

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На I редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 13. 10. 2017. године, прихваћен је извештај ментора др Александре Николић и др Драгице Радојковић о урађеној докторској дисертацији **Сандре З. Драгичевић**, истраживача сарадника у Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду, под насловом „**Анализа промоторских варијанти гена *TGFBI* као фактора ризика и модулятора одговора на терапију астме**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу др Александра Николић, виши научни сарадник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, др Душанка Савић-Павићевић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Драгица Радојковић, научни саветник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду. Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и на основу анализе приложене докторске дисертације Већу подноси следећи:

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација **Сандре З. Драгичевић** под насловом „**Анализа промоторских варијанти гена *TGFBI* као фактора ризика и модулятора одговора на терапију астме**“, написана је на 104 стране, у оквиру којих се налази 9 табела и 19 слика. У докторској дисертацији је цитирано 111 извора литературе. 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, Списак скраћеница, Садржај, Текст по поглављима и Прилоге. Текст дисертације садржи следећа поглавља: **Увод** (1-21 страна), **Циљ рада** (22 страна), **Материјал и методе** (23-44 страна), **Резултати** (45-67 страна), **Дискусија** (68-93 страна), **Закључци** (95 страна) и **Литература** (96-104 страна). У оквиру Прилога се налазе: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу.

2. АНАЛИЗА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Поглавље **Увод** садржи осам потпоглавља и у њему је дат сажет приказ досадашњих сазнања из литературе која су непосредно везана за предмет докторске дисертације. У прва три потпоглавља је описана астма као комплексна болест и приказани су савремени приступи који се користе у дијагнози и лечењу болести. Описан је начин на који се астма манифестује при чему је посебна пажња посвећена инфламацији и ремоделовању дисајних путева као основним карактеристикама болести. Прегледно су представљени лекови који се користе у терапији астме и наведени су основни механизми њиховог деловања. С обзиром да је астма мултифакторијална болест, у четвртном потпоглављу је дат преглед гена за које се сматра да могу имати импликације у патогенези болести, а међу којима је издвојен ген *TGFBI*. У осталим потпоглављима пажња је посвећена трансформишућем фактору раста бета 1 (*TGFBI*) и гену *TGFBI* који кодира овај плејотропни цитокин. Описане су основне функционалне карактеристике *TGFBI*, а посебно је истакнута његова улога у астми. Детаљно је представљена структура 5' регулаторног региона гена *TGFBI* и описана је регулација експресије гена. Такође, су описане најчешће испитиване варијанте у промоторским и кодирајућим секвенцама гена *TGFBI*.

Како је *TGFBI* важан профибротички медијатор и инфламаторни модулатор у астми, у овој докторској дисертацији је испитивано да ли су промене у 5' регулаторном региону гена *TGFBI*, саме и у комбинацији са факторима спољашње средине, повезане са настанком астме, као и са адекватним одговором на терапију болести. У поглављу **Циљ** су дефинисани следећи циљеви рада:

1. Детекција промоторских варијанти гена *TGFBI* код пацијената са астмом и здравих испитаника
2. Испитивање утицаја детектованих промоторских варијанти гена *TGFBI* као потенцијалних фактора ризика за настанак астме
3. Испитивање утицаја детектованих промоторских варијанти на тежину болести и одређивање њиховог значаја као модулятора одговора на терапију
4. Испитивање утицаја срединских фактора ризика за настанак астме на експресију гена *TGFBI*
5. Испитивање утицаја лекова на експресију гена *TGFBI* и секрецију протеина *TGFBI*
6. Испитивање комбинованог утицаја функционално значајних промоторских варијанти и одабраних лекова на активност промотора гена *TGFBI*

Поглавље **Материјал и методе** јенаписано прегледно, подељено је у четири потпоглавља и садржи све информације неопходне за репродуковање експерименталних процедура. У првом потпоглављу су описане карактеристике испитаника укључених у истраживање. У другом потпоглављу је дат преглед биолошког материјала пореклом од испитаника, затим ћелијских линија, бактеријских сојева, плазмидних вектора, олигонуклеотида и агенаса коришћених за различите третмане. Треће потпоглавље је подељено у четири целине. Прва целина се односи на припрему биолошког материјала и обухвата изолацију нуклеинских киселина (ДНК и РНК), обраду и *ex vivo* третман индукованог спутума, као и *ex vivo* третман пуне крви. Друга целина се односи на рад са нуклеинским киселинама и протеинима. У овој целини су описане методе за детекцију промоторских варијанти гена *TGFBI* (PCR, RFLP, секвенцирање), затим методе за квантификацију експресије гена на нивоу РНК у различитим типовима ћелија (синтеза комплементарне ДНК, квантитативни PCR у реалном времену) и метода ELISA за квантификацију протеина. У трећој целини је описан рад са бактеријама при чему су детаљно наведене методе коришћене за клонирање (изолација плазмидне ДНК, дигестија плазмидне ДНК, лигација жељених фрагмената ДНК у плазмидни вектор, припрема и трансформација компетентних бактеријских ћелија). Рад са перманентним ћелијским линијама је описан у четвртој целини трећег потпоглавља. Прво су описани култивација и третмани ћелијске линије BEAS 2B, а затим метода транзијентне трансфекције. Такође је детаљно представљено мерење промоторске активности помоћу луциферазних есеја.

Резултати овог истраживања су представљени у поглављу **Резултати**, које садржи осам потпоглавља. Добијени резултати судокументовани табелама и сликама. У прва два потпоглавља су приказани резултати поређења општих карактеристика група испитаника и резултати добијени анализом базалног промотора и регулаторног региона гена *TGFBI*. Детектовано је присуство две промоторске варијанте, -509C>T и -800G>A. У трећем потпоглављу су приказани резултати асоцијативне студије при чему је показано да детектоване варијанте не представљају фактор ризика за настанак болести. У четвртом потпоглављу су приказани резултати корелације промоторских варијанти гена *TGFBI* са основним клиничким параметрима адултних пацијената. За промоторску варијанту -509C>T је показана повезаност са одговором на терапију. Пацијенти са генотипом -509TT су под 2,8 пута већим ризиком за појаву егзацербација у односу на пацијенте са генотипом -509CC и -509CT. За даљу функционалу анализу је одабрана промоторска варијанта -509C>T. Пето потпоглавље се односи на резултате *ex vivo* анализе којом је показана смањена експресија гена *TGFBI* у ћелијама индукованог спутума под дејством монтелукаста, терапеутика који се примењује у терапији астме. Код пацијената са генотипом -509TT је ефекат монтелукаста израженији у односу на пацијенте са генотиповима -509CC и -509CT. Резултати добијени анализом утицаја срединских фактора ризика за настанак астме на експресију гена *TGFBI in vitro* су приказани у шестом потпоглављу, док су резултати анализе утицаја различитих терапеутика на генску експресију приказани у седмом потпоглављу. У истом потпоглављу су представљени резултати утицаја терапеутика на секрецију протеина *TGFBI in vitro*. У осмом потпоглављу су приказани резултати добијени мерењем промоторске активности гена *TGFBI* помоћу луциферазних есеја након транзијентне трансфекције ћелијске линије

BEAS 2B. Резултати указују на већу промоторску активност гена *TGFBI* када је присутна варијанта -509T у односу на присуство варијанте -509C. Такође је показано да монтелукаст стимулише активност промотора при чему је одговор варијанте -509T интензивнији у односу на одговор варијанте -509C.

У поглављу **Дискусија** дата је упоредна анализа добијених резултата у овом истраживању и података из литературе. Добијени резултати су критички анализирани и интерпретирани, и јасно је сагледан њихов значај. Дискусија је добро структурирана и састоји се из осам потпоглавља. У оквиру првог потпоглавља дискутоване су учесталости алела и генотипова детектованих варијанти у промотору гена *TGFBI* у овој студији. У наредна два потпоглавља дискутовани резултати асоцијативне студије на основу којих је за функционалну анализу одабрана промоторска варијанта -509C>T. У четвртном потпоглављу суобразложени резултати *ex vivo* анализе индукованог спутума и истакнуте су предности, као и недостаци коришћеног методолошког приступа. У наредна три одељка су јасно објашњени резултати добијени анализом утицаја различитих терапеутика на експресију гена *TGFBI in vitro*. Посебно је дискутована хипотеза о потенцијалној модулаторној улози промоторске варијанте -509C>T у одговору на дејство монтелукаста. У осмом потпоглављу дискутована потенцијална улога промоторске варијанте -509C>T у фармакогенетици.

У поглављу **Закључци** су сажето и јасно изнети најважнији закључци до којих је кандидаткиња дошла анализирањем добијених експерименталних резултата. Добијени резултати су сумирани у укупно осам закључака:

1. Анализом 5'регулаторног региона гена *TGFBI* су код пацијената са астмом детектоване две базне замене: С у Т на позицији -509 и G у А на позицији -800
2. Учесталост алела -509T у популацији Србије је 59,5%, док је учесталост алела -800A 10,3%, и налазе се у опсегу учесталости добијених за друге популације
3. Промоторске варијанте -509C>T и -800G>A гена *TGFBI* не представљају фактор ризика за настанак астме и нису повезане са тежином болести
4. Промоторска варијанта -800G>A није повезана са појавом егзацербација, док промоторска варијанта -509C>T представља фактор ризика за појаву егзацербација; пацијенти са генотипом -509TT су под 2,8 пута већим ризиком за појаву егзацербација у односу на пацијенте са генотиповима -509CC и -509CT
5. Средински фактори ризика за настанак астме, дувански дим и липополисахарид, индукују смањену експресију гена *TGFBI* у ћелијама BEAS 2B
6. Монтелукаст и полинол значајно смањују експресију гена *TGFBI* у ћелијама BEAS 2B, док на секрецију протеина *TGFBI* немају утицаја
7. Системски кортикостероиди и дапсон благо повећавају експресију гена *TGFBI*, док на секрецију протеина *TGFBI* немају утицаја

8. Промоторска варијанта -509C>T има модулаторну улогу у одговору гена *TGFB1* на дејство монтелукаста

У поглављу **Литература** дата је листа од 111 библиографских јединица. Списак литературе је адекватан, актуелан и довољно широк да покрива све аспекте истраживања и дискусије резултата. Навођења литературе у самом тексту дисертације су јасна и примерена, како по садржају тако и по месту.

3. БИБЛИОГРАФИЈА

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **M23 - Dragicevic S**, Petrovic-Stanojevic N, Nikolic A. TGFB1 Gene Promoter Polymorphisms in Serbian Asthmatics. *Adv Clin Exp Med* 2016; 25(2):273-278.
2. **M23 - Dragicevic S**, Miosevic K, Nestorovic B, Nikolic A. The influence of the polymorphism C-509T in the TGFB1 gene promoter on the response to montelukast in asthma. *Pediatr Aller Imm Pul* 2017; DOI: 10.1089/ped.2017.0770

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Dragicevic S**, Petrovic-Stanojevic N, Nikolic A. Analysis of TGF-B1 promoter polymorphisms in asthma, 2nd Alpe Adria meeting and 10th Balkan Congress of Human Genetics, Bled, Slovenia, 2013, Abstract book, p. 116.
2. **Dragicevic S**, Milosevic K, Nikolic A. TGF-B1 -509C>T polymorphism and response to montelukast in childhood asthma, European Human Genetics Conference 2014, Milan, Italy, 2014, Abstract book, p. 304.
3. Vlajnic M, **Dragicevic S**, Nikolic A. Analysis of TGF-B1 C-509T promoter polymorphism in asthma, International Student Congress 2014, Graz, Austria, 2014, Abstract book, p.51.
4. **Dragicevic S**, Petrovic-Stanojevic N, Nikolic A, Analysis of TGFB1 C-509T and G-800A promoter polymorphisms in asthma, Course in Medical Genetics, Bertinoro University Residential Centre, Bertinoro, Italy, 2015, Abstract book, p. 44
5. **Dragicevic S**, Radulovic V, Anastasov N, Aktinson M, Radojkovic D, Divac Rankov A. MiRNA-183 cluster in response to asthma treatment, ERS International Congress 2016, London, the United Kingdom, 2016, PA4110
6. **Dragicevic S**, Krnjajic M, Vlajnic M, Djikic-Rom, Radojkovic D, Krivokapic Z, Nikolic A. Association between cell-free DNA levels and histopathological characteristics of primary colorectal tumors, Workshop Translating colorectal cancer research, Portuguese Oncology Institute, Porto, Portugal, 2017, Abstract book, p. 47.

7. Despotovic S, **Dragicevic S**, Divac Rankov A, Nikolic A. Role of miR-21 on apoptosis in SW480 colorectal cancer cells, Workshop Translating colorectal cancer research, Portuguese Oncology Institute, Porto, Portugal, 2017, Abstract book, p. 45.

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. Cumbo M, **Dragicevic S**, Nikolic A. Analysis of TGF-B1 G-800A promoter polymorphism in childhood asthma, Belgrade International Molecular Life Science Conference for Students, Belgrade, Serbia, 2014, Књига сажетака, стр. 29.
2. **Dragicevic S**, Petrovic-Stanojevic N, Nikolic A. Analysis of TGF-B1 promoter polymorphisms in asthma, V Congress of Serbian Genetic Society, Belgrade, Serbia, 2014, Књига сажетака, стр. 40.
3. Babic T, Mark K, **Dragicevic S**, Milosevic K, Nestorovic B, Beskoski V, Nikolic A, Analysis of proteomic profiles of blood leukocytes in response to dapsone, 1st Congress of Molecular Biologists of Serbia, 2017, Књига сажетака, стр. 107.

4. МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Докторска дисертација кандидаткиње **Сандре З. Драгичевић**, под насловом „Анализа промоторских варијанти гена *TGFBI* као фактора ризика и модулятора одговора на терапију астме“ представља оригиналан научни рад са јасно дефинисаним циљевима заснованим на добром познавању научне проблематике и са адекватно планираним и успешно реализованим експериментима, уз поштовање етичких и научних норми. Остварени су задаци постављени у циљу истраживања. Детектоване су промоторске варијанте -509C>T и -800G>A за које асоцијативном студијом није показана повезаност са патогенозом астме, али је уочена потенцијална повезаност између промоторске варијанте -509C>T и егзацербација болести. Ово је прва студија која је испитала утицај промоторске варијанте -800G>A на контролу болести, као и да ли антагонисти леукотријенских рецептора имају директан утицај на експресију гена *TGFBI* и да ли он зависи од варијанти присутних у регулаторном региону гена. Показано је да промоторска варијанта -509C>T има модулаторну улогу у одговору гена *TGFBI* на дејство монтелукаста. Тиме је постављена основа за даља истраживања везана за могућност генетичког тестирања пре одлуке о примени овог лека у лечењу пацијената оболелих од астме.

Сандра З. Драгичевић је кроз рад на докторској дисертацији показала зрелост, истрајност и висок степен самосталности који треба да красе сваког успешног кандидата за стицање звања доктора наука. Део резултата ове дисертације је публикован у два оригинална рада и представљен на пет међународних и једној националној конференцији.

На основу увида у експериментални рад, постигнуте резултате као и написану докторску тезу, закључујемо да су задаци постављени у циљевима испуњени у потпуности, а добијени резултати поред доприноса базичним истраживањима имају и транслациони потенцијал. Стога са задовољством предложемо Наставно-научном већу Биолошког факултета, Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену докторске дисертације **Сандре З. Драгичевић**, под насловом „**Анализа промоторских варијанти гена *TGFB1* као фактора ризика и модулятора одговора на терапију астме**“ и омогући кандидаткињи јавну одбрану рада.

У Београду, 16. 10. 2017. године.

КОМИСИЈА:

др Александра Николић, виши научни сарадник
Института за молекуларну генетику
и генетичко инжењерство Универзитета у Београду

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

др Драгица Радојковић, научни саветник
Института за молекуларну генетику
и генетичко инжењерство Универзитета у Београду