

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА  
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

На V редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 08.03.2019. године, прихваћен је извештај ментора др Весне Спасовски и др Соње Павловић, о урађеној докторској дисертацији Марине З. Анђелковић, истраживача сарадника на Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство у Београду, под насловом: **“Геномски профил пацијената дечијег узраста са примарном цилијарном дискинезијом: корелација генотипа и фенотипа и функционална карактеризација нових генетичких варијанти”** и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Весна Спасовски, 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 Предраг Минић, редовни професор, Медицински факултет, Универзитет у Београду, члан. Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

**ИЗВЕШТАЈ**

**1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ**

Докторска дисертација Марине Анђелковић **“Геномски профил пацијената дечијег узраста са примарном цилијарном дискинезијом: корелација генотипа и фенотипа и функционална карактеризација нових генетичких варијанти”** представља оригинално истраживање које за тему има проучавање генетичке основе примарне цилијарне дискинезије, откривање нових варијанти у генима узрочницима и генима кандидатима као и успоставање модел система за њено изучавање. Ова докторска дисертација је урађена 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 и Прилоге. Докторска дисертација написана је на 138 страница, садржи 24 слике и 17 табела. Дисертација је подељена на 7 поглавља: **Увод** (1-26 страна), **Циљ рада** (27-29 страна), **Материјал и методе** (30-59 страна), **Резултати** (60-94 страна), **Дискусија** (95-117 страна), **Закључци** (118-121 страна) и **Списак литературе** (122-138 страна). У прилозима се налазе: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу.

## 2. АНАЛИЗА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

**Увод** ове докторске дисертације је састављен из шест целина.

У првом делу је описана биогенеза и основна структура цилија као ћелијских органела присутних на бројним ћелијама еукариота, дефинисана је аксонема као структурна и функционална јединица цилија и флагела. Дата је подела цилија код кичмењака према структури и функцији, описани механизми кретања и транспорт унутар цилија. Представљени су микротубуларни протеини одговорни за кретање самих цилија.

У другом делу је описан настанак цилиопатија као последица промена у структури и функцији цилија, уведена основна подела цилиопатија на сензорне и моторне и дат увид у разлике међу њима.

Треће поглавље је обухватило представљање примарне цилијарне дискинезије (ПЦД) кроз њен историјат, и дат је клинички опис промена код пацијента. Дат је увид у сличности и разлике између сензорних и моторних цилиопатија, као и преглед одлика педијатријских обољења са преклапајућим симптомима.

У четвртном поглављу је акценат дат на комплексну генетичку основу ПЦД. Објашњена је улога гена који кодирају протеине спољашњих и унутрашњих динеинских ручица, гена који кодирају протеине радијалних структура, гена који кодирају за протеине регулаторног комплекса нексин-динеин, као и гена одговорних за промене у цилијарном кретању када је ултраструктура цилија непромењена.

Пето поглавље обухватило је преглед гена који се налазе у основи процеса цилиогенезе и формирања мултицилијарних ћелија. Описани су гени који су кључни у овом вишестепеном процесу који траје различит временски период код различитих ћелијских типова. Као резултат њихове правовремене и синхронизоване акције формирају се потпуно диференциране пост-митотичке ћелије са бројним цилијама на својој апикалној површини.

Шесто поглавље обухватило је анализу цилијарне покретљивости и улогу коју циклични аднозин монофосфат (сАМР) може да има у томе. Представљени су могући механизми којима би овај

молекул могао да оствари своје дејство у ћелијама, а нарочито је анализиран аспект његове примене за покретање слабо покретних цилија преко протеин киназе зависне од сАМР-а.

У поглављу **Циљеви рада** јасно су дефинисани главни научни циљеви докторске дисертације. Они су подељени у две групе циљева. У првој групи циљева дефинисани су циљеви везани за геномско профилисање пацијената са примарном цилијарном дискинезијом и функционалну карактеризацију новооткривених варијанти.

Истраживања везана за овај циљ су обухватила:

1. Развој генетичког алгорита, који би осим описаних патогених генетичких варијанти и гена узрочника, обухватао и новооткривене варијанте у кодирајућим регионима гена узрочника ПЦД-а и гена кандидата за ПЦД. Развој оваквог алгорита би омогућио прецизно и правовремено успостављење дијагнозе ПЦД-а и предикцију тежине болести код појединачних пацијената.
2. Развој стратегије за диференцијалну дијагнозу ПЦД-а и других болести плућа суспектних на цилиопатије који се клинички манифестују као ПЦД, која би омогућила већу стопу детектованих мутација и успостављених дијагноза.
3. Функционална карактеризација новооткривених патогених варијанти у већ познатим генима који су одговорни за развој ПЦД-а и/или у генима који до сада нису асоцирани са ПЦД-ом, а који би могли да доведу до уоченог фенотипа код пацијента.

Обзиром да је главна одлика ПЦД пацијената структурна и/или функционална промена на цилијама, па су оне непокретне, слабо покретне, промењен им је образац кретања или одсуствују, постављена је друга група циљева. У оквиру ње су постављени следећи циљеви који су обухватили успостављање модел система за тестирање малих молекула као потенцијалних терапеутика за ПЦД ради регулисања промењене брзине кретања цилија:

1. Оптимизација протокола за култивацију хумане плућне епителне ћелијске линије А549 у циљу диференцијације у цилијарну ћелијску линију, која би послужила као модел систем за функционалну карактеризацију нових варијанти и дејства потенцијалних терапеутика.
2. Анализа профила експресије маркера за цилиогенезу (*RFX3*, *FOXJ1*, *CCNO*, *MCIDAS*, *GEMC1* i *NOTCH1*) у различитим временским тачкама (од 0. дана до 15. дана) у циљу праћења процеса цилиогенезе у ћелијској линији А549.
3. Оптимизација дозе и начина апликације сАМР -а за третман базалне ћелијске линије А549, као и диференцираних цилијарних ћелија у различитим временским интервалима; анализа утицаја примењеног молекула на активацију протеин киназе зависне од сАМР-а (ПКА) и нисходну фосфорилацију серина; анализа утицаја на фреквенцију кретања цилија у циљу испитивања његовог потенцијалног терапеутског дејства.

У оквиру поглавља **Материјал и методе** описане су савремене методе молекуларне генетике коришћене у реализацији наведених циљева. У потпоглављу Испитаници описан је биолошки материјал коришћен у овом раду: у истраживању које је обухватало геномско профилисање пацијената суспектних на ПЦД, био је укључен 21 пацијент, док се контролна група испитаника састојала од 69 особа са територије Србије, чији су геномски профили, добијени истом методологијом, коришћени ради утврђивања фреквенције детектованих варијанти и за елиминацију популационо специфичних варијанти које нису потенцијални узрочници болести. У делу истраживања које је обухватало молекуларну карактеризацију новооткривене варијанте у гену узрочнику ове болести *DNAI1*, била су укључена два пацијента у сродству (рођене сестре) код којих је генетичка варијанта детектована, њихови родитељи и 11 здравих контрола. Родитељи ових пацијената су анализирани ради потврде статуса носиоца генетичке варијанте. У истраживању које је обухватило дизајнирање генетичког алгорита за лакше и брже успостављање прецизне дијагнозе ПЦД-а, као и за успостављање дијагнозе код пацијената чији је геномски профил указао на неку другу педијатријску болест, додатно је коришћен биолошки материјал 8 здравих чланова породице у циљу идентификације обрасца наслеђивања детектованих варијанти. Студија је изведена уз одобрење Етичког одбора Института за здравствену заштиту мајке и детета ”др Вукан Чупић”.

Сви прајмери, пробе, антитета и ћелијске линије коришћени у изради ове дисертације, наведени су у оквиру овог поглавља.

Описана је метода секвенцирања нове генерације (НГС) коришћена за геномско профилисање пацијената. Приказан је „*TruSight One*“ панел који подразумева истовремено секвенцирање ~62.000 егзона (~ 12Mb), односно укупно 4813 гена за које је претходно показана повезаност са различитим обољењима (тзв. Клинички егзом). Детаљно је приказана обрада резултата коришћењем софтвера *IlluminaVariant Studio* верзија 2.0 и 3.0 класичним приступом одабиром одређених филтера. Посебан сегмент посвећен је одабиру гена од интереса за ПЦД, као и гена који су били анализирани у складу са симптомима сваког појединачног пацијента. Детаљно су наведени програми за валидацију детектованих варијанти.

Описане су методе за изолацију ДНК из периферне крви, изолацију моноклеарних ћелија из периферне крви и изолацију РНК из моноклеарних ћелија. Дат је опис метода коришћених за детекцију генетичких варијанти, као што су *PCR* анализа и анализа ДНК на агарозном гелу, секвенцирање *PCR* продукта методом по Сангеру. Представљена је метода реверзне транскрипције и метода коришћена за праћење експресије гена у реалном времену „*real-time*“ *PCR* (RT-qPCR) метода. Приказане су основне технике релативне квантификације експресије гена (апсолутна и

релативна) и приказана техника провере ефикасности прајмера коришћених за релативну квантификацију гена *DNAII*.

У посебном поглављу изнете су методе за изолацију целокупних ћелијских протеина и мерење њихове концентрације методом по Брадфорду. Приказана је метода SDS полиакриламидна гел електрофореза као метода за раздвајање протеина према молекулској маси. Затим је дато објашњење Western blot методе која је коришћена за детекцију протеина *DNAII*.

Посебно су дате *in silico* методе за моделовање терцијарне структуре протеина *DNAII* и његову *in silico* транслацију, као и методе за анализу еволутивне конзервираности протеина *DNAII*. Анализа секундарних РНК структура вршена је помоћу одређених софтвера приказаних у посебном одељку овог дела тезе.

У последњем сегменту описано је успостављање ћелијског модел система за тестирање малих молекула као потенцијалних терапеутика за ПЦД. Приказани су услови за гајење и диференцијацију базалне ћелијске линије А549 у цилијарну ћелијску линију. Затим је приказана анализа профила експресије маркера цилиогенезе методом RT-qPCR. Приказана је оптимизација апликације молекула сАМР пермеабилитетом ћелијске мембране коришћењем глицерола у циљу уласка сАМР у ћелију, као и детекција фосфорилације нисходних циљних протеина.

У поглављу **Резултати**, у четири поглавља су приказани резултати добијени истраживањем уз приказ слика и табела са одговарајућим коментарима и објашњењима.

Прво поглавље обухватило је резултате геномског профилисања пацијената суспектних на ПЦД. У првом потпоглављу дат је опис демографских параметара групе испитаника састављене од 21. пацијента и 8 чланова породица, и представљене су клиничке карактеристике пацијената. Кохорта пацијената састојала се од 11 пацијената мушког и 10 пацијената женског пола.

Друго потпоглавље обухватило резултате анализе генетичке основе пацијената суспектних на ПЦД методом секвенцирања нове генерације. Укупно је детектовано између 7.000 и 9.000 варијанти по пацијенту. Након подешавања параметара да детектују промене чија је учесталост мања од 5%, број варијанти смањено се на 100 по пацијенту. Затим је извршена приоритизација гена узрочника и гена кандидата за ПЦД и гена који припадају истој фамилији, што је свело број гена за анализу на 29. Како је ПЦД болест која се наслеђује рецесивно, за анализу је употребљен рецесивни модел наслеђивања који је обухватио хомозиготне варијанте, хетерозиготне варијанте у истом гену (*compound* хетерозиготи), као и хетерозиготне варијанте у два гена (транс-алелски хетерозиготи). Анализом 29 гена укупно је детектовано 2210 генетичких варијанти, које су потом потражене у генетичким профилима 69 испитаника опште популације са територије Србије. Анализом испитаника из опште популације одбачене су популационо специфичне варијанте које нису узрочници болести, као и све преклапајуће варијанте између пацијената и испитаника. Финално је

детектовано 18 патогених генетичких варијанти у генима узрочницима и генима кандидатима за ПЦД и оне се могу сматрати генетичким узрочницима ове болести. Код 3 пацијента детектоване су хомозиготне варијанте, удружене хетерозиготне варијанте су пронађене код 4 пацијента, транс-алелске хетерозиготне варијанте су детектоване код 2 пацијента и три моноалелске варијанте су детектоване код 3 пацијента. Детектоване варијанте су потврђене секвенцирањем по Сангеру, док је сегрегациона анализа урађена код три породице за које су били доступни чланови породице. Овим приступом утврђена је генетичка основа ПЦД код 11 анализираних пацијената. У следећем делу дат је опис и значај ови пронађених варијанти.

У другом поглављу приказан је алгоритам примењен код пацијената код којих претходним приступом нису детектоване варијанте у генима релевантним за ПЦД. Код 3 неразјашњена пацијента пронађене су патогене моноалелске варијанте у генима узрочницима за ПЦД. Додатно је анализирано још 45 гена асоцираних са специфичним симптомима код пацијената и 19 гена који су узрочници сензорних цилиопатија. Помоћу овог приступа успостављена је дијагноза код још 6 пацијената. Тиме је остала неразјашњена генетичка основа за једног пацијента. У следећем делу дат је опис и значај ових пронађених варијанти.

У трећем поглављу приказани су резултати добијени функционалном карактеризацијом нове варијанте c.947\_948insG, p.Thr318TyrfsTer11 у гену *DNAI1*, пронађене код две рођене сестре. Сегрегационом анализом је утврђено да су родитељи хетерозиготни носиоци ове генетичке варијанте. Анализиран је експресиони профил гена *DNAI1* и установљено је да је и код родитеља и код деце ниво експресије овог гена нижи него код контролних узорака. Western blot анализа је показала присуство траке у нивоу комплетног протеина од 699 аминокиселина, што није очекиван резултат, обзиром да инсерција једног нуклеотида c.947\_948insG мења оквир читања секвенце и уводи превремени стоп кодон након 11 аминокиселина. Истом методом је установљено да је количина мутираног p.Thr318TyrfsTer11 *DNAI1* протеина била је мања у односу на количину протеина детектованог код родитеља и код позитивне контроле.

У наредном потпоглављу дато је могуће објашњење присуства протеина у пуној дужини код пацијената. Урађено је *in silico* моделовање неизмењеног и мутираног протеина и анализирана конзервираност овог региона код неколико несродних врста. Ове анализе су показале да је аминокиселина треонин на позицији 318 еволутивно конзервисана код испитиваних врста, што указује на њен значај. *In silico* транслација је показала да се при транслацији мутираног протеина након инсерције нуклеотида Г и увођења првог превременог УГА стоп кодона, низводно налази још 16 стоп кодона, који су сви по типу УГА стоп кодони. Анализом секундарне структуре 3'UTR региона РНК гена *DNAI1* установљено је да је слободна енергија секундарне структуре РНК транскрипта гена *DNAI1* била најприближнија слободној енергији секундарне структуре РНК

селенопротеина П (dG = -16), који је једини познати селенопротеин у коме *SECIS* елементи читају вишеструке УГА стоп кодоне и уводе аминокиселину селеноцистеин.

У четвртом поглављу ове секције приказани су резултати који су се односили на успостављање модел система за диференцијацију базалне ћелијске линије A549 у цилијарну. Установљени су услови за култивацију ћелија, а како се цилије нису могле уочити након 15 дана од почетка култивације на *transwell* мембранама, праћен је ниво експресије маркера цилиогенезе. Установљено је да маркери цилиогенезе прате очекивани профил експресије у различитим временским фазама диференцијације.

У последњем потпоглављу приказани су резултати третмана ћелијске линије A549 сАМР-ом. Детекцијом фосфорилисаних серина у целокупним ћелијским протеинима је утврђено да је степен фосфорилације био већи у свим третираним узорцима без обзира на примењену дозу сАМР у односу на нетретирану узорак, а утврђен је и временски профил овог догађаја.

У поглављу **Дискусија**, добијени резултати су критички дискутовани у светлу најновијих података из литературе везаних за молекуларну основу примарне цилијарне дискинезије. Изнета су оригинална разматрања поткрепљена постојећим подацима и најновијим експерименталним доказима. Дискусија је подељена на три целине.

У првом делу дискутоване су опште карактеристике анализираних групе пацијената и посебно значај гена детектованих у анализираној кохорти од 21 пацијента.

У другом делу добијени резултати су дискутовани у светлу података доступних из литературе. Пажња је посвећена стратегији за успостављање дијагнозе код пацијената код којих нису детектоване варијанте у ПЦД генима, а нарочито новооткривеним варијантама у генима кандидатима за ПЦД. Такође, разматран је алгоритам који укључује и гене који су повезани са појединачним симптомима појединих пацијената, захваљујући чијој анализи је успостављена дијагноза код 28.57 % пацијената из анализираних кохорте пацијената.

У овом делу је дискутована студија функционалне карактеризације нове варијанте с.947\_948insG, детектоване у егзону 9 гена *DNAI1* код две рођене сестре. Ова генетичка варијанта доводи до промене оквира читања секвенце гена *DNAI1* и уводи превремени УГА стоп кодон 33 нуклеотида нисходно од места инсерције гуанина. На транскрипцијском нивоу је показано да је иРНК гена *DNAI1* која садржи превремени стоп кодон мање експримирана од неизмењеног транскрипта гена. Претпоставка је да је мутирани транскрипт обележен за деградацију путем NMD (енг. *Nonsense-mediated mRNA decay*), али како овај механизам није подједнако ефикасан у свим ћелијским типовима, одређена количина транскрипта је и даље присутна у анализираним узорцима. Анализа протеина *DNAI1* који садржи промену p.Thr318TyrfsTer11 показала је присуство протеина комплетне дужине од 699 аминокиселина код пацијената упркос присуству превременог УГА стоп

кодона и уоченом клиничком фенотипу код носиоца ове варијанте. Овом резултату посвећено је посебно потпоглавље у Дискусији.

Трећи део био је посвећен дискусији резултата добијених диференцијацијом базалне ћелијске линије А549 у цилијарну ћелијску линију и третману ове ћелијске линије молекулом сАМР. Истакнуто је да је ово прва студија која је имала за циљ изучавање процеса цилиогенезе у аденокарциномској базалној ћелијској линији А549. Дискутоване су могућности да се овај модел систем искористи за изучавање третмана различитим малим молекулима у циљу подстицања цилија на кретање.

У поглављу **Закључци**, на јасан начин је изнето више закључака који у потпуности произилазе из добијених резултата. У складу са приказаним резултатима, закључци су подељени у три целине:

Како је први део ове студије имао за циљ геномско профилисање пацијената са примарном цилијарном дискинезијом (ПЦД) и функционалну карактеризацију новооткривених варијанти, на основу добијених резултата изведени су следећи закључци:

1. Анализом резултата геномског профилисања 21. пацијента са клиничком презентацијом примарне цилијарне дискинезије успостављена је генетичка основа ПЦД код 52.38% анализираних пацијената са територије Србије. Патогене генетичке варијанте су детектоване у генима узрочницима (*CCDC40*, *DNAI1*, *DNALI1*, *DNAH5*, *DNAH11* и *LRRC6*) као и у генима кандидатима (*SPAG16* и *SPAG17*) за ПЦД. Укупно је детектовано 18 патогених генетичких варијанти, од којих је 12 (66.67%) новооткривено у нашој кохорти пацијената.
2. Формирана је стратегија за диференцијалну дијагностику ПЦД пацијената и других пацијената са сличном клиничком презентацијом болести, али без патогених промена у генима одговорним за ПЦД. Стратегија је обухватила анализу 93 гена, а патогене генетичке варијанте су детектоване у следећим генима: *ABCA3*, *CFTR*, *MUC2*, *SCNN1A* и *SLC26A9*. Укупно је детектовано 6 патогених генетичких варијанти, од којих је 5 (83.33%) новооткривено у нашој студији. Ови гени одговорни су за развој изолованих бронхиектазија, неонаталног респираторног дистрес синдрома и атопичне астме. Примена овакве стратегије омогућила је да стопа детекције мутација достигне 95% и да се стопа успостављених дијагноза повећа на 80.95%.
3. Примарна цилијарна дискинезија са 52.38% заступљености је најзаступљенији поремећај међу анализираним пацијентима, а затим следе бронхиектазије без цистичне фиброзе са 19% и неонатални респираторни дистрес синдром и астма са по 5% заступљености. Процент пацијената са патогеним моноалелским варијантама у ПЦД генима узрочницима износи 14%, док је један пацијент остао без генетичке потврде клиничког фенотипа.
4. Структурне и/или функционалне промене у спољашњим динеинским ручицама (ODA) узроковане патогеним генетичким варијантама у генима који кодирају компоненте ODA, одговорне



су за 55.55% уоченог фенотипа код ПЦД пацијената из анализираних кохорте, а ген *DNAH5* је најчешће био погођен патогеним генетичким варијантама (27.77%) у нашој популацији.

5. Функционално је окарактерисана новооткривена хомозиготна варијанта c.947\_948insG, детектована у екзону 9 гена *DNAH5*, која доводи до мењања оквира читања секвенце гена и уводи превремени УГА стоп кодон 33 нуклеотида нисходно од места инсерције гуанина. На основу резултата функционалних и *in silico* анализа показано је да инсерција нуклеотида Г доводи до увођења 17 превремених УГА стоп кодона за које постоји претпоставка да су замењени аминокиселином селеноцистеином. Уградњом селеноцистеина објашњава се имунодетекција комплетног протеина *DNAH5*, али са измењеном аминокиселинском секвенцом која онемогућава функционалност протеина услед нарушених позиција у полипептидном ланцу за интеракције протеин-протеин. Имајући све ово у виду, као и клиничку слику пацијената код којих је патогена генетичка варијанта детектована, може се закључити да је p.Thr318TyrfsTer11 промена у протеину *DNAH5* заправо патолошка промена која доводи до развоја примарне цилијарне дискинезије.

Како је други део ове студије обухватио оптимизацију протокола за диференцијацију базалне плућне ћелијске линије у цилијарну ћелијску линију и тестирање малих молекула као потенцијалних терапеутика за ПЦД, добијени резултати довели су до следећих закључака:

1. Оптимизовани су услови (оптимална густина ћелија, време адхеренције и конфлуентност) за пропацију ћелијске линије A549 на *transwell* мембранама. Ћелијска линија A549 је у оптимизованим условима култивисана 15 дана у циљу активације процеса цилиогенезе и диференцијације у мултицилијарне ћелије, али цилије под микроскопом нису уочене.

2. Анализом експресионих профила маркера цилиогенезе *NOTCH1*, *GEMC1*, *MCIDAS*, *CCNO*, *RFX3* и *FOXJ1* у различитим временским интервалима и упоређивањем са литературним подацима, утврђени су временски оквири одвијања различитих фаза процеса цилиогенезе у ћелијској линији A549.

а) Експресиони нивои анализираних маркера цилиогенезе пореклом из ћелијске линије A549 указују да се ова ћелијска линија 3. дана култивације у ALI систему налази у фази *de novo* дупликације центриола (нивои експресије гена *FOXJ1*, *MCIDAS*, *GEMC1* и *CCNO*) процеса цилиогенезе. Повишен ниво експресије гена *CCNO* пореклом из ћелијске линије A549 измерен након 10. дана култивације у генезе пореклом из ћелијске линије A549 указују да се ова ћелијска линија 3. дана култивације у ALI систему указује да се ова ћелијска линија налази у фази асемблирања центриола на апикалну мембрану ћелија, процеса цилиогенезе. Повишени нивои експресије гена *RFX3* и *FOXJ1* након 15 дана култивације ћелијске линије A549 у двофазној средини указују да се анализирана ћелијска линија налази у касној фази формирања деутеросома и асемблирања базалних тела на апикалну мембрану ћелија A549, процеса цилиогенезе.

б) Резултат квантификационе анализе гена *NOTCH1* није пратио очекивани профил експресије који би указивао на његову инхибицију и последичну активацију нисходних гена. Како су нисходни маркери цилиогенезе *MCIDAS* и *GEMC1* активирани, претпоставка је да се инхибиција гена *NOTCH1* догодила у првим сатима овог процеса, који нису обухваћени овим испитивањима. На основу овог резултата може се закључити да временски оквир детекције експресије *NOTCH1* није био адекватан и да је потребно анализирати ниво експресије овог гена у првим сатима култивације ћелијске линије А549 у АLI систему. Нагли пораст експресије овог гена након 15 дана култивације у АLI систему детектован је само у нашој студији, што сугерише да ген *NOTCH1* регулише још неке фазе цилиогенезе у ћелијској линији А549.

ц) На основу обједињених резултата експресионих профила анализираних маркера цилиогенезе, може се закључити да је ћелијска линија А549 започела процес цилиогенезе, да је рана фаза формирања деутеросома (амплификација центриола) завршена и да је ћелијска линија А549 ушла у касну фазу формирања деутеросома у којој долази до издужавања аксонема и формирања цилија, али тај процес није завршен након 15 дана култивисања ћелијске линије А549 у двофазној средини.

3. Оптимизовани су адекватни услови (унос, дужина трајања третмана, концентрација апликованог молекула) за третман ћелијске линије А549 молекулом сАМР. Резултати су указали да егзогено апликовани молекул сАМР има потенцијал активације ПКА и последичне нисходне фосфорилације серинских остатака целокупних протеина ове ћелијске линије. Уочена фосфорилација сугерише на потенцијалну улогу овог молекула у стимулисању бржег кретања цилија. Ипак, детектована фосфорилација је транзијентна и неопходни су додатни експерименти како би се утврдио тачан утицај овог молекула на брзину кретања цилија у мултицилијарној ћелијској линији.

У поглављу **Литература**, наведен је списак од 222 цитираних страних и домаћих научних часописа и књига. Коришћена литература је адекватна, актуелана и довољно широка да покрива све аспекте истраживања. Навођења литературе у самом тексту дисертације примерена и по садржају и по месту.

### **3. БИБЛИОГРАФИЈА**

**Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:**

### Радови у часописима међународног значаја

1. **M Andjelkovic**, P Minic, M Vreca, M Stojiljkovic, A Skakic, A Sovtic, M Rodic, V Skodric-Trifunovic, N Maric, J Visekruna, V Spasovski and S Pavlovic. Genomic profiling supports the diagnosis of primary ciliary dyskinesia and reveals novel candidate genes and genetic variants. PLoS One. 2018.; 13(10):e0205422; doi: 10.1371/journal.pone.0205422. (M21) IF (2.806/2016)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30300419>

1. **Marina Andelković**, Vesna Spasovski, Miša Vreća, Aleksandar Sovtić, Milan Rodić, Jovana Komazec, Sonja Pavlović, Predrag Minić. The importance of genomic profiling for differential diagnosis of pediatric lung disease patients with suspected ciliopathies. Serbian Archives of Medicine. 2019. doi.org/10.2298/SARH181012012A (M23) IF (0.3/2017)

<http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/0370-8179/2019%20OnLine-First/0370-81791900012A.pdf>

### Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **M Andjelkovic**, V Spasovski, M Vreca, P Minic, A Sovtić, M Rodić and S Pavlovic. Molecular characterization of genetic variants in patients with primary ciliary dyskinesia from Serbia. Genomic Medicine- Bridging research and the clinic, 03-07 May 2016, Portorož, Slovenia. Abstract book p73. (M34)
2. **M Andjelkovic**, V Spasovski, M Vreca, P Minic, A Sovtic, M Rodic and S Pavlovic. Molecular characterization of genetic variants in patients with primary ciliary dyskinesia from Serbia. European Society of Human Genetics Conference. 21-24 Maj 2016, Barselona, Španija, Knjiga apstrakata: str91. (M34)
3. **M Andjelkovic**, V Spasovski, M Vreca, P Minic, A Sovtic, M Rodic, J Visekruna, M Stojiljkovic, A Skakic and S Pavlovic. Molecular characterization of patients with primary ciliary dyskinesia revealed novel genetic variant in DNAIL1 gene. "1st Congress of Molecular Biologists of Serbia", 20-22 Septembar, 2017, Kolarac, Beograd, Srbija. Knjiga apstrakata: str106. (M34)
4. **M Andjelkovic**, P Minic, M Vreca, M Stojiljkovic, A Skakic, A Sovtic, M Rodic, V Skodric-Trifunovic, N Maric, J Visekruna, V Spasovski and S Pavlovic. The importance of comprehensive genomic profiling in differential diagnosis and discovery of novel disease-causing genetic variants in patients with pediatric lung diseases. "European Human Genetics Conference", 16-19 jun, 2018, Milano, Italija. (M34)

### Радови у часописима домаћег значаја

**Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја (M64)**

1. **M Andjelkovic**, M Vreca, A Skakic, J Komazec, P Minic, A Sovtic, V Spasovski i S Pavlovic. Genomsko profilisanje pacijenata sa retkim pedijatrijskim bolestima: dizajn strategije za diferencijalnu dijagnostiku. "Drugi kongres biologa Srbije", 25-30 Septembar, 2018, Kladovo, Srbija. Knjiga sazetaka: str.276 (M64)

#### **4. МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ**

Докторска дисертација кандидаткиње Марине Анђелковић под насловом: **“Геномски профил пацијената дечијег узраста са примарном цилијарном дискинезијом: корелација генотипа и фенотипа и функционална карактеризација нових генетичких варијанти”** представља оригиналан научни рад који се бави откривањем молекуларних механизма у примарној цилијарној дискинезији. Истраживања у вези са новим терапијским приступима су посебно драгоцене и актуелне. 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.

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 Марине З. Анђелковић и омогући кандидаткињи јавну одбрану рада.

#### **КОМИСИЈА:**

---

др Весна Спасовски, 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 Предраг Минић, редовни професор, Медицински факултет, Универзитет у Београду, члан

У Београду, 11.03.2019. године