

Биолошки факултет
Број захтева: 33/19-1
Датум: 30.1.2015.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији за кандидата на докторским студијама

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 162/11-пречишћени текст, 167/12, 172/13 и 178/14), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији:

КАНДИДАТ: **Бранислава С. Гемовић**

студент докторских студија на студијском програму Молекуларна биологија, Молекуларна биологија еукариота

пријавио је докторску дисертацију под називом:

„Биоинформатичка анализа протеина укључених у патогенезу мијелоидних малигнитета“

из научне области: Биолошке науке.

Универзитет је дана 26.12.2013. године. својим актом под бр. 02 Број: 61206-6270/2-13 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

„Биоинформатичка анализа протеина укључених у патогенезу мијелоидних малигнитета“

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 14.11.2014. год, одлуком Факултета под бр. 15/715-14.11.2014. год. у саставу:

	Име и презиме члана комисије	звање	научна област	Установа у којој је запослен
1.	др Душанка Савић- Павићевић	ванредни професор	биохемија и молекуларна физиологија	Универзитет у Београду- Биолошки факултет
2.	др Невена Вељковић	научни саветник	биоинформатика	Институт за нуклеарне науке „Винча“
3.	др Драгомир Марисављевић	редовни професор	хематологија	Универзитет у Београду - Медицински факултет

Напомена: уколико је члан Комисије у пензији навести датум пензионисања.

Наставно-научно веће факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној 30. јануара 2015. године.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

Прилог: 1. Реферат комисије са предлогом.

2. Акт Наставно-научног већа факултета о усвајању реферата

3. Примедбе дате у току стављања реферата на увид у јавности, уколико је таквих примедби било.

4. Електронска верзија.



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 16
11000 БЕОГРАД
Република СРБИЈА
Тел: +381 11 2186 635
Факс: +381 11 2638 500
Е-пошта: dekanat@bio.bg.ac.rs

33/19-30.1.2015.

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 59. став 1. тачка 1. Статута Универзитета у Београду-Биолошког факултета, Наставно-научно веће Факултета, на IV редовној седници одржаној 30.1.2015. године, донело је

О Д Л У К У

Прихвата се Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата:

Браниславе С. Гемовић, под називом:

„Биоинформатичка анализа протеина укључених у патогенезу мијелоидних малигнитета“

Универзитет је дана 26.12.2013. године. својим актом под бр. 02 Број: 61206-6270/2-13 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

Gemovic B, Perovic V, Glisic S, Veljkovic N. 2013. Feature-based classification of amino acid substitutions outside conserved functional protein domains. ScientificWorldJournal. 2013: 948617. **(M21)**

Nikolic K, Veljkovic N, **Gemovic B**, Srdic-Rajic T, Agbaba D. 2013. Imidazoline-1 receptor ligands as apoptotic agents: pharmacophore modeling and virtual docking study. Comb Chem High Throughput Screen. 16(4): 298-319. **(M22)**

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

Доставити:

- Универзитету у Београду,
- докторанту,
- Стручној служби Факултета.

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На II редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 14.11.2014. године, прихваћен је извештај ментора др Душанке Савић Павићевић, ванредног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду, и др Невене Вељковић, научног саветника Института за нуклеарне науке Винча Универзитета у Београду, о урађеној докторској дисертацији **Браниславе Гемовић**, истраживача сарадника Института за нуклеарне науке Винча Универзитета у Београду, под насловом „**Биоинформатичка анализа протеина укључених у патогенезу мијелоидних малигнитета**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Душанка Савић Павићевић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, др Невена Вељковић, научни саветник Института за нуклеарне науке Винча Универзитета у Београду, и др Драгомир Марисављевић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Браниславе Гемовић**, истраживача сарадника, под насловом „**Биоинформатичка анализа протеина укључених у патогенезу мијелоидних малигнитета**“, написана је на 157 страна и садржи 7 поглавља: **Увод** (34 стране), **Циљеви истраживања** (1 страна), **Материјал и методе** (23 стране), **Резултати** (35 страна), **Дискусија** (20 страна), **Закључци** (2 стране) и **Литература** (42 стране, 561 референцираних публикација). Дисертација садржи 22 слике и 15 табела. Додатак дисертацији садржи 5 прилога (37 страна).

Анализа докторске дисертације:

У **уводном делу** дисертације изложен је преглед досадашњих сазнања из области, која су непосредно везана за предмет истраживања докторске дисертације. Наведене су генетичке промене, које доводе до патогенезе малигнитета, након чега су детаљније описани типови и механизми настанка мијелоидних малигнитета. У овом делу уводног поглавља је истакнут значај испитивања мијелоидних неоплазија и њихов ефекат на људску популацију. У наставку је кандидаткиња изложила основне принципе персонализоване медицине, као индивидуализованог приступа дијагностици и развоју терапеутика. Приказана су досадашња истраживања протеин-протеин интеракција као

мета за циљану терапију. Биоинформатика је значајна за смањење трошкова ових истраживања јер се примењује за одабир потенцијалних протеинских мета за експериментални скрининг. Поред тога, биоинформатичке методе имају важну примену у валидацији експерименталних података и пружају додатних информација, које нису очигледне из експерименталних техника. Посебно је истакнут значај испитивања протеинских партнера протеина WT1, важног транскрипционог фактора укљученог у патогенезу акутне мијелоидне леукемије. Указано је на идентификацију лиганд-везивних домена терапеутских мета (таргета), као важног аспекта рационалног дизајна нових лекова. Представљен је преглед литературе која указује на то да протеин NISCH, кандидат за I₁ имидазолински рецептор, представља и нови потенцијални таргет за терапеутско деловање на мијелоидне малигнитете. Поред развоја нових лекова, пратећа дијагностика има значајну улогу у персонализованој медицини. Кандидаткиња је истакла важност анализе мутација у епигенетичким регулаторима и њихову примену као информативних биомаркера у мијелоидним малигнитетима. Тема последњег дела уводног поглавља је примена биоинформатике у анализи протеина. Представљене су биоинформатичке методе за предвиђање протеин-протеин интеракција, функционалних домена протеина и ефеката генетичких варијација. У овом делу су детаљно описане специфичности и значај примене методе информационог спектра у анализи секвенци биолошких макромолекула.

На основу литературних података, који указују на значај протеина WT1, NISCH, ASXL1, DNMT3A, EZH2 и TET2 за патогенезу мијелоидних малигнитета и њихову потенцијалну примену као циљних молекула за терапију и/или пратећу дијагностику, постављени су следећи **циљеви истраживања**: (1) предвиђање протеин-протеин интеракција WT1, које су важне за патогени ефекат WT1 у мијелоидним малигнитетима; (2) идентификација и карактеризација функционалних домена протеина NISCH, који могу бити таргети за циљану терапију мијелоидних малигнитета; и (3) развој алгорита за предвиђање функционалних ефеката аминокиселинских супституција у епигенетичким регулаторима ASXL1, DNMT3A, EZH2 и TET2.

У оквиру поглавља **Материјал и методе** детаљно су описане биоинформатичке методе и скупови биолошких података коришћени у овој дисертацији. Представљена је метода информационог спектра, заснована на бројчаном кодирању аминокиселина у протеинској секвенци и примени техника за обраду дигиталних сигнала, која је била основна биоинформатичка метода у овом истраживању. Изложен је преглед програма EIP/ISM платформе, развијене у Центру за мултидисциплинарна истраживања и инжењеринг Института за нуклеарне науке Винча. У овом истраживању су коришћене и биоинформатичке методе, које се заснивају на савременим алгоритмима за анализу *enrichment*-а, протеинских мрежа, *microarray* података и функционалних ефеката генетичких варијација. У овом поглављу описан је и скуп база података онтологије гена (GO – Gene Ontology), који је коришћен за функционалну анотацију протеина. За *enrichment* анализу GO термина примењена је релевантна web платформа DAVID. Мрежна анализа је изведена употребом STRING мета-базе, која интегрише информације из литературе, експерименталних података и компјутерских предикција. За анализу коекспресије су коришћени *microarray* подаци из Gene Expression Omnibus базе података. За предвиђање функционалних ефеката аминокиселинских супституција примењена су два најчешће коришћена алата PolyPhen-2 и SIFT. Методолошко поглавље обухвата и статистичке методе: анализа унакрсних табела, ROC криве, Спирманов корелациони тест, Фишеров тест вероватноће и Мен Витни тест. На крају, приказан је алгоритам за предикцију протеин-протеин интеракција, који обухвата неколико метода описаних раније у овом поглављу.

У поглављу **Резултати**, кандидаткиња је изложила преглед резултата добијених на основу спроведених биоинформатичких анализа, који су, у складу са постављеним циљевима, организовани у три целине. Прва целина, која се односи на предикцију протеин-протеин интеракција WT1, сумира детаљно претраживање постојеће литературе о протеинским партнерима WT1 и њиховим функцијама. У наставку, кандидаткиња приказује корак-по-корак примену интегративног алгоритма за предвиђање нових протеинских партнера WT1. Крос-спектралном анализом је идентификован доминантан локални максимум на фреквенци F(0,00195), који је конзервиран филогенетски и међу главним изоформама хуманог WT1, што је указало на везу ове фреквенце са најважнијим функцијама WT1 протеина. Да би се идентификовали протеини који потенцијално интерагују са WT1, на основу претпоставки методе информационог спектра, детектовани су протеини из UniProt базе података, који у крос-спектру са WT1 имају ову фреквенцу као доминантну. Критеријум за филтрирање резултујућег скупа протеина је добијен на основу крос-спектралних карактеристика реалних WT1 интеракција. *Enrichment* анализа је показала да су у овом скупу најзаступљенији протеини укључени у регулацију транскрипције и обраду иРНК, што је у складу са најважнијим функцијама протеина WT1. Из овог скупа је издвојено 504 протеина, који су анотирани GO термином GO:0006355: „било који процес који модулира фреквенцу, стопу и обим ћелијске ДНК-зависне транскрипције“. Паралелно са сукцесивном анализом крос-спектра и GO *enrichment*-а, извршена је мрежна анализа у STRING-у, која је резултовала идентификацијом 500 потенцијалних WT1 интерактора. Интегрисањем ових резултата добијена је листа од 51 протеина, од којих је 36 коекспримирано са WT1 у K562 ћелијској линији. Они представљају најбоље кандидате за нове интеракторе WT1, а у оквиру овог поглавља су приказане и њихове међусобне везе.

Друга целина резултата се бави предвиђањем и карактеризацијом функционалних домена протеина NISCH. У информационом спектру NISCH-а су идентификоване две доминантне фреквенце, F(0,152) и F(0,426). Показано је да су оне асоциране са два домена, који обухватају резидуе од 680 до 739 и од 966 до 1020. Компјутерска функционална карактеризација првог домена је показала повезаност са процесима посттранслационих модификација протеина, специфично убиквитинацијом, и синаптогенезом, што је у складу са литературним подацима. У овој дисертацији је по први пут функционално окарактерисан домен 966-1020 протеина NISCH, за који је показана повезаност са транскрипцијом, апоптозом и хормонима-посредованим преносом сигнала. Кандидаткиња је приказала онтологију ових процеса у GO.

У трећој целини резултата приказане су анализе везане за развој новог алгоритма за предвиђање функционалних ефеката аминокиселинских супституција у епигенетичким регулаторима ASXL1, DNMT3A, EZH2 и TET2. Прво је тестирана ефикасност постојећих алгоритама у предвиђању ефеката варијација које се налазе ван конзервираних домена анализираних протеина. Опсежно претраживање литературе и релевантних база података је резултовало скупом од 314 аминокиселинских супституција, од којих се 159 налази ван конзервираних региона. Указано је да више од четвртине мутација са доказаним соматским статусом није позиционирано у конзервираним доменима протеина. Даље, показано је да најчешће коришћени алати, PolyPhen-2 и SIFT, имају ниску ефикасност предикције на овом функционалном скупу варијација, што је указало на потребу за новим алгоритмом. Кандидаткиња у наставку приказује кораке новог ISM алгоритма, који обухватају генерисање информационог спектра, рачунање ISM скорa, селекцију значајне фреквенце, одређивање граничне вредности амплитуде за селектовану фреквенцу и предикцију функционалног ефекта аминокиселинске супституције. Развијени алгоритам је

примењен на ASXL1, DNMT3A, EZH2 и TET2, при чему је показано да су добијени критеријуми независни од позиције супституције, што указује на вредност овог алгоритма као комплементарног наведеним најчешће коришћеним програмима. Евалуација ISM алгоритма на функционалном скупу варијација (позиционираних ван конзервираних домена протеина) је показала да је његова тачност ~70%. Овај резултат је потврђен ROC анализом, при чему је добијена површина испод криве од 0,70. Показано је и да је ISM алгоритам једини врши статистички значајну предикцију функционалних ефеката аминокиселинских супституција, које се налазе ван конзервираних функционалних домена епигенетичких регулатора ASXL1, DNMT3A, EZH2 и TET2.

У поглављу **Дискусија**, резултати биоинформатичке анализе су на адекватан начин размотрени у односу на податке познате из литературе, дискутовани су критички и објективно, указивањем на сагласности и разлике. Такође, кандидаткиња наводи друге биоинформатичке и експерименталне студије које су засноване на резултатима добијеним у овој дисертацији. Детаљно су дискутоване улоге 36 кандидата за протеинске партнере WT1, при чему је указано да овде идентификована протеинска мрежа око WT1 може објаснити механизме деловања овог протеина у „иРНК фабрикама“. Наведено је да је из овог скупа експертском анализом издвојена интеракција WT1 са CDK9 за експериментално тестирање у лабораторији др Робертса (Одсек за биолошке науке Универзитета у Буфалу, САД). Коимунопреципитациони експеримент је потврдио ову интеракцију, па кандидаткиња у наставку дискутује значај овог резултата за боље разумевање механизма патогенезе мијелоидних малигнитета и његову примену у терапеутске сврхе. У овом поглављу је изложена и литература која подржава резултате функционалне карактеризације домена NISCH-а. Такође, кандидаткиња даје преглед рада објављеног у часопису међународног значаја са колегама са Фармацеутског факултета Универзитета у Београду (аутоцитат). Резултати добијени у оквиру ове дисертације заједно са *virtual docking* и 3D-QSAR студијама довели су до креирања модела везивања агониста и антагониста I₁ имидазолинског рецептора. Истакнута је примена ових резултата у рационалном дизајну и евалуацији нових једињења, која би могла имати терапеутске ефекте у малигнитетима у чијем настанку учествује NISCH – карциному дојке, колона и неким мијелоидним малигнитетима. У последњем делу овог поглавља, кандидаткиња дискутује резултате предвиђања функционалних ефеката аминокиселинских супституција у епигенетичким регулаторима. Упоредени су резултати програма PolyPhen-2 и SIFT на целокупном скупу варијација и, посебно, на функционалном скупу варијација ван конзервираних функционалних домена, са резултатима других студија. Истакнут је значај овог функционалног скупа варијација и дискутована је потреба за новим алгоритмом. На крају су критички образложене предности и недостаци развијеног ISM алгоритма (објављеног у раду у часопису међународног значаја - аутоцитат), као и могућности његовог унапређења.

У поглављу **Закључци**, сажето и јасно су изнети најважнији закључци до којих је кандидаткиња дошла у овом истраживању. Истакнута је важност идентификоване протеинске мреже око WT1 за разумевање улоге овог протеина у „иРНК фабрикама“. Сажето су представљени идентификовани и функционално окарактерисани домени протеина NISCH. Истакнут је значај и специфичан потенцијал за примену ISM алгоритма као комплементарног методама заснованим на поравнању секвенци и структурним анализама у предвиђању функционалних ефеката аминокиселинских супституција, које су ван конзервираних домена епигенетичких регулатора.

У поглављу **Литература** дата је листа од 561 референтних публикација, које су коришћене током израде ове докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Gemovic B**, Perovic V, Glisic S, Veljkovic N. 2013. Feature-based classification of amino acid substitutions outside conserved functional protein domains. *ScientificWorldJournal*. 2013: 948617. **M21**
2. Nikolic K, Veljkovic N, **Gemovic B**, Srdic-Rajic T, Agbaba D. 2013. Imidazoline-1 receptor ligands as apoptotic agents: pharmacophore modeling and virtual docking study. *Comb Chem High Throughput Screen*. 16(4): 298-319. **M22**

Б2. Радови у часописима домаћег значаја

1. **M**
2. **M**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Gemovic B**, Perovic V, Glisic S, Veljkovic N. 2013. Can we use standard tools to predict functional effects of point variations outside conserved domains? TET2 example. II Conference on Theoretical Approaches to BioInformation Systems – TABIS 2013, Belgrade, Serbia, 17-22 September, 2013. **M34**
2. Veljkovic N, **Gemovic B**, Glisic S, Perovic V, Veljkovic V. 2012. Analyses of gene variations in coding regions of molecular markers in myeloid neoplasms: web-application for TET2 gene. XI European Conference on Computational Biology – ECCB 2012, Basel, Switzerland, 9-12 September, 2012. **M34**
3. **Gemovic B**, Perovic V, Glisic S, Veljkovic N. 2012. Bioinformatics approach to protein-protein interactions of WT1 isoforms. XXII IUBMB & XXXVII FEBS Congress, Seville, Spain, 4-9 September, 2012. In *FEBS J*. 279: 295. **M34**
4. Agbaba D, Nikolic K, Veljkovic N, **Gemovic B**, Srdic-Rajic T. 2012. 3D-QSAR and Virtual Docking Study of Agonists and Antagonists at Imidazoline-1 Receptor. XXII International Symposium on Medicinal Chemistry – ISMC 2012, Berlin, Germany, 2-6 September, 2012. **M34**

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **M**
2. **M**

Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација **Браниславе Гемовић**, истраживача сарадника, под насловом „**Биоинформатичка анализа протеина укључених у патогенезу мијелоидних малигнитета**”, представља значајан допринос изучавању молекуларне патогенезе мијелоидних малигнитета и персонализованом приступу дијагностици и терапији ових болести. На основу изложене анализе докторске дисертације, Комисија закључује да су постављени циљеви остварени и да су постигнути резултати оригинални. На основу свега изнетог, чланови ове Комисије предлажу Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације кандидаткиње **Браниславе Гемовић**.

КОМИСИЈА:

др Душанка Савић Павићевић, ванредни професор
Биолошког факултета Универзитета у Београду

др Невена Вељковић, научни саветник Института за
нуклеарне науке Винча Универзитета у Београду

др Драгомир Марисављевић, редовни професор
Медицинског факултета Универзитета у Београду

У Београду, 28.11.2014. године.