноге), тип мотонеурона захваћеног болешћу (горњи/доњи/горњи и доњи), дијагностичко кашњење у месецима (дефинисано као број месеци протеклих између почетка болести и постављања дијагнозе), значајни коморбидитети, El Escorial категорија у тренутку дијагнозе (сигурна АЛС/вероватна АЛС/могућа АЛС), збир ревидиране скале функционалне процене (ALSFRS-R) и процењен форсирани витални капацитет плућа (FVC) у процентима у два временским тачкама (тренутку дијагнозе t_1 и тренутку узимања узорка крви t_2), збир мале скале за процену менталног статуса у тренутку узимања узорка крви (MMSE), терапија леком Рилутек® (са активном супстанцом рилузол) и старост у случају евентуалног смртог исхода болесника. Друго и треће поглавље садржи описане молекуларно-генетичке методе са свим информацијама неопходним за репродуковање експерименталних процедура. За одређивање броја копија гена сегменталне дупликације 5q13.2 коришћена је метода умножавања већег броја лигираних проба (МЛПА), док су за испитивање степена и образаца метилације промоторског региона гена *SMN2* коришћене методе анализе кривих топљења високе резолуције и молекуларно клонирање праћено Сангеровим секвенцирањем. У четвртом потпоглављу описана је статистичка обрада резултата коришћењем Спирмановог теста корелације, генерализованих линераних модела са селекцијом уназад, Фишеровог егзактног теста, Каплан-Мајерове методе за процену вероватноће преживљавања и униваријабилне и мултиваријабилне Коксове регресионе анализе.

Поглавље **Резултати** организовано је у два потпоглавља и детаљно су наведени резултати истраживања уз одговарајуће табеларне и илустративне приказе. Прво се односи на резултате испитивања сегменталне дупликације 5q13.2 у групи СМА болесника и њихових родитеља. Анализом 442 хромозома идентификовано је 20 различитих алела теломерног дела сегменталне дупликације 5q13.2, што је указало на изузетно високу инхерентну нестабилност испитиваног региона генома човека. Делеције у теломерном делу региона 5q13.2 биле су карактеристичне претежно за болеснике са СМА типом I, док је генска конверзија гена *SMN1* у *SMN2* углавном особина болесника са СМА типовима II и III. Између броја копија гена *SMN2*, *SERF1* и *NAIP* и типа дечије СМА уочена је обрнуто сразмерна корелација (Спирманов тест корелације, *SMN2* $p=2,2e-16$, *SERF1* $p=4,264e-10$,

NAIP $p=2,722e-8$), што је указало на то да број копија ових гена утиче на фенотипску варијабилност дечије СМА. Генерализованим линеарним моделом и селекцијом уназад, почевши од пуног модела који је обухватио број копија *SMN2*, *SERF1* и *NAIP* и њихове двоструке интеракције, добијен је најбољи минимални модел који објашњава фенотипску варијабилност дечије СМА и обухвата број копија *SMN2* ($p<2e-16$) и *SERF1* ($p<2e-16$) и њихов удружени ефекат ($p=0,026$). Испитивање степена метилације дела промотора гена *SMN2* код болесника са СМА типовима I, II и III применом методе анализе кривих топљења високе резолуције указало је на његову хетерогену метилацију, што је потврђено молекуларним клонирањем и Сангеровим секвенцирањем. Због постојања великог броја различитих епалела метода анализе кривих топљења високе резолуције показала се као неадекватна. Друго потпоглавље се односи на резултате испитивања сегменталне дупликације 5q13.2 у групи САЛС болесника. У испитиваној групи од 153 САЛС болесника није показана статистички значајна асоцијација између ризика за појаву болести и броја копија гена *SMN1* ($p=0,650$, Фишеров егзактни тест), *SMN2* ($p=0,369$), *SERF1* ($p=0,257$) и *NAIP* ($p=0,908$). Криве преживљавања засноване на резултатима мултиваријабилне Коксове регресионе анализе показале су да три копије гена *SMN1* (HR=10.276, 95% CI 3.106-33.998), нижи збир ALSFRS-R у тренутку дијагнозе (HR=0.885, 95% IP 0.834-0.938), бржи пад функционалности (Δ ALSFRS-R) (HR=2.193, 95% IP 1.618-2.972) и краће дијагностичко кашњење (HR=0.939, 95% IP 0.888-0.994) резултују краћим преживљавањем САЛС болесника из Србије. Добијени резултат је указао на то да већи број копија гена *SMN1* представља негативан прогностички фактор преживљавања САЛС болесника. Број копија гена *SMN1* је објективно мерљив и временски непроменљив параметар, те заједно са клиничким параметрима може унапредити алгоритме за предвиђање тока болести и омогућити ефикасније терапеутске приступе код САЛС.

У поглављу **Дискусија** кандидат даје упоредну анализу оригиналних резултата ове докторске тезе и података из литературе. Такође, кандидат дискутује и ограничења свог истраживања. Посебну пажњу кандидат посвећује могућем клиничком значају резултата и истиче неопходност расветљавања генетичких модификатора болести моторног неурона у циљу изналажења поузданих алгоритама за предвиђање тока болести и дизајнирања ефикаснијих клиничких студија за генетички дизајниране терапије које су одобрене за СМА, као и за велики број лекова ограниченог терапеутског потенцијала код АЛС за које су клинички студије биле неуспешне.

У поглављу **Закључак** кандидат прецизно и јасно износи најзначајније закључке ове докторске дисертације:

1. Идентификација двадесет алела међу 442 хромозома различитих према захваћености гена *SERF1A* и *NAIP* и броју њихових копија, као и према типу хромозомског реаранжмана (делеција или генска конверзија), указали су на изузетну нестабилност теломерног дела региона 5q13.2.
2. Физички већи структурни реаранжмани теломерног дела региона 5q13.2 и хомозиготна делеција гена *SMN1*, *SERF1A* и *NAIP* присутни су код болесника са СМА типом I, док болесници са СМА типовима II и III имају физички мање структурне реаранжмане, најмање једну копију гена *SERF1A* и *NAIP* и генску конверзију *SMN1* у *SMN2*.
3. Број копија гена *SMN2*, *SERF1* и *NAIP* је статистички значајно обрнуто сразмеран типу дечије спиналне мишићне атрофије.
4. Минимални генерализовани линеарни модел указао је на то да број копија гена *SMN2* и *SERF1*, као и њихов удружени ефекат, најбоље објашњавају фенотипску варијабилност дечије спиналне мишићне атрофије.

5. Код појединачних болесника са СМА типом I, II и III острвце CG2 промоторског региона гена *SMN2* одликује се метилацијом изузетно високе хетерогености.
6. Метода анализе кривих топљења високе резолуције није погодна метода за анализу метилације острвцета CG2 промоторског региона гена *SMN2* услед уочене хетерогене метилације.
7. У анализираној групи САЛС болесника из популације Србије није показана статистички значајна асоцијација између броја копија гена *SMN1*, *SMN2*, *SERF1* и *NAIP* и ризика за појаву болести.
8. Нижи збир скале ALSFRS-R у тренутку дијагнозе болести, бржи пад функционалности (Δ ALSFRS) током трајања болести, краће дијагностичко кашњење и већи број копија гена *SMN1* асоцирани су са краћим преживљавањем болесника са САЛС из Србије.
9. Број копија гена *SMN1* може бити од користи за унапређење алгоритама за предвиђање тока САЛС будући да је објективно мерљив и временски непроменљив фактор који утиче на преживљавање.

У поглављу **Литература** је дата листа 141 извора литературе. Цитирани радови су одговарајући, актуелни и омогућили су развој идеје за извођење истраживања ове докторске тезе, као и објашњење добијених резултата и извођење закључака. Наведени извори покривају све појединачне области овог истраживања и адекватно су наведени у самом тексту.

У поглављу **Прилози** дати су шематски прикази структуре теломерног дела сегменталне дупликације 5q13.2 код болесника са спиналном мишићном атрофијом типа I, II и III и родитеља болесника.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **M22 Brkušanin M**, Kosać A, Jovanović V, Pešović J, Brajušković G, Dimitrijević N, Todorović S, Romac S, Milić Rašić V, Savić-Pavićević D. Joint effect of the SMN2 and SERF1A genes on childhood-onset types of spinal muscular atrophy in Serbian patients. *J Hum Genet.* 2015;60(11):723-8. DOI: [10.1038/jhg.2015.104](https://doi.org/10.1038/jhg.2015.104)
2. **M23 Brkušanin M**, Jeftović Velkova I, Jovanović VM, Perić S, Pešović J, Brajušković G, Stević Z, Savić-Pavićević D. SMN1 copy number as a modifying factor of survival in Serbian patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Srp Arh Celok Lek. in press*
Потврда о финалном прихватању рада дата је као Прилог 1 овог Извештаја.

Б2. Радови у часописима домаћег значаја

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **M34 Brkušanin M**, Kosać A, Jovanović V, Pešović J, Brajušković G, Dimitrijević N, Todorović S, Romac S, Milic Rašić V, Savić Pavićević D. Joint effect of the SMN2 and SERF1A genes on early-onset Serbian spinal muscular atrophy patients. Book of abstracts: 38-9. 11th Balkan Congress of Human Genetics. Belgrade, Serbia. 17-septembar 2015.
2. **M34 Brkušanin M**, Kosać A, Jovanović V, Pesovic J, Brajušković G, Dimitrijević N,

Romac S, Milić Rašić V, Savić Pavićević D. Correlation of copy number of the SMN2, SERF1A and NAIP genes with severity of spinal muscular atrophy in Serbian patients. *European Journal of Human Genetics* 2015; 23 (Suppl 1):422. European Conference of Human Genetics 2015, Glasgow, Scotland, UK. 2015, June 6-9.

3.

M34 Brkušanin M, Kosać A, Jovanović A, Pešović J, Brajušković G, Milić-Rašić V, Savić-Pavićević D. SMN2 gene copy number and promoter methylation as disease modifiers of childhood-onset spinal muscular atrophy. Book of abstracts: 186. European Network to Cure ALS (ENCALS) Meeting. Ljubljana, Slovenija, May 18-20, 2017.

4.

M34 Brkušanin M, Kosać A, Jovanović V, Jeftović Velkova I, Pešović J, Perić S, Brajušković G, Milić Rašić V, Stević Z, Savić-Pavićević D. Structure of the 5q13.2 segmental duplication as a modifier of the phenotype of spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. Book of Abstracts: 73-74. *Clinical Genomics and NGS*. Bertinoro – Italy, April 29 – May 4, 2018.

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1.

M64 Brkušanin M, Kosać A, Pešović J, Brajušković G, Romac S, Milić Rašić V, Savić Pavićević D. Association of SMN2 gene copy number with clinical types of spinal muscular atrophy (SMA) in Serbian patients. Book of abstracts: 78. V Congress of the Serbian Genetic Society. Kladovo (Belgrade). 28. septembar – 2. oktobar 2014.

2.

M64 Brkušanin M, Kosać A, Brajušković G, Pešović J, Romac S, Milić Rašić V, Savić Pavićević D. Unapređenje genetičke dijagnostike spinalne mišićne atrofije primenom metode multipleks amplifikacije ligiranih proba. Knjiga apstrakata P103. X/XVI Kongres neurologa Srbije sa međunarodnim učešćem. Novi Sad, Srbija, 22-24. oktobar 2015.

Мишљење и предлог Комисије:

Докторска теза **Милоша Ђ. Бркушанина** написана је у складу са образложењем наведеним у пријави теме и садржи све релевантне елементе неопходне за овакву врсту рада. Презентовани резултати указују на успешну реализацију постављених циљева. Истраживања у оквиру докторске тезе истичу значај структурних реаранжмана сегменталне дупликације 5q13.2 као генетичких модификатора болести моторног неурона. Број копија гена *SMN2* и *SERF1*, као и њихов удружени ефекат доприносе фенотипској варијабилности дечије спиналне мишићне атрофије, док је већи број копија гена *SMN1* повезан са краћим преживљавањем болесника са спорадичном формом амиотрофичне латералне склерозе. Резултати ове докторске тезе објављени су у два научна рада (категорије M22 и M23) и представљени на четири међународна и два домаћа научна скупа. Докторска дисертација Милоша Ђ. Бркушанина представља оригинални научни допринос у области молекуларне генетике болести моторног неурона и имају потенцијалну клиничку примену у смислу предвиђања тока болести, с обзиром на то да су генетички параметри објективно мерљиви и временски непроменљиви.

На основу изложеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај Извештај и одобри **Милошу Ђ. Бркушанину** јавну одбрану докторске дисертације под насловом: „**Структура сегменталне дупликације 5q13.2 као модификатор фенотипа спиналне мишићне атрофије и амиотрофичне латералне склерозе**“.

КОМИСИЈА:

др Душанка Савић-Павићевић, редовни професор
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Ведрана Милић-Рашић, редовни професор
Универзитет у Београду-Медицински факултет

др Зорица Стевић, редовни професор
Универзитет у Београду-Медицински факултет

др Горан Брајушковић, редовни професор
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

У Београду, 08.11.2018. године.

Прилог 1. Потврда о финалном прихватању рада Brkušānin M, Jeftović Velkova I, Jovanović VM, Perić S, Pešović J, Brajušković G, Stević Z, Savić-Pavićević D. SMN1 copy number as a modifying factor of survival in Serbian patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Srp Arh Celok Lek.*

11/8/2018

University of Belgrade - Faculty of Biology Mail - Fwd: Rad br. 133/18



Duška Savić Pavićević <duska@bio.bg.ac.rs>

Fwd: Rad br. 133/18

Miloš Brkušānin <milosb@bio.bg.ac.rs>
To: Duška Savić Pavićević <duska@bio.bg.ac.rs>

Thu, Nov 8, 2018 at 2:00 PM

----- Forwarded message -----

From: **Srpski arhiv za celokupno lekarstvo** <office@srpskiarhiv.rs>
Date: miē., 17 oct. 2018 9:55
Subject: Rad br. 133/18
To: Miloš Brkušānin <milosb@bio.bg.ac.rs>

Poštovani gospodine Brkušānine,

Zadovoljstvo nam je da Vas obavestimo da je Vaš rad br. 133/18, naslovljen „SMN1 copy number as a modifying factor of survival in Serbian patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis“, prihvaćen za objavljivanje u „Srpskom arhivu za celokupno lekarstvo“.

S poštovanjem,

Mirko Rajić,

Uredništvo "Srpskog arhiva za celokupno lekarstvo"