

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На IX редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 12.07.2017. године, прихваћен је извештај ментора др Милене Угрин и др Соње Павловић о урађеној докторској дисертацији **Иве Д. Милачић**, специјалисте биологије, запослене у Гинеколошко-акушерској клиници „Народни фронт“ под насловом „**Молекуларно-генетичка основа конгениталне адреналне хиперплазије у Србији: карактеризација мутација у CYP21A2 гену**“ и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Соња Павловић, научни саветник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, др Милена Угрин, научни сарадник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду и др Михаило Јелић, доцент Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Иве Милачић је оригинално истраживање које за тему има разјашњење молекуларно-генетичке основе конгениталне адреналне хиперплазије (КАХ) у Србији.

Експериментални део дисертације је урађен у Лабораторији за молекуларну биомедицину на Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду.

Докторска дисертација садржи: насловну страну на српском и енглеском језику, страну са подацима о менторима и члановима комисије, захвалницу, резиме на српском и енглеском језику, садржај, текст рада по поглављима, биографију аутора и прилоге везане за ауторство. Текст рада по поглављима је подељен на 7 поглавља: Увод, Циљеви,

Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература. Написан је на 94 стране, садржи 23 слике, девет табела и 136 наслова у поглављу Литература који се адекватно наводе у тексту.

Анализа докторске дисертације:

Поглавље **УВОД** садржи савремена сазнања везана за научну област која је била предмет истраживања. У овом делу је дат садржајан преглед литературних података који се односе на КАХ. Прво је дат преглед епидемиологије и патогенезе овог обољења, затим су описани различити типови клиничких варијанти и дат је кратак осврт на структуру и функцију ензима стероид 21-хидроксилазе, чија дефицијенција је најчесталији узрок КАХ-а. Даље је дат темељан преглед геномске организације локуса *CYP21A2* гена који кодира поменути ензим, генетичких механизма који доводе до његове инактивације и наведени су типови мутација *CYP21A2* гена који резултују клиничком сликом КАХ-а и који су били предмет анализе. У овом поглављу дисертације је изложен и значај анализе утицаја варијанте *CYP21A2* гена на фенотип КАХ-а и представљени су релевантни резултати досадашњих истраживања на ту тему. Поменути су и други ензими чије дефицијенције могу узроковати болест, а на самом крају је истакнут значај молекуларно-генетичке дијагностике КАХ-а, недоступне у Србији, као финалне потврде клиничке и биохемијске дијагнозе.

Поглавље **ЦИЉЕВИ** садржи шест јасно дефинисаних циљева овог истраживања. Први постављени циљ је био оптимизација методологије за детекцију варијанти у кодирајућим и некодирајућим регионима *CYP21A2* гена. Као други циљ наведена је оптимизација методологије за детекцију великих хромозомских реаранжмана који резултују формирањем *CYP21A1P/CYP21A2* химерних гена. Трећи циљ је био карактеризација новооткривених мутација применом компјутерских софтвера. Четврти постављени циљ је био одређивање спектра и учесталости детектованих мутација у популацији из Србије и њихово поређење са подацима из других европских земаља. Као пети циљ наведена је анализа корелације генотипа *CYP21A2* гена и фенотипа болести. И као шести циљ је постављен развој оптималног молекуларно-генетичког алгорита за дијагностику КАХ-а у Србији.

У оквиру поглавља **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** описана је група испитаника коју су чинили пацијенти којима је дијагностификована конгенитална адренална хиперплазија. Узорци су прикупљени у сарадњи са Институтом за здравствену заштиту мајке и детета Србије „Др Вукан Чупић”, Институтом за ендокринологију Клиничког центра Србије и Универзитетском дечијом клиником Тиршова у Београду. Детаљно су описане све експерименталне процедуре примењене приликом израде ове докторске дисертације. За детекцију генетичких варијанти *CYP21A2* гена коришћена је метода директног секвенцирања целог гена, док је за детекцију великих хромозомских реаранжмана коришћена ланчана реакција полимеразе са прајмерима специфичним за секвенцу. За процену ефекта варијанте на структуру и функцију *CYP21A2* протеина коришћени су биоинформатички програми PolyPhen-2, SIFT, MutPred и Clustal Omega.

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ** кандидаткиња прегледно и концизно износи резултате, систематизоване у два потпоглавља. Прво потпоглавље се односи на карактеризацију мутација у кодирајућим и некодирајућим секвенцама *CYP21A2* гена које доводе до испољавања КАХ-а. Редом су приказани резултати добијени директним секвенцирањем *CYP21A2* гена, резултати анализе химерних *CYP21A1P/CYP21A2* гена добијени применом ланчане реакције полимеразе са прајмерима специфичним за секвенцу, затим је представљен целокупан спектар мутација детектован у анализираној групи пацијената, као и њихове релативне учесталости. Идентификовано је 18 патогених алела и достигнут ниво детекције од 82,0%, при чему је ниво детекције био највиши у групи пацијената са тешком формом болести са губитком соли (94,7%). Највишу учесталост је имала мутација која доводи до аберантног искрајања другог интрона с.290-13A/C>G (18,5%), а затим редом химерни *CYP21A1P/CYP21A2* гени (13,0%), p.P30L (13,0%), p.R356W (11,1%), p.G110fs (7,4%), p.Q318X (4,6%), p.V281L (4,6%), p.I172N (2,8%), p.L307fs (2,8%), p.P453S (1,9%). Пет алела са највишом учесталошћу с.290-13A/C>G, *CYP21A1P/CYP21A2*, p.P30L, p.R356W и p.G110fs је чинило 63,0% свих мутираних *CYP21A2* алела у анализираној групи пацијената. Детектована је неуобичајено висока учесталост мутације p.R356W (11,1%), као и висока учесталост комплексних алела са више мутација, међу којима чак 75% садржи p.P453S мутацију. Такође, приказани су резултати биоинформатичке анализе две новооткривене варијанте кодирајуће секвенце *CYP21A2* гена (p.L129P и p.S165P) који су указали да се вероватно ради о патогеним променама. У другом потпоглављу су дати резултати анализе утицаја детектованих варијанти на фенотип болести. Позитивна корелација између генотипа *CYP21A2* гена и фенотипа КАХ-а је уочена код већине

пацијената (74,0%), док је варијабилна клиничка слика примећена код пацијената чији фенотип одређују с.290-13A/C>G и р.Р30L мутације. Мутација р.Р453S је неочекивано показала корелацију са класичном формом КАХ-а.

У поглављу **ДИСКУСИЈА**, које садржи шест потпоглавља, кандидаткиња критички коментарише добијене резултате и пореди их са подацима из литературе чији су аутори водећи истраживачи у овој области. У првом делу дискусије истакнуте су специфичности утврђеног спектра и учесталости детектованих мутација и извршено је поређење са подацима из других европских популација, посебно оних са којима је становништво Србије повезано протоком гена. Други део дискусије се односи на комплексне алеле са више мутација у *CYP21A2* гену за које је показано да су учесталији у популацији из Србије у поређењу са другим европским популацијама и наглашена је важност темељне анализе *CYP21A2* локуса. У трећем подпоглављу се разматрају новодетектоване варијанте кодирајуће секвенце *CYP21A2* гена. Дискутују се резултати анализе ефекта мутације добијени применом биоинформатичких програма и врши поређење биоинформатички предвиђеног ефекта са клиничком сликом пацијената. У четвртном делу дискусије означеном као стопа детекције исцрпно су објашњени могући разлози изостанка детекције мутација *CYP21A2* гена код анализираних пацијената. У последњем делу дискусије кандидаткиња предлаже оптимални алгоритам за рутинску молекуларно-генетичку дијагностику КАХ-а у Србији.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** су истакнути најзначајнији резултати и сазнања добијена истраживањем у оквиру докторске дисертације. Јасно је изнето осам закључака који у потпуности произилазе из добијених резултата.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја (M23)

1. **Milacic I**, Barac M, Milenkovic T, Ugrin M, Klaassen K, Skakic A, Jesic M, Joksic I, Mitrovic K, Todorovic S, Vujovic S, Pavlovic S, Stojiljkovic M. Molecular genetic study of congenital adrenal hyperplasia in Serbia: novel p.Leu129Pro and p.Ser165Pro CYP21A2 gene mutations. J Endocrinol Invest. 2015; 38(11): 1199-210.

2. Ugrin M, **Milačić I**, Skakić A, Klaassen K, Komazec J, Pavlović S, Stojiljković M. Molecular genetic strategy for diagnosis of congenital adrenal hyperplasia in Serbia. Genetika. 2017; 49 (2): 457-67.

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја (М34)

1. Skakic A, **Milacic I**, Barac M, Milenkovic T, Ugrin M, Klaassen K, Jesic M, Joksic I, Mitrovic K, Todorovic S, Vujovic S, Pavlovic S, Stojiljkovic M. Molecular genetic study of congenital adrenal hyperplasia in Serbia: two novel *CYP21A2* gene mutations. BCHG 2015, Belgrade, Serbia.
2. Stojiljkovic M, **Milacic I**, Barac M, Milenkovic T, Ugrin M, Klaassen K, Skakic A, Jesic M, Joksic I, Mitrovic K, Todorovic S, Vujovic S, Pavlovic S. Molecular genetic study of congenital adrenal hyperplasia in Serbia: novel p.Leu129Pro and p.Ser165Pro *CYP21A2* gene mutations. SSIEM 2015, Lyon, France.

Мишљење и предлог Комисије:

На основу изложеног у овом извештају сматрамо да докторска дисертација кандидаткиње Иве Милачић представља оригиналан и значајан научни допринос у области медицинске генетике. Истраживање спроведено у оквиру ове студије омогућило је боље разумевање молекуларне основе и патофизиологије конгениталне адреналне хиперплазије (КАХ) у Србији. Резултати ове студије представљају прву свеобухватну анализу спектра и учесталости *CYP21A2* мутација код пацијената оболелих од КАХ-а у нашој земљи и посебно су значајни јер су допринели оптимизацији молекуларно-генетичке дијагностике овог обољења не само у Србији, већ и широм Европе. У изради дисертације, кандидаткиња Ива Милачић је показала велики степен самосталности у експерименталном раду, као и обради добијених резултата. које је критички дискутовала у односу на познате податке из литературе и показала одлично познавање основа ове научне проблематике.

На основу свега наведеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације Иве Милачић под насловом: “Молекуларно-генетичка основа конгениталне адреналне хиперплазије у Србији: карактеризација мутација у *CYP21A2* гену”.

У Београду, 24. 07. 2017. године.

КОМИСИЈА:

др Милена Угрин, научни сарадник,
Универзитет у Београду –
Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство

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

др Михаило Јелић, доцент,
Универзитет у Београду - Биолошки факултет