

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На VII редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 10.05.2019. године, на основу молбе ментора, др Маје Стојиљковић и др Соње Павловић, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације Аните Г. Скакић, истраживача сарадника на Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду под насловом: „Геномски профил пацијената дечијег узраста са хепатичним гликогенозама: корелација генотипа и фенотипа и функционална карактеризација нових варијанти“, у саставу: др Маја Стојиљковић, виши научни сарадник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду, ментор; др Соња Павловић, научни саветник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду, ментор; проф. др Горан Брајушковић, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, члан; проф. др Светлана Радовић, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, члан; доц. др Маја Ђорђевић Милошевић, доцент, Медицински факултет, Универзитет у Београду, члан.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Аните Г. Скакић „Геномски профил пацијената дечијег узраста са хепатичним гликогенозама: корелација генотипа и фенотипа и функционална карактеризација нових варијанти“ представља оригинално истраживање које за тему има проучавање генетичке основе хепатичних гликогеноза у Србији, откривање нових варијанти у генима узрочницима као и успостављање новог модел система за изучавање гликогенозе тип Ib. Ова докторска дисертација урађена је у Лабораторији за молекуларну биомедицину Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду, у оквиру пројекта ”Ретке болести: молекуларна патофизиологија, дијагностички и терапијски модалитети и социјални, етички и правни аспекти (ИИИ 41004)”.

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, Садржај, Текст по поглављима, Списак литературе, Биографију аутора и Прилоге. Докторска дисертација написана је на 129 страна, садржи 46 слика и 27 табела. Дисертација је подељена на 7 поглавља: **Увод** (1-28 стране), **Циљеви** (29-31 стране), **Материјал и методе** (32-65 стране), **Резултати** (66-89 стране), **Дискусија** (90-109 стране), **Закључци** (110-113 стране) и **Литература** (114-129 стране). У прилозима се налазе: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације

Предмет докторске дисертације је геномско профилисање пацијената са хепатичним гликогенозама у Србији, функционална карактеризација нових генетичких варијанти као и анализа ефекта мутација у гену *SLC37A4* (енг. *Solute Carrier Family 37 Member 4*) на метаболички фенотип ради бољег разумевања патологије гликогенозе тип Ib. Докторска дисертација укључује и формирање новог *in vitro* модел система за проучавање улоге молекуларних маркера стреса ендоплазматичног ретикулума и апоптозе у патогенези гликогенозе тип Ib.

У поглављу **УВОД** разматрана су општа и савремена сазнања везана за хепатичне гликогенозе, као и за болести таложења гликогена (ГСД, енг. *Glycogen Storage Disease*) уопште. Описан је метаболички пут гликогена, преглед главних карактеристика различитих типова ГСД као и основни клинички и биохемијски параметри који служе за прелиминарно постављање дијагнозе. С обзиром да је ГСД тип I један од најчешћих облика хепатичних ГСД и да јасно одражава сложену патофизиологију поремећаја у метаболизму гликогена, детаљно су описане клиничке и метаболичке манифестације ове болести, улога маркера стреса ендоплазматичног ретикулума и апоптозе код губитка интрацелуларне продукције глукозе, као и терапијски приступи код ГСД тип I.

Поглавље **ЦИЉЕВИ** садржи јасно дефинисане циљеве овог истраживања. У Србији до сада није анализирана молекуларно-генетичка основа ГСД, па се циљеви првог дела студије односе на одређивање геномског профила пацијената са хепатичним ГСД, утврђивање спектра и учесталости варијанти у генима узрочницима ГСД, као и на одређивање стратегије за успостављање рутинске молекуларно-генетичке дијагнозе хепатичних ГСД у Србији. Циљеви другог дела студије односе се на функционалну карактеризацију новооткривених варијанти у генима узрочницима ГСД, као и на оптимизацију протокола за формирање *in vitro* модел система за испитивање улоге новооткривених варијанти у патогенези хепатичних ГСД. Трећи део ове дисертације имао је за циљ испитивање улоге молекуларних маркера стреса ендоплазматичног ретикулума и апоптозе на моделу *SLC37A4* дефицитарне бубрежне ћелијске линије ради бољег разумевања метаболичког фенотипа ГСД тип Ib повезаног са бубрежним компликацијама.

У оквиру поглавља **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** јасно су дефинисане групе педијатријских ГСД пацијента, као и контролна група испитаника. У студију је било укључено 41 пацијената суспектних на ГСД, као и 75 испитаника контролне групе из Србије. Детаљно су описане примењене методе базиране на реакцији ланчаног умножавања, коришћене за детекцију генетичких варијанти у генима узрочницима ГСД. Приказан је протокол за секвенцирање нове генерације, као и детаљна анализа података добијених са *Illumina MiSeq* апарата. Такође, описан је RT-qPCR есеј и остале методе потребне за анализу нивоа експресије гена *SLC37A4* код пацијената оболелих од ГСД тип Ib и контролних испитаника. Представљена је и технологија CRISPR/Cas9 и *knockin* приступ за прецизно едитовање хумане ембрионалне бубрежне ћелијске линије 293F1pIn (НЕК293F1pIn, енг. *Human Embryonic Kidney cell line 293F1pIn T-REx*). Такође, приказане су методе за детекцију стреса ендоплазматичног ретикулума и апоптозе у новом *in vitro* модел систему за ГСД тип Ib које су укључивале анализу експресије молекуларних маркера стреса и апоптозе, као и анализу пролиферације и вијабилности клоналних ћелијских линија МТТ тестом. Методе за статистичку обраду резултата су такође представљене. Списак свих прајмера и ћелијске линије коришћене у изради ове дисертације, наведени су у оквиру овог поглавља.

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ** кандидаткиња је изложила добијене резултате спроведеног истраживања у три дела.

Први део овог поглавља односи се на геномско профилисање пацијената суспектних на ГСД у Србији. Приказана је молекуларно-генетичка карактеризација укупно 41 пацијената суспектних на ГСД. Утврђено је да је 5 оболело од ГСД тип Ia, 31 од ГСД тип Ib, по један пацијент од ГСД тип III, VI и IXa. Такође, код два пацијента који су били суспектни на ГСД, употребом технологије секвенцирања нове генерације утврђено је да не постоји генетички дефект у генима узрочницима ГСД и истовремено су идентификоване патогене варијанте у генима узрочницима болести накупљања холестерол естара и *Shwachman-Bodian-Diamond* синдрома. У оквиру ове студије идентификоване су 4 нове варијанте у гену *SLC37A4* (p.Gly83Glu, p.Gly135Asp, p.Pro191Ser и p.Ser263Glyfs*33), за које је показано да до сада нису биле пријављене у различитим базама података као ни у доступној литератури. Свеобухватном молекуларно-генетичком анализом 41 пацијената суспектних на хепатичне ГСД из Србије, постигнута је 100 % успешност детекције патогених варијанти, чиме је омогућена рана примена одговарајуће терапије специфичне за генотип пацијента.

Други део резултата овог истраживања односи се на функционалну карактеризацију новооткривених варијанти у кодирајућем региону гена *SLC37A4*. Биоинформатичка предикција недвосмислено је указала на патогени ефекат свих нових варијанти. У овој студији детаљно су анализирани варијанте p.Gly83Glu и p.Ser263Glyfs*33 у гену *SLC37A4*, јер су биле детектоване код више од једне породице. Експресионе студије варијанте p.Ser263Glyfs*33 потврдиле су да ова промена креира нови пригушивач места сплајсовања егзона 5 што доводи до транскрипције *SLC37A4* iRNK краће за 86 нт (r.785_870del86), а самим тим и синтезе краћег нефункционалног протеина. Резултати функционалне анализе, као и клинички подаци пацијената, потврђују да је варијанта p.Ser263Glyfs*33 у гену *SLC37A4* патогена промена која доводи до развоја ГСД тип Ib. Такође, оптимизован је протокол за прецизно едитовање генома употребом технологије CRISPR/Cas9 и формиран је нови *in vitro* модел систем за ГСД тип Ib. Приступом *knockin* уведена је новооткривена хумана варијанта p.Gly83Glu у ген *SLC37A4* бубрежне ћелијске линије HEK293FpIn која је употребљена за функционалну карактеризацију ове варијанте и испитивање њене улоге у патогенези ГСД тип Ib. Експресионе студије показале одсуство експресије гена *SLC37A4* у ћелијској линији HEK293FpIn која је хомозиготни носилац хумане варијанте p.Gly83Glu у гену *SLC37A4*, што сугерише да ова промена нарушава стабилност прекурсора *SLC37A4* iRNK и резултује њеном деградацијом. Резултати функционалне анализе, као и клинички подаци пацијената, потврдили су њен патогени ефекат чиме је доказано да варијанта p.Gly83Glu доводи до развоја ГСД тип Ib.

Последњи део поглавља **РЕЗУЛТАТИ** представља анализу маркера стреса ендоплазматичног ретикулума и апоптозе у новом *in vitro* модел систем за ГСД тип Ib. Добијени резултати показују да је хумана варијанта p.Gly83Glu у гену *SLC37A4* у ћелијској линији HEK293FpIn одговорна за развој хроничног стреса ендоплазматичног ретикулума, поремећене пролиферације и повишене апоптозе, што додатно потврђује њен патогени ефекат и делимично објашњава поремећај функције бубрега код особа оболелих од ГСД тип Ib.

У поглављу **ДИСКУСИЈА**, добијени резултати су критички дискутовани у светлу најновијих податка из литературе везаних за молекуларну основу хепатичних ГСД. Изнета су оригинална разматрања поткрепљена постојећим подацима и најновијим експерименталним доказима. Дискусија је подељена на три целине. У првом делу дискутоване су опште

карактеристике анализиране групе пацијената и посебно значај гена детектованих у анализираној кохорти од 41 пацијента из Србије. Анализирана је корелација генотипа и фенотипа код пацијената оболелих од ГСД тип I из Србије у односу на податке доступне из литературе. Пажња је посвећена стратегији за успостављање рутинске прецизне молекуларно-генетичке дијагнозе код пацијената суспектних на хепатичне ГСД. У другом делу дискутовани су резултати функционалне карактеризације новооткривених варијанти у гену *SLC37A4* код ГСД тип Ib пацијената из Србије. У трећем делу дискутовани су молекуларни механизми стреса ендоплазматичног ретикулума и апоптозе и њихове повезаности са бубрежним компликацијама код пацијената са ГСД тип Ib. Акцент је стављен на нови *in vitro* ГСД тип Ib модел систем који би могао бити користан за проучавање патогенезе болести и потенцијалних таргета за молекуларну терапију дизајнирану да коригује метаболичке абнормалности повезане са дисфункцијом бубрега код ГСД тип Ib пацијената.

У поглављу ЗАКЉУЧЦИ, јасно је изнето 14 закључака који у потпуности произилазе из добијених резултата.

У поглављу БИБЛИОГРАФИЈА, наведен је списак од 242 цитираних страних и домаћих научних часописа и књига. Коришћена литература је адекватна, актуелана и довољно широка да покрива све аспекте истраживања. Навођење литературе у самом тексту дисертације је примерена и по садржају и по месту.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

- 1) **Skakic A**, Djordjevic M, Sarajlija A, Klaassen K, Tomic N, Kecman B, Ugrin M, Spasovski V, Pavlovic S, Stojiljkovic M. Genetic characterization of GSD I in Serbian population revealed unexpectedly high incidence of GSD Ib and 3 novel SLC37A4 variants. *Clin Genet*. 2018 Feb;93(2):350-355. doi: 10.1111/cge.13093. (M22) IF (3.512/2017)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28685844>
- 2) **Skakic A**, Andjelkovic M, Tomic N, Klaassen K, Djordjevic M, Pavlovic S, Stojiljkovic M. CRISPR/Cas9 genome editing of SLC37A4 gene elucidates the role of molecular markers of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in renal involvement in glycogen storage disease type Ib. *Gene*. 2019 Apr 3;703:17-25. doi: 10.1016/j.gene.2019.04.002. (M22) IF (2.498/2017)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30951856>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

- 1) **A Skakic**, K Klaassen, J Kostic, M Djordjevic, A Sarajlija, B Kecman, V Spasovski, M Andjelkovic, M Vreca, S Pavlovic, M Stojiljkovic. Molecular characterization of mutations in Serbian patients with glycogen storage diseases - an NGS approach. "OMICs in Biomedical Research" at the Mediterranean Institute for Life Sciences (MedILS), 8 th – 12 th June, 2015, Split, Croatia. Abstract book: p83-84. (M34)

- 2) A Skakic, K Klaassen, J Kostic, M Djordjevic, A Sarajlija, B Kecman, N Kotur, B Stankovic, S Srzentic, S Pavlovic, M Stojiljkovic. Molecular characterization of mutations in Serbian patients with glycogen storage diseases. SSIEM 2015 Annual Symposium, 1 st -4 th . September, 2015, Lyon, France. Abstract book: p-309. **(M34)**
- 3) Skakić A, Đorđević M, Sarajlija A, Klaassen K, Tošić N, Kecman B, Ugrin M, Spasovski V, Pavlović S, Stojiljković M. Precision molecular diagnostic of hepatic GSD revealed unexpectedly high incidence of gsd ib in serbian population and three novel variants in the SLC37A4 gene. 1st Congress of Molecular Biologists of Serbia, Belgrade, Serbia, 2017. Abstract book: page 164. **(M34)**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

- 1) Sarajlija A, Đorđević M, Stojiljković M, Kecman B, Skakić A, Pavlović S. Kliničke karakteristike i genotip bolesnika sa glikogenozom tip 1. 47. Pedijatrijski dani Srbije, 6-8. oktobar 2016, Nis, Srbija. **(M64)**

Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација кандидаткиње **Аните Г. Скакић**, под насловом „**Геномски профил пацијената дечијег узраста са хепатичним гликогенозама: корелација генотипа и фенотипа и функционална карактеризација нових варијанти**“ представља оригинално истраживање које за тему има проучавање генетичке основе хепатичних гликогеноза, откривање нових варијанти у генима узрочницима као и успостављање модел система за изучавање ових болести. Теза се одликује јасно дефинисаним циљевима и адекватно планираним и успешно реализованим истраживачким поступком. Остварени резултати објављени су у оквиру два оригинална научна рада, што потврђује актуелност и значајност добијених резултата. Такође, текст дисертације је прошао проверу оригиналности.

На основу увида у експериментални рад, постигнуте резултате, као и написану докторску тезу, Комисија закључује да су задаци постављени у циљевима испуњени, тако да позитивно оцењује докторску тезу и има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета, Универзитета у Београду, да прихвати позитивну оцену докторске дисертације Аните Г. Скакић и омогући кандидаткињи јавну одбрану рада.

КОМИСИЈА:

У Београду, 13.05.2019. године

др Маја Стојиљковић, виши научни сарадник,
Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство,
Универзитет у Београду, ментор

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

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

др Светлана Радовић, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду,
члан

др Маја Ђорђевић Милошевић, доцент, Медицински факултет, Универзитет у Београду,
члан