

НАСТАВНО – НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На III редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду одржаној 08.12.2017. године, прихваћен је извештај ментора др Наташе Тошић и др Соње Павловић о урађеној докторској дисертацији Ирене М. Марјановић, истраживача сарадника Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду под насловом: „Идентификација молекуларно-генетичких маркера патогенезе акутне мијелоидне леукемије“ и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Наташа Тошић, виши научни сарадник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, др Соња Павловић, научни саветник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду и др Душанка Савић Павићевић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду. Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација Ирене Марјановић је оригинално истраживање које за тему има анализу нових потенцијалних молекуларно – генетичких маркера код пацијената са акутном мијелоидном леукемијом (АМЛ), значајних за постављање тачне дијагнозе, утврђивање прогнозе болести, праћење тока болести, рано откривање рецидива (минимална резидуална болест) и за избор одговарајуће терапије.

Докторска дисертација Ирене Марјановић је урађена у Лабораторији за молекуларну биомедицину Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду.

Докторска дисертација се састоји из поглавља: Резиме (на српском и енглеском језику), Увод, Циљеви, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература. Дисертација је написана на 152 стране и садржи 30 слика, 15 табела и 257 наслова у поглављу Литература који се адекватно наводе у тексту.

АНАЛИЗА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Предмет докторске дисертације је анализа нових молекуларно - генетичких маркера значајних за патогенезу АМЛ. Квантификацијом експресије *WT1*, *BAALC*, *EVII* и *MNI* гена, који су на основу најновијих истраживања увршћени у ред нових потенцијалних молекуларних маркера АМЛ, ова докторска дисертација доприноси успостављању прецизније класификације леукемија и бољем разумевању етиологије ове болести. Применом NGS (енг. "Next generation sequencing") технологије, у узорцима адултне (аАМЛ) и дечје (дАМЛ) АМЛ извршена је детекција мутација у генима карактеристичним за друге хумане малигнитете, у циљу проналажења нових молекуларних АМЛ маркера као и комплетнијег сагледавања етиологије леукемија. Поређење добијених резултата између ове две групе АМЛ пацијената допринело је расветљењу патогенезе мијелоидних леукемија.

У поглављу УВОД разматрана су општа и савремена сазнања везана за АМЛ. Описан је процес хематопоезе, леукемогенезе и процес клонске еволуције у леукемијама. Описане су најчешће молекуларно-генетичке промене у АМЛ, као и разлике у мутационом профилу дАМЛ и аАМЛ. Објашњено је на који начин нова технологија NGS секвенцирања обезбеђује знатно бољи увид у порекло и еволуцију леукемогенезе, укључујући и патогенезу АМЛ. Такође, представљени су гени *WT1*, *MNI*, *EVII* и *BAALC* који се сматрају потенцијалним прогностичким маркерима за пацијенте оболеле од АМЛ са нормалним кариотипом (АМЛ-НК), с обзиром да се прекомерна експресија ових гена доводи у потенцијалну везу са лошијом прогнозом код оболелих. Описана су досадашња сазнања о улогама које ови гени имају у нормалној хематопоези и леукемијама, њихова улога у основним сигналним путевима ћелије, као и преглед досадашња изучавања о значају висине нивоа експресије ових гена као прогностичког фактора код АМЛ-НК.

Поглавље ЦИЉЕВИ садржи јасно дефинисане циљеве овог истраживања. Прва група циљева била је усмерена ка анализи мутационог профила дечје и адултне АМЛ, применом NGS технологије, ка одређивању детаљаног мутационог профила обе старосне групе АМЛ, уз потенцијалну детекцију нових молекуларних маркера који учествују у патогенези АМЛ. Друга група циљева је усмерена ка испитивању нивоа експресије *WT1*, *EVII*, *BAALC* и *MNI* гена код АМЛ-НК пацијената, у тренутку постављања дијагнозе и касније у току болести. Добијени резултати доприносе утврђивању значаја који ниво експресије ових гена има у прогнози и преживљавању оболелих, као и потенцијални значај у праћењу минималне резидуалне болести (МРБ).

У оквиру поглавља МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ прецизно су дефинисане студијске групе које су, у случају NGS анализе, чиниле групе дечјих и адултних АМЛ пацијената, док се у анализи експресије гена, група састојала од адултних АМЛ-НК пацијената и контролне групе здравих испитаника. Детаљно је описана методологија за детекцију соматских мутација применом NGS секвенцирања. Такође, описан је qRT-PCR (енг. "quantitative real-time PCR") есеј и остале методе

потребне за анализу експресије гена, у узорцима косне сржи адултних AML-НК пацијената. За биоинформатичку и статистичку обраду података у NGS анализи коришћен је уграђен софтвер MiSeq платформе, као и Prism5 софтверски пакет. За статистичку обраду подата у анализи експресије гена коришћени су непараметарски тестови: Хи-квадрат тест независности, Фишеров „тачан показатељ вероватноће“ (енг. “Fisher’s Exact Probability Test”), Ман-Витнијев У-тест и Крускал-Волисов тест. У анализама преживљавања коришћене су Каплан-Мајерова метода, као и Лог Ранк тест.

У поглављу РЕЗУЛТАТИ кандидат је изложио добијене резултате спроведеног истраживања. Први део овог поглавља приказује анализу мутационог профила 20 дечјих и 20 адултних АМЛ пацијената применом NGS методе, која доприноси расветљењу патогенезе мијелоидних леукемија и открићу нових молекуларних маркера који учествују у патогенези АМЛ. Резултати анализе су показали да АМЛ садржи релативно мали број генетичких промена у односу на друге малигнитете, у просеку само 3 мутације по пацијенту, код обе групе пацијената. Овај налаз указује на то да је ова болест погодна за примену молекуларне циљане терапије. Заступљеност најчешћих мутација у појединачним генима, који су повезани са патогенезом АМЛ, разликовала се код дAML и аAML: *IDH1* (0% код дAML, 5% код аAML), *IDH2* (0% код дAML, 10% код аAML), *NPM1* (10% код дAML, 35% код аAML). Ова разлика у мутационом профилу између дечјих и адултних АМЛ пацијената истиче постојање разлике у патогенези АМЛ код ове две групе болесника. Такође, присуство мутација у 4 гена (*JAK3*, *ABL1*, *GNAQ* и *EGFR*) који кодирају тирозин киназе или протеине који су удружени са тирозин киназама детектовано је искључиво код дAML пацијената, док је код 5 гена (*IDH1*, *APC*, *HNFI1A*, *GNAS* и *SMARCB1*) који су укључени у метилацију и модификацију хистона, присуство мутација утврђено искључиво код аAML пацијената. Резултати овог поглавља указују на различиту молекуларну основу дечје и адултне АML, као и на потенцијалне таргете за циљану терапију.

Други део поглавља РЕЗУЛТАТИ односи се на одређивање нивоа експресије *WT1*, *EVII*, *BAALC* и *MNI* гена, као потенцијалних молекуларно-генетичких маркера значајних за АМЛ-НК. Групе пацијената са високим нивоом експресије *WT1* или *BAALC* или *MNI* гена имале су краће трајање комплетне ремисије (КР) и краће укупно преживљавање (УП). Из оваквих резултата закључено је да висок ниво *WT1*, висок ниво *BAALC* и висок ниво *MNI* експресије, сваки за себе, представља неповољан прогностички фактор. Такође, експресија *WT1* може се сматрати добрим молекуларним маркером за праћење МРБ, одговора на терапију и предикцију релапса болести, а експресија *BAALC* гена стабилним молекуларним маркером погодним за праћење МРБ и одговора на терапију код АМЛ-НК. Испитивање експресије *MNI* гена показала је да он представља молекуларни маркер погодан за праћење одговора на иницијалну терапију, али није стабилан маркер за праћење МРБ код АМЛ-НК. Резултати су показали да пацијенти са повишеним нивоом експресије *EVII* имају повећан ризик од појаве релапса болести, али без утицаја на дужину трајања КР и УП.

У поглављу ДИСКУСИЈА, сходно задатим циљевима и представљеним резултатима, разматран је клинички значај добијених резултата и дат упоредни преглед са литературним подацима. Коментарисане су предности које циљано

секвенцирање нове генерације примењено у првом делу ове дисертације има у односу на друге NGS приступе коришћене у другим студијама. У овом делу доктората пажња је била усмерена ка идентификацији варијанти које имају значајну улогу у патогенези леукемија, односно ка детекцији варијанти које потенцијално могу изазвати промене у структури протеина. Дискутован је резултат који је показао да су најзаступљеније детектоване варијанте биле у генима који кодирају тирозин киназе, или протеине укључене у сигналне путеве који крећу низводно од активираних тирозин киназа. Преваленца заступљености ових варијанти (мутација) код дАМЛ и аАМЛ групе пацијената указала је на то да су оне од велике важности за патогенезу АМЛ (енг. “driver” мутације). Такође, анализиран је и налаз да се поједине мутације јављају искључиво у једној старосној групи пацијената, али не и у другој. Наиме, примењено је да су сви мутирани гени нађени код дАМЛ пацијената представљали гене за тирозин киназе или гене који кодирају протеине асоциране са тирозин киназама, док су код аАМЛ пацијената претежно биле присутне мутације у генима који кодирају протеине задужене за метилацију и модификацију хистона. Дискутован је резултат који је потврдио постојање веома малог броја мутација код дАМЛ и аАМЛ пацијената, што је указало на то да је за настанак АМЛ потребно мање генетичких промена него за друге малигнитете, што ову болест чини погодном за примену молекуларне циљане терапије. Појединачно је анализиран клинички значај увећаног нивоа експресије *WT1*, *BAALC*, *EVII* и *MNI* gena код АМЛ-НК пацијената на почетку болести и у току лечења, као и њихов потенцијал да се користе као релевантан маркер за праћење МРБ. За сваки ген понаособ анализирана је повезаност са већ познатим молекуларним маркерима карактеристичним за АМЛ, а такође је детаљно коментарисана могућност примене промењене експресије ових gena као новог молекуларног маркера значајног за прогнозу АМЛ-НК.

У поглављу ЗАКЉУЧЦИ, јасно је изнето 19 закључака који у потпуности произилазе из добијених резултата.

БИБЛИОГРАФИЈА

Ирена Марјановић је публиковала 7 научних радова, учествовала са 36 саопштења на међународним научним скуповима и има 3 саопштења на скуповима националног значаја, што укупно чини 46 библиографских јединица. Три публикована рада и 13 саопштења су из уже научне области дисертације, а 16 библиографских јединица је уско повезано са темом докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Радови у часописима међународног значаја

1. **Marjanovic I**, Karan-Djurasevic T, Ugrin M, Virijevic M, Vidovic A, Tomin D, Suvajdzic Vukovic N, Pavlovic S, Tosic N. "Use of Wilms Tumor 1 Gene Expression as a Reliable Marker for Prognosis and Minimal Residual Disease Monitoring in Acute Myeloid Leukemia With Normal Karyotype Patients." Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2017 May;17(5):312-319. M22
2. **Marjanovic I**, Kostic J, Stanic B, Pejanovic N, Lucic B, Karan-Djurasevic T, Janic D, Dokmanovic L, Jankovic S, Vukovic NS, Tomin D, Perisic O, Rakocovic G5, Popovic M, Pavlovic S, Tosic N. „Parallel targeted next generation sequencing of childhood and adult acute myeloid leukemia patients reveals uniform genomic profile of the disease.“ Tumor Biol. 2016 Oct;37(10):13391-13401. M22
3. Virijevic M, Karan-Djurasevic T, **Marjanovic I**, Tosic N, Mitrovic M, Djunic I, Colovic N, Vidovic A, Suvajdzic-Vukovic N, Tomin D, Pavlovic S. "Somatic mutations of isocitrate dehydrogenases 1 and 2 are prognostic and follow-up markers in patients with acute myeloid leukaemia with normal karyotype." Radiol Oncol. 2016 Sep 8;50(4):385-393. M22

Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја М34

1. Tosic N, Karan-Djurasevic T, **Glumac I**, Kostic T, Spasovski V, Colovic N, Suvajdzic-Vukovic N, Pavlovic S. IDH1 and IDH2 mutations in acute myeloid leukemia patients with normal karyotype in Serbia. 10th Balcan Congress of Human Genetics 2013, Bled, Slovenia.
2. **Glumac I**, Karan-Djurasevic T, Tosic N, Spasovski V, Virijevic M, Djunic I, Colovic N, Vidovic A, Suvajdzic Vukovic N, Tomin D, Pavlovic S. WT1 expression at diagnosis in Serbian acute myeloid leukemia patients with normal karyotype (AML-NK). V Congress of the Serbian Genetic Society, Kladovo, Serbia, September 28th –October 2nd, 2014. I-10 Poster, page 48.

3. Sonja Pavlovic, Bojana Stanic, Jelena Kostic, Nadja Pejanovic, Bojana Lucic, Natasa Tosic, **Irena Glumac**, Dragana Janic, Lidija Dokmanovic, Srdja Jankovic, Nada Suvajdzic Vukovic, Dragica Tomin, Biljana Mihaljevic, Milena Todorovic, Jelena Jelacic, Damjan Krstajic, Milos Popovic, Igor Bogicevic, Maja Stojiljkovic. Next-generation sequencing analysis of hematological malignancies: Serbian experience. V Congress of the Serbian Genetic Society, September 28-October 2, 2014, Kladovo, Serbia. OP
4. Pavlovic S, Stanic B, Kostic J, Pejanovic N, Lucic B, Tosic N, **Glumac I**, Janic D, Dokmanovic L, Jankovic S, Suvajdzic Vukovic N, Tomin D, Mihaljevic B, Todorovic M, Jelacic J, Krstajic D, Popovic M, Bogicevic I, Stojiljkovic M. Next-generation sequencing analysis of hematological malignancies: Serbian experience 2014 Golden Helix Summer School, 11-15 September 2014, Aegina, Greece. Abstract Book p.
5. **Glumac I**, Kostic J, Stanic B, Pejanovic N, Lucic B, Karan-Djurasevic T, Janic D, Dokmanovic L, Jankovic S, Suvajdzic-Vukovic N, Tomin D, Popovic M, Bogicevic I, Pavlovic S, Tosic N. Targeted Next Generation Sequencing (NGS) in Parallel Analyses of Childhood (cAML) and Adult Acute Myeloid Leukemia (aAML) Patients. 20th European Hematology Association Congress, June 11-14, 2015, Vienna, Austria, Haematologica 2015, 100 (supp 1):360.
6. **Glumac I**, Kostic J, Stanic B, Pejanovic N, Lucic B, Karan Djurasevic T, Perisic O, Rakocevic I, Popovic M, Tosic N, Pavlovic S. Targeted next generation sequencing (NGS) in parallel analyses of childhood (cAML) and adult acute myeloid leukemia (aAML) patients. 2015 The 1st International OMICs in Biomedical Research conference, MedILS, Split, Croatia, June 8th – 12th 2015. p90-91.
7. **Glumac I**, Karan-Djurasevic T, Tosic N, Kostic T, Kostic J, Virijevec M, Djunic I, Colovic N, Suvajdzic Vukovic N, Tomin D, Pavlovic S. High EVI1 expression at diagnosis predicts adverse outcome in serbian acute myeloid leukemia patients with normal karyotype (AML-NK). International Conference on Acute Myeloid Leukemia „Molecular and translational“: Advances in biology and treatment, Budapest, Hungary, September 10-12, 2015. Poster 23.
8. **Glumac I**, Kostic J, Stanic B, Pejanovic N, Lucic B, Karan-Djurasevic T, Janic D, Dokmanovic L, Jankovic S, Suvajdzic Vukovic N, Tomin D, Krstajic D, Popovic M, Bogicevic I, Pavlovic S, Tosic N. Targeted next generation sequencing (NGS) in parallel analyses of childhood (cAML) and adult acute myeloid leukemia (aAML) patients. 11th Balkan Congress of Human Genetics, 17-20 September, 2015, Belgrade, Serbia. Abstract book: p51.
9. **Glumac I**, Kostic J, Stanic B, Pejanovic N, Lucic B, Karan-Djurasevic T, Janic D, Krstovski N, Jankovic S, Suvajdzic Vukovic N, Tomin D, Popovic M, Bogicevic I, Pavlovic S, Tosic N. Uperedna analiza genetičkog profila pacijenata obolelih od dečje i adultne akutne mijeloidne leukemije metodom sekvenciranja nove generacije. 3. Kongres hematologa Srbije, Kragujevac, Srbija, 12-15. Novembar 2015. OP02 strana 111.
10. Pavlović S, Kostić J, **Glumac I**, Suvajdžić Vuković N, Todorović-Balint M, Janić D, Dokmanović L, Tošić N. Utvrđivanje genetičkog profila hematoloških maligniteta metodom sekvenciranja nove generacije (NGS). Hrvatski Kongres Humane Genetike, Novembar 2015, Split, Hrvatska

11. Karan-Djurasevic T, **Glumac I**, Tosic N, Spasovski V, Virijevec M, Djunic I, Colovic N, Vidovic A, Suvajdzic N, Tomin D, Pavlovic S. WT1 Expression at Diagnosis and Follow-Up in Serbian Acute Myeloid Leukemia Patients with Normal Karyotype (AML-NK). 11th Balkan Congress of Human Genetics, Belgrade, Serbia 2015. Abstract book: page 58.
12. **Glumac I**, Kostic J, Stanic B, Pejanovic N, Lucic B, Karan-Djurasevic T, Janic D, Dokmanovic L, Jankovic S, Suvajdzic-Vukovic N, Tomin D, Popovic M, Bogicevic I, Pavlovic S, Tosic N. Targeted Next Generation Sequencing (NGS) in Parallel Analyses of Childhood (CAML) and Adult Acute Myeloid Leukemia (AAML) Patients. 20th European Hematology Association Congress, June 11-14, 2015, Vienna, Austria, Haematologica 2015; 100 (s1), page 360.
13. **I Marjanovic**, T Karan-Djurasevic, J Kostic, T Kostic, M Virijevec, I Djunic, N Suvajdzic Vukovic, D Tomin, S Pavlovic, N Tosic. Assessment of BAALC and MN1 gene expression level could contribute to improved prognostic stratification of the AML-NK patients. 21st Congress of the European Hematology Association Copenhagen, Denmark, June 9 - 12, 2016, Haematologica Volume 101, June s1; E932.

МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу изложеног у овом Извештају сматрамо да резултати кандидата Ирене Марјановић представљају оригиналан и значајан научни допринос у области патогенезе акутне мијелоидне леукемије. Добијени резултати представљају допринос разумевању различите молекуларне основе дечје и адултне АМЛ, и указују на потенцијалне таргете за циљану терапију. Такође, резултати указују да експресије *WT1*, *BAALC* и *MNI* представљају нове молекуларне маркере значајне за прогнозу АМЛ-НК.

У изради дисертације, кандидат Ирена Марјановић је показала изузетан степен познавања основне научне проблематике, самосталност у постављању хипотеза и циљева и приступању експерименталним задацима. Током израде докторске дисертације, кандидат је применила адекватне методе истраживања и обраде добијених резултата, које је критички дискутовала уз исцрпне податке из литературе.

На основу свега наведеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај Извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације Ирене Марјановић под насловом: „Идентификација молекуларно-генетичких маркера патогенезе акутне мијелоидне леукемије“.

Београд, 11. 12. 2017.

др Наташа Тошић, виши научни сарадник
Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство
Универзитет у Београду

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

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