

НАСТАВНО – НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На IX редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 15.07.2014. године, прихваћен је извештај ментора др Марије Гућ-Шћекић о урађеној докторској дисертацији **Маријане Мишковић**, запослене у Институту за здравствену заштиту мајке и детета Р Србије „Др Вукан Чупић“ у Београду, под насловом: **„Варијабилност генотипа и фенотипске експресије спиналне мишићне атрофије код пацијената из Србије”** и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Марија Гућ-Шћекић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, др Ивана Новаковић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, др Јелена Милашин, редовни професор Стоматолошког факултета Универзитета у Београду и др Душан Кецкаревић, доцент Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Наставно-научном већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација **Маријане Мишковић** под насловом **„Варијабилност генотипа и фенотипске експресије спиналне мишићне атрофије код пацијената из Србије”** написана је на 122 стране. Дисертацију чине седам поглавља: **Увод** (30 стране), **Циљ рада** (2 стране), **Материјал и методе** (14 страна), **Резултати** (26 страна), **Дискусија** (34 стране), **Закључци** (3 стране) и **Литература** (13 страна). Дисертација садржи 46 слика и 27 табела.

АНАЛИЗА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

У **уводном делу** докторске дисертације изнет је општи приказ проблематике и најважнији литературни подаци релевантни за разумевање истраживања изнетог у тези. Описан је клинички аспект спиналне мишићне атрофије (СМА), класификација пацијената према тежини клиничке слике и времену појаве првих симптома. Наведен је начин наслеђивања и учесталост појаве обољења као и хетерозиготних носилаца мутације. Након тога приказана је молекуларна основа болести, почев од првих открића везаних за њену наследну основу у смислу идентификовања *SMN1* гена као главног узрочника обољења, до савремених сазнања о молекуларним механизмима који стоје у основи патогенезе и данас налазе примену у истраживању генске терапије. Након тога, претстављена је корелација генотипа са фенотипском експресијом болести кроз утицај и осталих гена из СМА региона- *NAIP*, *SMN2*, *GTF2H2* и *H4F5*. На крају је приказана, поред клиничке и молекуларно генетичка дијагностика СМА са основним принципима метода које се користе у ове сврхе.

У поглављу **циљ рада** су представљени сви циљеви обухваћени овом дисертацијом и детаљан план рада да би се они остварили. Као основни циљ овог истраживања је постављено испитивање реаранжмана како *SMN1* гена, као главног гена-узрочника СМА, тако и свих осталих гена из 5q13 региона - *NAIP*, *SMN2*, *GTF2H2* и *H4F5* ради утврђивање генетичке основе болести и њеног повезивања са различитим фенотипским експресијама. Поред тога, циљ истраживања је обухватио и одређивање статуса здравих хетерозиготних носилаца мутације ради прецизног прерачунавања индивидуалних ризика за добијање оболелог потомства као и пренаталну дијагностику у случајевима где је то оправдано.

У оквиру поглавља **Материјал и методе** кандидаткиња је детаљно навела опис материјала и примењених експерименталних техника. Истраживање је укључило групу од преко стотину СМА пацијената код којих је прво спроведена свеобухватна анализа *SMN1* гена. Након тога код дела пацијената су се додатно испитивали и остали гени из 5q13 региона у циљу анализе варијабилности СМА критичног региона и његовог утицаја на фенотип пацијената. Студија је такође обухватила и значајан број здравих особа са породичном СМА анамнезом код којих је анализом броја копија *SMN1* гена одређиван статус хетерозиготних носилаца делеције овог гена. За пренаталну дијагностику коришћени су фетални узорци из породица са повећаним ризиком за добијање оболелог потомства. Кандидаткиња након тога даје детаљан опис реагенаса и процедура за изолацију ДНК из различитих коришћених ткива, а потом следи и опис метода примењених у истраживању: PCR амплификација и полиморфизам дужине рестрикционих фрагмената (PCR/RFLP метода, *eng.* „Polymerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphism”) коришћене за детекцију хомозиготне делеције егзона 7 и 8 *SMN1* гена; PCR методе за детекцију хомозиготне делеције *NAIP* гена; мултиплекс лигационо-зависна амплификација проба (MLPA метода, *eng.* „Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification”) за одређивање броја копија свих испитиваних гена као и обрада података добијених овом анализом и на крају секвенцирање егзона 6 *SMN1* гена за идентификацију тачкастих мутација. За проналажења статистичких релација између анализираних параметара и фенотипа пацијената коришћен је χ^2 -тест и Фишеров тест тачне вероватноће.

У поглављу **Резултати** кандидаткиња је систематски и јасно изнела резултате према постављеним циљевима који су детаљно описани и табеларно и графички представљени. У првом делу су представљени резултати анализе *SMN1* гена који се односе на учесталост и дистрибуцију хомозиготне делеције овог гена: она је детектована код 81% (87/107) испитаника и њена учесталост опада што је блажа форма болести. Код пацијената без хомозиготне делеције код којих су поновљена клиничка испитивања потврдила дијагнозу СМА анализиран је број копија присутног *SMN1* гена ради откривања сложених хетерозиготних носилаца делеције на једном аелу и тачкасте мутације на другом. Код 23,1% (3/13) пацијената је детектована једна *SMN1* копија и потврђена хетерозиготност. Код два оваква пацијента секвенцирање егзона 6 *SMN* гена је показало присуство мутације *c.821C>T* и потврдило клинички дијагнозу блажег облика болести - СМА тип II. У следећем делу овог поглавља представљени су резултати испитивања и осталих гена из 5q13 региона и њихове повезаности са фенотипском експресијом болести. Прво је на истом узорку анализирана учесталост и дистрибуција хомозиготне

делеције *NAIP* гена: она је детектована код 21,5% (23/107) СМА пацијената; уочена је статистички значајна разлика у учесталости ове делеције и типа СМА јер је најучесталија у групи пацијената са најтежим обликом болести у поређењу са лашким. Компаративна анализа хомозиготне делеције *SMN1* и *NAIP* гена је показала да су веће хомозиготне делеције које обухватају оба гена - *SMN1* и *NAIP* учесталије у групи најтеже оболелих, док су мање делеције или њихово одсуство најучесталије у групи са најлакшом клиничком сликом, што је и статистички потврђено. У циљу даљег испитивања генетичке основе различите фенотипске експресије болести је код доступних пацијената са претходно дијагностикованом хомозиготном делецијом *SMN1* гена даље одређиван број копија осталих гена из СМА региона: *NAIP*, *SMN2*, *GTF2H2* и *H4F5*. Овом анализом је утврђено да број индивидуалних копија *NAIP* и *SMN2* гена статистички значајно корелира са фенотипом СМА пацијената, тако што опада са тежином клиничке слике. Поред тога компаративна анализа *SMN2* и *NAIP* гена је показала да смањење броја копија *NAIP* гена прати смањење броја копија *SMN2* гена и резултира у тежем облику болести. Није пронађена статистички значајна корелација између типа СМА и броја копија *GTF2H2* и *H4F5* гена у испитиваној групи пацијената. Испитивањем здравих особа са породичном СМА анамнезом је код 61,5% (24/39) испитаника, кроз детекцију једне копије *SMN1* гена, потврђен статус хетерозиготних носилаца. Код породица са високим ризиком за добијање оболелог потомства спроведена је пренатална дијагностика за директну детекцију хомозиготне *SMN1* делеције која је детектована код 19,7% (13/66) испитиваних феталних узорака.

У поглављу **Дискусија** разматрани су резултати истраживања, упоређени су са досадашњим доступним литерарним подацима и истакнут је њихов значај. Она је написана садржајно и јасно и на критички начин сагледава резултате приказане у претходном поглављу. Цитирана литература је адекватна за тумачење резултата ове дисертације и на прави начин осликава тренутна сазнања из области. У складу са претходним поглављем кандидаткиња у првом делу дискутује резултате анализе *SMN1* гена. Детектована учесталост хомозиготне делеције овог гена у популацији СМА пацијената из Србије је нешто нижа у односу на исте у другим етничким групама, али је у сагласности са оним из суседних популација. Статистички значајну разлику у учесталости ове делеције у односу на тип СМА кандидаткиња дискутује као могућу последицу веће учесталости недефицираних *SMN1* алела у нашој популацији. Управо из тих разлога у наставку дискутује важност одређивања броја копија *SMN1* гена код пацијената без хомозиготне делеције и идентификацију тачкастих мутација како због коначне потврде дијагнозе тако и због утицаја на клиничку слику пацијената.

Иако је молекуларна основа СМА патогенезе до данас у великој мери објашњена, генетичка основа различитог фенотипа пацијената је у великој мери остала нејасна. У овој тези је стога испитиван цео СМА критични регион који је прво обухватио анализу хомозиготне делеције *NAIP* гена. Учесталост ове делеције на испитиваном узорку је међу најнижим до сада објављеним, али је у сагласности са учесталостима из суседних популација. Анализа дистрибуције ове делеције као и компаративна анализа хомозиготне делеције *SMN1* и *NAIP* гена је показала постојање корелације између величине делеције и фенотипа пацијената тако што веће делеције прати и тежа клиничка слика. Добијени резултати се стога у овој тези

тумаче у смислу могуће улоге *NAIP* гена у модификацији тежине клиничке слике на испитиваном узорку СМА пацијената. У наставку овог поглавља се потом разматрају резултати добијени анализом броја копија *NAIP*, *SMN2*, *GTF2H2* и *H4F5* гена који су показали да само број копија *NAIP* и *SMN2* гена корелира са фенотипом пацијената. На основу ових резултата кандидаткиња дискутује и потенцијалне молекуларне механизме настанка болести на испитиваном узорку СМА пацијената. Иако није пронађена статистички значајна корелација између типа СМА и броја копија *GTF2H2* и *H4F5* гена у испитиваној групи, одсуство *GTF2H2* гена кроз детекцију 0 копија је детектовано само код најтеже форме болести. На овај начин је додатно потврђено да веће делеције прати и тежа клиничка слика. У последњем делу се детаљно дискутује, на појединачним примерима процена индивидуалног ризика за статус здравих хетерозиготних носилаца делеције *SMN1* гена. Посебно се истиче важност ових резултата у смислу пружања адекватног генетичког савета и доношења одлуке о спровођењу пренаталне дијагностике, што је дискусијом резултата добијених испитивањем феталних узорака из породица са СМА анамнезом у потпуности потврђено.

На основу добијених резултата изнети су **Закључци** ове докторске дисертације који одговарају постављеним циљевима и сажимају најважније ставове изнете у дискусији. Свеобухватно је закључено је да је примењени приступ у анализи *SMN1* гена неопходан у циљу поуздане пренаталне и постнаталне дијагностике и израчунавања прецизног ризика за добијање оболелог потомства. Анализом осталих гена из 5q13 региона је уочен висок степен варијабилности и нестабилности овог региона као и могући механизми који се налазе у основи болести код испитиваних пацијената. Показано је да приликом предвиђања СМА фенотипа код анализираних пацијената треба имати у виду следеће: број копија *SMN2* гена, величину хомозиготне или хетерозиготне делеције која поред *SMN1* укључује и суседне гене као и тип интрагенске *SMN1* мутације уколико је присутна.

У поглављу **Литература** наведене су референтне публикације које обухватају 158 наслова који се адекватно наводе у тексту.

БИБЛИОГРАФИЈА

Кандидат је публиковала три научна рада, учествовала са 6 саопштења на међународним и 5 на домаћим научним скуповима, као и једним радом у тематском зборнику националног значаја, што укупно чини 15 библиографске јединице. Публиковани радови и саопштења су из уже научне области дисертације, а 6 библиографских јединица је проистекло из теме дисертације, од чега 2 рада у часопису са СЦИ листе.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

B1. Радови у часописима међународног значаја: M22, M23

Miskovic M, Lalic T, Radivojevic D, Cirkovic S, Vlahovic G, Zamurovic D, Guc-Scekic M: Lower incidence of deletions in the survival of motor neuron gene and the neuronal

apoptosis inhibitory protein gene in children with spinal muscular atrophy from Serbia. Tohoku Journal of Experimental Medicine 2011; 225(3):153-159

Miskovic M, Lalic T, Radivojevic D, Cirkovic S, Ostojic S, Guc-Scekic M. Ten years of experience in molecular prenatal diagnosis and carrier testing for spinal muscular atrophy among families from Serbia. Int J Gynaecol Obstet 2014;124(1):55-8.

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја: М34

Miskovic M, Lalic T, Đurisić M, Radivojevic D, Guc-Scekic M, Zamurovic D: Prenatal and Postnatal Molecular Study in Serbian SMA Families- two years experience. European Human Genetics Conference 2005, Prague, Check Republic, May 7-10, 2005. European Journal of Human Genetics 2005;13(1):247,p. 0772

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја: М64

Mišković M, Lalić T, Đurišić M, Radivojević D, Guć-Ščekić M: Dvogodišnje iskustvo u molekularnoj dijagnostici spinalne mišićne atrofije . 5.Kongres Neurologije i psihijatrije razvojnog doba Srbije i Crne Gore, Beograd, 21-23 april 2005, Zbornik radova i sažetaka 2005; 240, PN II/15.

Mišković M, Lalić T, Đurišić M, Radivojević D, Guć-Ščekić M: Dvogodišnje iskustvo u molekularnoj dijagnostici spinalne mišićne atrofije.Pedijatrski dani Srbije i Crne Gore, Niš,28-30. septembar 2005.Zbornik radova 2005;232-233.Dvogodišnje iskustvo u molekularnoj dijagnostici spinalne mišićne atrofije. Pedijatrski dani Srbije i Crne Gore, Niš, 2005.

Б5. Поглавље у књизи или рад у тематском зборнику националног значаја

Mišković M, Lalić T, Đurišić M, Radivojević D, Guć-Ščekić M, Lakić N, Zamurović D, Vlahović D: Prenatalna i postnatalna dijagnostika spinalne mišićne atrofije primenom metoda molekularne genetike (dvogodišnje iskustvo). U: Problemi u pedijatriji 2005, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd 2005; 26:310-318.

МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Докторска дисертације Маријане Мишковић под називом „Варијабилност генотипа и фенотипске експресије спиналне мишићне атрофије код пацијената из Србије”, представља оригиналан научни допринос у истраживањима молекуларно генетичке основе спиналне мишићне атрофије.

Начин истраживања, методе и обрада добијених резултата представљају модел за поуздану и прецизну молекуларно генетичку дијагностику СМА као и прогнозу фенотипске експресије болести. Са аспекта примене, добијени резултати ће омогућити у будућности формирање националног регистра болесника оболелих од СМА, са потпуно дефинисаном молекуларно генетичком основом, кроз које ће овим пацијентима бити омогућено укључивање у светска преклиничка и клиничка испитивања нових терапијских приступа. Велики значај ових резултата представља и чињеница да они омогућавају и здравим особама са породичном

СМА анамнезом прецизну процену ризика и пружање адекватног генетичког савета о могућностима пренаталне дијагностике и на тај начин планирање добијања здравог потомства.

Кандидаткиња је у својој докторској дисертацији успешно испунила постављене циљеве истраживања кроз опсежан експериментални рад. У току израде докторске дисертације она је демонстрирала истраживачку зрелост у одабиру експерименталног приступа. Начин на који је анализирала и дискутовала добијене резултате јасно указује на изузетан степен њеног познавања домаће и стране литературе из ове области. Мишљење комисије је да докторска дисертација испуњава све стандардне услове и критеријуме. На основу свега изнетог предлажемо Наставно-научном већу да прихвати извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације кандидаткиње Маријане Мишковић.

Београд, 27.08.2014.

Комисија:

др Марија Гућ-Шћекић, редовни професор
Биолошки факултет - Универзитет у Београду

др Ивана Новаковић, редовни професор
Медицински факултет - Универзитет у Београду

др Јелена Милашин, редовни професор
Стоматолошки факултет - Универзитет у Београду

др Душан Кецкаревић, доцент
Биолошки факултет - Универзитет у Београду