

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На X редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 07.09.2018. године, прихваћен је извештај ментора др Гордане Јоксић, научног саветника и проф. др Катарине Зељић о урађеној докторској дисертацији **Јелене Г. Филиповић Тричковић**, истраживача сарадника у Институту за нуклеарне науке „Винча“ у Београду, под насловом **„Молекуларно-цитогенетичка карактеризација хромозомских прекида у лимфоцитима периферне крви пацијената оболелих од Фанконијеве анемије у различитим фазама болести“** и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Гордана Јоксић, научни саветник Института за нуклеарне науке „Винча“ Универзитета у Београду, др Катарина Зељић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Марина Стаменковић-Радак, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду.

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

ИЗВЕШТАЈ

ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација **Јелене Г. Филиповић Тричковић** под насловом **„Молекуларно-цитогенетичка карактеризација хромозомских прекида у лимфоцитима периферне крви пацијената оболелих од Фанконијеве анемије у различитим фазама болести“**, написана је на 121 страна, и подељена у 7 поглавља: **Увод** (26 страна), **Циљ** (1 страна), **Материјал и методе** (13 страна), **Резултати** (29 страна), **Дискусија** (24 стране), **Закључци** (2 стране) и **Литература** (26 страна). Рад садржи 235 библиографских јединица, 31 слику и 16 табела. Поред наведених поглавља, дисертација садржи податке о менторима, Садржај, Листу скраћеница, Сажетак на српском и енглеском језику, Биографију аутора и потписане изјаве.

АНАЛИЗА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Поглавље **Увод** докторске дисертације садржи две велике тематске целине подељене у потпоглавља у којима су на јасан и занимљив начин представљене полазне теоријске основе и приказани литературни подаци. Тематска целина **„Фрагилна места“** састоји се од четири потпоглавља, појмовно дефинише фрагилна места на хромозомима, објашњава номенклатуру, услове у којима се фрагилна места испољавају и традиционалну поделу на честа и ретка. Потпоглавље **„Ретка фрагилна места“** концизно објашњава поделу ретких фрагилних места, са освртом на механизме настанка и наслеђивања и клиничке импликације. У потпоглављу **„Честа фрагилна места“** детаљно су приказане карактеристике честих фрагилних места и њихова подела у односу на начин индукције. Како су у регионима честих фрагилних места описане транслокације, делеције и комплексни хромозомски реаранжмани, генске амплификације и интеграција онкогенних вируса, неоспорна је њихова улога у настанку хромозомске нестабилности која претходи канцерогенези. Са посебном пажњом описани су могући механизми нестабилности честих фрагилних места – специфичност ДНК структуре, динамика репликације у тим регионима, епигенетичке карактеристике (ткивна зависност и структура хроматина), утицај великих гена, протоонкогена и тумор-супресора, смештених у регионима честих фрагилних места, на њихово испољавање. Детаљно је приказан утицај процеса транскрипције великих гена и колизије процеса транскрипције и репликације на настанак фрагилних места. Подробно је објашњена улога протеина ДНК репарационог механизма у нестабилности честих фрагилних места, нарочито централног протеина FA/BRCA сигналног пута, FANCD2. Предочено је да се и крајеви хромозома, теломере, због своје специфичне грађе у посебним условима могу понашати као фрагилна места, што је нарочито изражено код недостатка FANCD2 протеина. Поред традиционалне поделе фрагилних места на честа и ретка, у потпоглављу **„Рано репликујућа фрагилна места“** описана је и нова класа фрагилних места и представљене су сличности и разлике у односу на честа. У потпоглављу **„Клинички значај фрагилних места“** приказан је преглед молекуларно окарактерисаних фрагилних места и опсежно је описана улога честих фрагилних места и гена смештених у њиховим регионима у настанку различитих тумора, што указује на значај њиховог испитивања за разумевање процеса канцерогенезе. С обзиром на то да се честа фрагилна места чешће испољавају код болести хромозомских нестабилности, у наредној тематској целини **„Фанконијева анемија“** темељно је описана ова болест (ФА) која припада групи синдрома хромозомских нестабилности кроз четири

потпоглавља. Ово је ретка болест коју карактерише широк спектар конгениталних аномалија, повећана склоност ка развоју малигних тумора и прогресивна панцитопенија која доводи до инсуфицијенције коштане сржи. У генетичкој основи Фанконијеве анемије налази се поремећај поправке ДНК оштећења, услед мутација у генима FA/BRCA сигналног пута. Предочено је да је у Србији најчешћа комплементациона група FA-D2. У потпоглављима „**ФА хелијски фенотип**“ и „**Значај испитивања ФА хромозомских прекида, теломера и радијалних хромозомских структура**“ подробно су описане цитогенетичке карактеристике ФА хелија: повећан број спонтаних и индукованих хромозомских прекида, чији се број повећава у одговору на ДНК алкилирајуће агенасе као што је диепоксибутан (ДЕБ), формирање радијалних хромозомских структура (радијала) и убрзано скраћивање теломера. У том контексту, показано је да је ФА погодан модел систем за проучавање хромозомских прекида и радијала. Истакнути су литературни подаци који показују да су у ФА хелијама хромозомски прекиди локализовани у регионима честих фрагилних места и да су другачији код различитих комплементационих група. У наредним потпоглављима „**ФА наслеђивање, гени, кандидат гени и мутације**“ и „**FANCD2 ген**“ концизно је представљен преглед мутација у ФА генима, са посебним акцентом на мутације у *FANCD2* гену и оскудност литературних података. Посебно је наглашен значај анализа мутација у ФА генима, како за потврду дијагнозе, тако и за пренатално тестирање и предикцију исхода хемиотерапије.

У поглављу **Циљеви** представљен је општи циљ докторске дисертације – молекуларно-цитогенетичка карактеризација FA-D2 хромозомских прекида и њихова колокализација са фрагилним местима, као и анализа мутација у *FANCD2* гену ради идентификовања прогностичких параметара болести. Из општег циља су изведени посебни који прецизно дефинишу правце спроведених истраживања.

Поглавље **Материјал и методе** садржи осам потпоглавља, кроз које је јасно и прецизно описана комплетна експериментална методологија коришћена у истраживању. У потпоглављу „**Узорци**“ описан је начин узорковања периферне крви FA-D2 пацијената, њихове узрасне и полне карактеристике, начин дијагностиковања и параметри на основу којих је утврђен стадијум болести. На основу тога пацијенти су разврстани у две групе: група А са тешком инсуфицијенцијом коштане сржи и група Б са умереном инсуфицијенцијом коштане сржи. Следећа три потпоглавља, „**Култура лимфоцита периферне крви и анализа хромозомских аберација**“, „**Техника инверзног ДАПИ бојења и ДАПИ трака**“ и „**Цитогенетичка анализа**“

приказују експерименталну процедуру успостављања краткотрајних култура лимфоцита периферне крви, препарације хромозома, прављења, бојења и анализе препарата. У наредна два потпоглавља, „*Молекуларно-цитогенетичка анализа хромозомских прекида*“ и „*Теломерни FISH*“, детаљно је описана експериментална процедура молекуларно-цитогенетичке анализе хромозомских прекида, радијала и теломера. У потпоглављу „*Секвенцирање FANCD2 гена*“ прецизно је описана изолација ДНК из примарних фибробласта коже пацијената, одабир региона *FANCD2* гена за секвенцирање и конструкција прајмера коришћењем биоинформатичких алата. Приказани су услови ланчане реакције полимеризације и провера добијених продуката гел електрофорезом, описан је начин пречишћавања продуката, секвенцирање и анализа резултата уз помоћ биоинформатичких програма, нарочито *in-silico* анализа за процену ефеката пронађених варијанти. Најзад, у потпоглављу „*Статистичка анализа*“ описане су статистичке процедуре коришћене за анализу добијених резултата.

Поглавље **Резултати** састављено је од пет потпоглавља. У потпоглављу „*Анализа хромозомских прекида у лимфоцитима перифере крви*“ представљени су резултати цитогенетичке анализе у нетретираним и ДЕБ третираним лимфоцитима. Показано је да је у базалном стању учесталост хромозомских прекида виша код пацијената са тешком инсуфицијенцијом, као и да је у ДЕБ третираним лимфоцитима виша учесталост прекида у односу на базално стање код обе групе пацијената. Резултати су показали да су код обе групе *q* крак и еухроматински региони хромозома чешће захваћени прекидима и представљени су хромозоми на којима су најчешће лоцирани прекиди. Детаљна молекуларно-цитогенетичка анализа најчешћих хромозомских прекида панелом ВАС-проба у потпоглављу „*Молекуларно-цитогенетичка карактеризација FA-D2 хромозомских прекида и поређење са регионима фрагилних места*“ показала је да се већина прекида обе групе налази у регионима честих фрагилних места, осим прекида у региону 1q42.2 код једног пацијента групе А. Истакнуто је да је локализација и учесталост појединачних хромозомских прекида различита код пацијената у различитим стадијумима болести. Код пацијената са тешком инсуфицијенцијом FRA2U, FRA3B, FRA3C, FRA5O, FRA5K, FRA7H, FRA14G и FRA18B су најчешћа фрагилна места, док су FRA1F, FRA1N, FRA3B, FRA3H, FRA7H, FRA16C и FRA16D најчешћа код пацијената са умереном инсуфицијенцијом коштане сржи. У наредном потпоглављу „*Анализа учесталости и структуре радијала и учешће теломера у њиховом настанку*“ показано је да је у

групи пацијената са тешком инсуфицијенцијом коштане сржи значајно виша учесталост радијала, углавном су присутни радијали који садрже теломерне секвенце и сложени радијали. Запажено је да је дистрибуција хромозома укључених у настанак радијала различита, али се радијали увек формирају између нехомологих хромозома и у њихов настанак укључени су и аутозоми и полни хромозоми. Резултати анализе теломера у потпоглављу „*Анализа теломерних фузија*“ указали су да је учесталост теломерних фузија значајно виша код пацијената са тешком инсуфицијенцијом коштане сржи, док не постоји значајна разлика у просечној дужини теломера две групе пацијената. Уједно је примећена велика хетерогеност у дужини теломера појединачних хромозома. Упоредном анализом хромозома у теломерним фузијама и дужине теломера појединачних хромозома установљено је да су хромозоми са најкраћим теломерама укључени у настанак теломерних фузија. Коначно, у потпоглављу „*Анализа мутација у одабраним регионима гена FANCD2*“ описане су све пронађене варијанте у гену и приказани су резултати *in-silico* анализе. Утврђено је присуство десет генских варијанти, од којих су три новооткривене (с.2396 C>A, с.206-246delG и с.2715+573 C>T). Већина варијанти је у дубоким интронским регионима и у хетерозиготном стању. *In-silico* анализа показала је да четири варијанте могу довести до поремећаја у механизму сплајсовања. Указано је да не постоји повезаност честих фрагилних места код FA-D2 пацијената и варијанти *FANCD2* гена.

У поглављу **Дискусија** разматрани су оригинални резултати истраживања који су упоређени са релевантним литературним подацима. Упоредна анализа резултата и литературних података написана је јасно и прецизно, сагледава и по редоследу одговара тематским целинама представљеним у резултатима. У првом делу дискусије разматрани су резултати цитогенетичке и молекуларно-цитогенетичке анализе FA-D2 хромозомских прекида. Уочена виша учесталост прекида на великим хромозомима и q краку хромозома одговара величини хромозома, док је већа заступљеност прекида у еухроматинским регионима у складу са претходним истраживањима код ФА пацијената и представља карактеристику ФА ћелијског фенотипа. Најчешћи хромозомски прекиди колокализују са честим фрагилним местима, што је такође сагласно са литературним подацима. Међутим, фрагилна места у FA-D2 лимфоцитима се разликују од фрагилних места код других комплементационих група што је објашњено посебном улогом *FANCD2* протеина у одржавању стабилности фрагилних места и чини их специфичним за FA-D2 комплементациону групу. Поред тога, са напредовањем болести не долази до промене учесталости прекида, али се мења њихова дистрибуција, што је

интерпретирано повећаном експресијом различитих гена у ћелијама коштане сржи као покушај ћелија да компензују прогресивну геномску нестабилност. У прилог томе, кандидаткиња истиче да су у регионима FA-D2 фрагилних места лоцирани гени који имају значајну улогу у контроли ћелијског циклуса, туморској супресији и очувању геномске стабилности. У наредном делу дискусије објашњавани су резултати анализе теломерних фузија и радијала. Значајно виша учесталост теломерних фузија која није праћена смањењем просечне дужине теломера је примећена код пацијената са тешком инсуфицијенцијом коштане сржи. Литературни подаци о вези између дужине теломера и степена инсуфицијенције коштане сржи су опречни, при чему бројна истраживања истичу да су најкраће теломере, а не њихова просечна дужина, критичне за ћелијско преживљавање. Овакво запажање је у складу са резултатима мерења дужине теломера појединачних хромозома које је показало да су хромозоми са најкраћим теломерама присутни у теломерним фузијама. Већи проценат теломерних фузија са напредовањем болести кандидаткиња објашњава повећаним бројем дволанчаних прекида у теломерним регионима због повећане геномске нестабилности и компензаторно убрзане пролиферације у хематопоетском ткиву што резултује убрзаним скраћивањем теломера и теломерним фузијама. Виша учесталост радијала код пацијената са тешком инсуфицијенцијом коштане сржи, нарочито оних који садрже теломерне секвенце, нови је литературни податак и објашњен је немогућношћу FA-D2 ћелија да поправе међуланчана ДНК оштећења, због чега настају ове аберантне структуре. Указано је да њихова учесталост може предвидети клинички ток болести. Присуство нехомологих хромозома у радијалима је у складу са актуелном литературом, док X хромозом у радијалима код ФА пацијената није до сада забележен и указује да у поправци међуланчаних ДНК оштећења хомологом рекомбинацијом ниједан хромозом није изузет. Најзад, у последњем тематском делу дискусије анализирани су детектоване варијанте у *FANCD2* гену и истакнут је значај анализе мутација како за дијагностику, тако и за процену ефеката терапије и предвиђања компликација болести. Од десет детектованих варијанти, већина се налази у интронским регионима, што је у сагласности са литературним подацима. Скоро све варијанте су у хетерозиготном облику, што такође одговара резултатима претходно објављених истраживања мутација код FA-D2 пацијената у другим популацијама. Прегледом литературе истакнуто је да су код FA-D2 пацијената хомозиготне мутације јако ретке, већ да су најчешће присутне сложене хетерозиготне које доводе до делимичне деградације протеина. Од три новооткривене варијанте, *in-silico* анализа је показала да две могу бити патогене (с.2396 C>A и с.206-246delG), као и пријављена варијанта с.990-38 C>G чији ефекти

функционалним анализама нису утврђени. Поређењем *in-silico* анализа и актуелних литературних података утврђено је да и дубоке интронске мутације насупрот пређашњим становиштима могу довести до поремећаја у механизму сплајсовања, стварања нефункционалног протеина и настанка болести. Патогене варијанте су пронађене код пацијената који нису у сродству, што указује на могући ефекат оснивачке мутације. Слична запажања забележена су у литератури и у другим популацијама, како за FA-D2, тако и за друге комплементационе групе. Запажено је да је код више пацијената пронађено по неколико варијанти, што указује на појачану осетљивост FA/BRCA сигналног пута и у складу је са објављеним резултатима других истраживања ФА.

У поглављу **Закључци** прецизно и концизно су представљени закључци који одговарају постављеним циљевима и изведени су из анализа експерименталних резултата. Закључено је да се базална учесталост хромозомских прекида повећава са прогресијом болести, док се ДЕБ индукована учесталост не мења. На молекуларно-цитогенетичком нивоу FA-D2 хромозомски прекиди колокализују са честим фрагилним местима и карактеристични су за FA-D2 комплементациону групу. Откривено је ново фрагилно место у региону 1q42.2. Образац и дистрибуција фрагилних места, учесталост радијала, нарочито оних који садрже теломерне секвенце, и теломерних фузија у FA-D2 лимфоцитима мењају се са прогресијом болести и могу бити прогностички фактор у праћењу тока болести. Закључено је да настајак теломерних фузија не зависи од просечне дужине теломера, већ од дужине теломера појединачних хромозома. Од свих детектованих варијанти у *FANCD2* гену, три су новооткривене (с.2396 C>A, с.206-246delG i с.2715+573 C>T). Углавном су присутне варијанте у хетерозиготном облику и у дубоким интронским регионима. *In-silico* анализом идентификоване су три патогене варијанте које су пронађене код пацијената који нису у сродству, што указује на то да би оне могле бити специфичне за популацију у Србији. Поред тога, како су код више пацијената пронађене бројне варијанте, може се закључити да су мутације у *FANCD2* гену конкомитантне и одражавају осетљивост FA/BRCA сигналног пута. Најзад, упоредна анализа варијанти *FANCD2* гена и фрагилних места у FA-D2 лимфоцитима довела је до закључка да не постоји њихова међусобна повезаност.

Поглавље **Литература** садржи листу од 235 библиографских јединица. Наведене научне публикације су савремене, тематски адекватне и коришћене су за опште разумевање садржаја докторске дисертације.

БИБЛИОГРАФИЈА

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Радови у часописима међународног значаја

1. **Filipović Tričković, J.**, Mandušić, V., Joksić, I., Vujić, D., Valenta Šobot, A., **M23**
Joksić, G. (2017) Genotyping Fanconi anemia patients from Serbia reveals three novel FANCD2 variants. *Genetika* 49(2):559-572.
<http://www.dgsgenetika.org.rs/abstrakti/vol49no2rad15.pdf>
2. **Filipović, J.**, Joksić, G., Vujić, D., Joksić, I., Mrasek, K., Weise, A., Liehr, T. **M23**
(2016) First molecular-cytogenetic characterization of Fanconi anemia fragile sites in primary lymphocytes of FA-D2 patients in different stages of the disease. *Molecular Cytogenetics* 9, 70.
<https://molecularcytogenetics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13039-016-0280-6>

Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Filipović, J.**, Leskovic, A., Valenta Šobot, A., Petrović, S., Vujić, D., Joksić, G. **M33**
(2014) High incidence of radial chromosomes in circulating lymphocytes predicts bone marrow failure in Fanconi anemia patient. V Congress of the Serbian Genetic Society, September 28th – October 2nd 2014, Kladovo, Serbia, ISBN 978-86-87109-11-7, pp. 63-69

МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Докторска дисертација кандидата Јелене Г. Филиповић Тричковић под насловом „Молекуларно-цитогенетичка карактеризација хромозомских прекида у лимфоцитима периферне крви пацијената оболелих од Фанконијеве анемије у различитим фазама болести“ представља оригинални научни допринос. Рад представља свеобухватно научно истраживање засновано на актуелним сазнањима из области молекуларне цитогенетике. Садржи прецизно дефинисане циљеве утемељене на добром познавању савремене литературе из дате научне области. Начин истраживања, примењене методе и анализа добијених резултата су актуелни и подробни и омогућавају боље разумевање фрагилних места и значаја њиховог испитивања у болестима хромозомских нестабилности као што је Фанконијева анемија. Са аспекта примене, добијени резултати ће омогућити правовремено препознавање прогресије болести употребом молекуларно-цитогенетичких метода. Посебно је значајно идентификовање мутација у *FANCD2* гену које су специфичне за популацију у Србији, што може омогућити потврду дијагнозе, пренатално и тестирање носилаца мутације.

Током израде дисертације, Јелена Г. Филиповић Тричковић је показала темељан приступ и самосталност у експерименталном раду, постављању циљева, анализи и интерпретацији добијених резултата.

На основу прегледане докторске дисертације и добијених резултата, Комисија закључује да је кандидаткиња успешно реализовала постављене циљеве кроз исцрпан и свеобухватан експериментални рад, те да дисертација испуњава све стандардне услове и критеријуме. Сходно томе, Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду прихватање позитивне оцене докторске дисертације „Молекуларно-цитогенетичка карактеризација хромозомских прекида у лимфоцитима периферне крви пацијената оболелих од Фанконијеве анемије у различитим фазама болести“ и одобрење јавне одбране докторске дисертације кандидаткињи Јелени Г. Филиповић Тричковић.

У Београду, 26.09.2018. године.

КОМИСИЈА:

др Гордана Јоксић, научни саветник
Универзитет у Београду - Институт за нуклеарне науке "Винча"

др Катарина Зељић, ванредни професор
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Марина Стаменковић-Радак, редовни професор
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

