

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На Х редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 05.09.2016. године, прихваћен је извештај ментора др Александре Станковић, научног саветника и доц. др Катарине Зељић о урађеној докторској дисертацији **Ивана Г. Јовановића**, истраживача-сарадника, Универзитет у Београду, Институт за нуклеарне науке "Винча", под насловом „**Анализа експресије целокупног генома у циљу идентификације кључних гена и микро РНК за настанак урођених анормалија бубрега и уринарног тракта човека**“. На истој седници одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу др Александра Станковић, научни саветник, Универзитет у Београду – Институт за нуклеарне науке „Винча“ – ментор, др Катарина Зељић, доцент, Универзитет у Београду – Биолошки факултет – ментор, др Марина Стаменковић-Радак, редовни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет – члан комисије.

Комисија је прегледала докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Ивана Г. Јовановића** под насловом „**Анализа експресије целокупног генома у циљу идентификације кључних гена и микро РНК за настанак урођених анормалија бубрега и уринарног тракта човека**“, написана је на 127 страна и подељена у седам поглавља: **Увод** (24 стране), **Хипотеза и циљеви** (2 стране), **Материјал и методе** (17 страна), **Резултати** (29 страна), **Дискусија** (21 страна), **Закључци** (2 стране) и **Литература** (32 стране). Резултати представљени у дисертацији илустровани су графицима и сликама (11), а део резултата представљен је табеларно (15). У дисертацији је цитирано 274 библиографских јединица. Осим тога рад садржи и податке о менторима, сажетак на српском и енглеском језику, податке о дисертацији, списак скраћеница, садржај, биографију кандидата и потписане изјаве.

Анализа докторске дисертације:

У поглављу **Увод** је свеобухватно дат преглед података релевантних за сагледавање теоретске основе дисертације и истраживања која се односе на разматрану проблематику. Кандидат даје преглед информација које описују нормално развиће уринарног система као и клиничке карактеристике урођених аномалија бубрега и уринарног тракта (енгл. *Congenital Anomalies of Kidney and Urinary Tract* – САКУТ) човека. Кандидат износи тренутно стање у истраживању генетичке основе САКУТ-а и указује на чињеницу да се још увек мало зна о кључним генима и њиховим интеракцијама у оквиру комплексних молекуларних мрежа приликом настанка САКУТ-а. У овом поглављу се описује и важност савремене технологије генског експресионог чипа – ГЕЧ (енгл. *Genome-wide gene expression microarray*), и модерних биоинформатичких приступа у анализи експресије целокупног генома, у циљу проналажења кључних гена за настанак болести. Даље кандидат даје детаљан преглед литературних података о биологији микро РНК (miRNA), њиховом великом потенцијалу за примену у терапеутске и дијагностичке сврхе као и о досадашњим сазнањима о њиховој улози у настанку САКУТ-а. Кандидат истиче важност биоинформатичког приступа у изучавању биологије miRNA и описује различите приступе у предикцији miRNA везујућих места. Такође кандидат описује ко-експресиону мета анализу miRNA циљних гена (енгл. *Co-expression Meta-analysis of miRNA Target genes* - CoMeTa) која уводи новитете у предикцију miRNA везујућих места и функционалну анализу појединачних miRNA. Даље кандидат описује нову методу звану ко-инерциона анализа (CIA), која врши интеграцију података о генској експресији са ГЕЧ и предикције везујућих места различитих miRNA у циљу асоцијације активности специфичних miRNA са карактеристичним експресионим профилима у различитим стањима или болестима.

У поглављу **Хипотеза и циљеви** дата је хипотеза и описани су циљеви. На основу литературних података се може очекивати да експресиони профил кључних гена у ткиву уретера код деце са САКУТ-ом треба да се разликује на нивоу iRNA од експресионог профила контролног ткива приликом одређивања експресије целокупног генома. Такође се претпоставља да је промена експресије гена делом изазвана и измењеном активношћу одређених miRNA, па би се на основу разлике у експресионом профилу целокупног генома у оболелом и здравом ткиву и предикција везујућих места miRNA могло закључити које би miRNA могле бити асоциране са САКУТ-ом.

У поглављу **Материјал и методе** дефинисана је и описана група пацијената (деца са различитим формама САКУТ-а) и група здравих контрола (адултни донори бубрега) од којих је узорковано ткиво уретера које је коришћено за анализу ткивно специфичне експресије гена и miRNA, као и број узорака укључених у сваки део студије појединачно. Кандидат такође описује апаратуру и методологију коришћену у студији. Кандидат даје детаљан опис екстракције укупне RNA из узорака ткива уретера и методе обраде RNA узорака за одређивање експресије целокупног генома технологијом ГЕЧ, као и за валидацију експресије одабраних гена и miRNA qRT-PCR методом. У овом поглављу су детаљно описане и статистичке методе коришћене за анализу података са ГЕЧ и идентификацију кључних диференцијално експримираних гена између пацијената и контрола, као и за анализу у експериментима валидације експресије одабраних гена и

miRNK. Кандидат описује и биоинформатичке методе *DAVID* и *IPA*, коришћене за давање биолошког смисла великој листи диференцијално експримираних гена, систематичним мапирањем у биолошке анотационе термине, као и за алгоритамско креирање кључних молекуларних мрежа у САКУТ-у. У овом поглављу је такође описан процес валидације CIA и интеграције CoMeTa предикција у CIA као и начин њихове употребе у одређивању кључних miRNK у САКУТ-у.

У поглављу **Резултати** су добијени резултати изложени у 15 табела и илустровани са 11 слика. Добијени резултати се могу укратко сумирати на следећи начин:

Анализа података о експресији целокупног генома, добијених са ГЕЧ-а, резултовала је идентификацијом 87 статистички значајно диференцијално експримираних проба које покривају експресију транскрипта 78 гена. Од идентификованих диференцијално експримираних гена, 51 ген је имао снижену а 27 гена повишену експресију на нивоу iRNK у САКУТ-у у односу на контроле.

Систематичним мапирањем диференцијално експримираних гена у биолошке анотационе термине генске онтологије (енгл. *Gene Ontology - GO*) софтвером *DAVID*, идентификовано је 17 биолошких процеса и 2 молекуларне функције који су статистички значајно асоцирани са диференцијално експримираним генима. Значајни биолошки процеси, диференцијално регулисани између пацијената са САКУТ-ом и контрола су апоптотски и инфламаторни процеси као и неуробиолошки процеси што показује развојно и функционално јединство уринарног и нервног система (регулација трансмисије нервних импулса, регулација синаптичке трансмисије, одговор на механички стимулус) што је у сагласности са резултатима досадашњих студија које ове процесе описују као кључне за настанак опструкције уретера и за губитак бубрежне функције након тога. Једна од значајних молекуларних функција од интереса у студији било је и везивање кадмијумових јона што је у сагласности са досадашњим доказима о нефротоксичности кадмијума. Такође је идентификована и потенцијално измењена биосинтеза хепаран сулфата, важног развојног и физиолошког фактора у уринарном систему.

Анализом диференцијално експримираних гена софтвером *IPA* добијено је седам молекуларних мрежа, од којих четири садрже гене са функцијама које се директно могу асоцирати са САКУТ-ом. Валидацијом најважнијих молекуларних мрежа у САКУТ-у qRT-PCR методом утврђен је значајно повишен ниво iRNK за *LCN2* (7,6 пута), *PROM1* (8 пута) и *SOSTDC1* (5,6 пута) и значајно снижен ниво iRNK за *RASD1* (4,5 пута), *INA* (3,3 пута) и *TAC3* (6,6 пута) у ткиву уретера деце са САКУТ-ом у односу на здраве контроле.

Обзиром на то да пре ове студије нису постојали подаци о експресији целокупног генома на узорцима са САКУТ-ом код човека, валидација CIA методе је урађена на јавно доступним подацима о експресији целокупног генома у два доступна фенотипа, раном и узнапредовалом атеросклеротском плаку. Идентификовано је 17 miRNK са потенцијално повишеном експресијом у раном плаку у односу на узнапредовали плак и 12 miRNK са потенцијално повишеном експресијом узнапредовалом плаку у односу на рани плак. Претрагом литературе је показано да 5 miRNK асоцираних са узнапредовалом атеросклерозом учествује у процесима одговорним за прогресију атеросклерозе. Са друге стране, 3 miRNK које је CIA препознала као карактеристичне за рани плак су у литератури описане у процесима протективним у контексту прогресије плака.

Применом комбинације валидиране CIA и CIA са CoMeTa интеграцијом на подацима о експресији целокупног генома добијеним у овој дисертацији у ткиву уретера деце са САКУТ -ом и здравих контрола идентификовано је 7 кључних miRNA које имају потенцијално повишену експресију у САКУТ-у и припадају мањем броју miRNA заједница, које деле значајан део низводне регулаторне мреже синергистичком регулацијом заједничких гена. У узорцима ткива уретера деце са САКУТ-ом и здравих контрола је детектована и квантификована експресија *mir-144*, *mir-200a*, *mir-183* и *mir-375* на нивоу доминантне зреле форме. Валидацијом кључних miRNA qRT-PCR методом је идентификован значајно повишен ниво miR-144 (5,7 пута) у ткиву уретера деце са САКУТ-ом у односу на здраве контроле. Биоинформатичком анализом циљних гена ове miRNA је утврђено да она регулише процесе одговорне за нормално развиће уринарног система.

У поглављу **Дискусија** кандидат даје детаљну анализу добијених експерименталних резултата и интерпретира их у односу на одговарајућу литературу. Ово поглавље је подељено у неколико одељака што доприноси бољем разумевању и тумачењу резултата сопствених истраживања у односу на резултате објављене у постојећој научној литератури. У првом одељку кандидат дискутује резултате биоинформатичких анализа диференцијално експримираних гена и наглашава да је новина у истраживаном пољу до сада неистражена системска интеракција описаних диференцијално експримираних гена који на најконцизнији начин рекапитулирају досадашња сазнања о биолошким процесима у САКУТ-у на нивоу целокупног уринарног система. Кандидат такође дискутује о генима чија је експресија коришћена за валидацију кључних молекуларних мрежа и њихове функције ставља у контекст описаних патолошких процеса одговорних за настанак САКУТ-а.

У другом одељку, кандидат дискутује о предностима интегративне стратегије у идентификацији miRNA асоцираних са стањем или обољењем и о предностима комбинације алгоритама за предикцију miRNA везујућих места. Кандидат даље дискутује који су могући разлози повишеног нивоа miR-144 у САКУТ-у у односу на контроле и који су молекуларни ефекти тог повишења.

На крају дискусије, кандидат критично описује ограничења студије.

У поглављу **Закључци**, кандидат Иван Јовановић сумира најважније закључке који произилазе из експерименталних резултата добијених у докторској дисертацији и прегледане литературе. Главни закључци докторске дисертације су следећи:

1. Утврђено је 78 диференцијално експримираних гена анализом експресије целокупног генома у ткиву уретера деце са САКУТ-ом у односу на здраве контроле.
2. Утврђено је да постоји висок ниво комплексности биолошких процеса и молекуларних путева који су у САКУТ-у диференцијално регулисани. Важне интеракције диференцијално експримираних гена у САКУТ-у се могу представити са 7 мрежа, од којих 4 садрже гене са функцијама које се директно могу асоцирати са САКУТ-ом. Ове мреже су уједно и приказ интеракција кључних молекула у САКУТ-у и представљају темељ будућих функционалних студија.

3. Утврђене су промене у нивоима iRNK за *LCN2*, *PROM1*, *SOSTDC1*, *RASD1*, *INA* и *TAC3* у ткиву уретера пацијената у поређењу са контролним ткивом, које могу бити молекуларни маркери за САКУТ. Валидацијом најважнијих молекуларних мрежа у САКУТ-у утврђен је значајно повишен ниво iRNK за *LCN2* (7,6 пута), *PROM1* (8 пута) и *SOSTDC1* (5,6 пута) и значајно снижен ниво iRNK за *RASD1* (4,5 пута), *INA* (3,3 пута) и *TAC3* (6,6 пута) у ткиву уретера деце са САКУТ-ом у односу на здраве контроле.
4. Метода CIA базирана на алгоритмима за предикцију везујућих места за miRNK заснованим на секвенци је валидирана на јавно доступним подацима о експресији целокупног генома и показала се успешном у идентификовању већег броја miRNK специфичних за одређени фенотип.
5. Комбинација методе CIA базиране на пет алгоритама за предикцију везујућих места за miRNK заснованих на секвенци и методе CIA базиране на предикцијама везујућих места за miRNK по алгоритму CoMeTa је валидирана на подацима о експресији целокупног генома у ткиву уретера деце са САКУТ-ом и здравих контрола и показала се успешном у идентификовању специфичних кључних miRNK са потенцијално повишеном експресијом у САКУТ-у у односу на здраве контроле.
6. Утврђено је да miRNK са потенцијално повишеном експресијом у САКУТ-у у односу на здраве контроле припадају мањем броју miRNK заједница, које деле значајан део низводне регулаторне мреже синергистичком регулацијом заједничких гена. Дакле, боље рангиране miRNK у методи CIA из исте заједнице имају већи потенцијал да регулишу исте процесе, који могу бити одговорни за настанак САКУТ-а.
7. У узорцима ткива уретера деце са САКУТ-ом и здравих контрола детектована је и квантификована експресија *mir-144*, *mir-200a*, *mir-183* и *mir-375*.
8. Утврђено је да постоји значајно повишен ниво miR-144 (5,7 пута) у ткиву уретера деце са САКУТ-ом у односу на здраве контроле. Резултат указује да повишени ниво miR-144 у ткиву уретера пацијената може бити молекуларни маркер за САКУТ.
9. Утврђено је да miR-144 потенцијално регулише гене укључене у биолошке процесе одговорне за нормално развиће уринарног система.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Радови у часописима међународног значаја

1. Jovanovic I, Zivkovic M, Kostic M, Krstic Z, Djuric T, Kolic I, Alavantic D, Stankovic A. Transcriptome-wide based identification of miRs in congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) in children: the significant upregulation of tissue miR-144 expression. Journal of Translational Medicine. 2016;14(1):193. **M21**
2. Jovanovic I, Zivkovic M, Jovanovic J, Djuric T, Stankovic A. The co-inertia approach in identification of specific microRNA in early and advanced atherosclerosis plaque. Medical hypotheses 2014;83(1):11-15. **M23**

Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Jovanović I, Živković M, Jovanović J, Đurić T, Stanković A. The prediction of potentially new microRNA biomarkers for advanced atherosclerosis using Co-inertia analysis. V Congress of the Serbian Genetic Society, Kladovo, Serbia, September 28th - October 2nd 2014. **M34**
2. Jovanović I, Živković M, Jovanović J, Đurić T, Stanković A. The improvement of microRNA activity prediction: The integration of Co Expression Meta Analysis of microRNA Targets into Co-Inertia analysis. NGS and non-coding RNA data analysis workshop II, COST SeqAhead, University of Plovdiv, Bulgaria, 15-16 May 2014. **M34**

Мишљење и предлог Комисије:

На основу свега изложеног Комисија сматра да докторска теза **Ивана Г. Јовановића** под насловом „Анализа експресије целокупног генома у циљу идентификације кључних гена и микро РНК за настанак урођених анормалија бубрега и уринарног тракта човека“ представља оригиналан и значајан допринос разумевању молекуларне патологије урођених анормалија бубрега и уринарног тракта човека. Треба посебно нагласити да резултати добијени у овој докторској дисертацији могу имати апликативни потенцијал у персонализованој медицини у циљу превенције или одлагања губитка функције бубрега која води хемодијализи и трансплантацији. Такође, добијени резултати би могли бити од значаја у даљем испитивању јер до сада неистражена системска интеракција описаних кључних гена и miRNA представља основу и смерницу за будуће функционалне студије. Током израде дисертације кандидат је показао висок степен познавања научне основе проблематике, добро је дефинисао хипотезу и циљеве, применио адекватне методе у истраживању и обради добијених резултата које је критички дискутовао, уз исцрпне податке из литературе.

Неоспоран квалитет дисертације потврђује и чињеница да је део резултата до сада објављен у међународним часописима и саопштењима на међународним скуповима што додатно потврђује мишљење Комисије да резултати тезе представљају значајан помак у испитивању генетичке основе урођених анормалија бубрега и уринарног тракта човека.

На основу свега наведеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри Ивану Г. Јовановићу јавну одбрану докторске дисертације.

У Београду, 19.10.2016.

КОМИСИЈА

др Александра Станковић, научни саветник
Универзитет у Београду - Институт за нуклеарне науке „Винча“

др Катарина Зељић, доцент
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Марина Стаменковић-Радак, редовни професор
Универзитет у Београду - Биолошки факултет