

Биолошки факултет
Број захтева:50/153-1
Датум: 14.06.2022.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на одлуку о прихватању теме докторске дисертације и о одређивању ментора

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 186/15-пречишћени текст, 189/16), дате сагласност на одлуку о прихватању теме докторске дисертације:

„Повезаност соматске нестабилности низа (CTG)n и метилације ДНК у гену *DMPK* са прогресијом захваћености скелетних мишића и кардиолошких симптома код особа са миотоничном дистрофијом типа 1”

НАУЧНА ОБЛАСТ: Биолошке науке.

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име, име једног родитеља и презиме кандидата:

Немања Д. Радовановић

2. Претходно образовање (назив и седиште факултета, студијски програм):

Универзитет у Београду - Биолошки факултет.

3. Година дипломирања: 2018.

4. Година уписа на докторске студије: 2019/2020.

Универзитет у Београду - Биолошки факултет

5. Назив студијског програма докторских студија: Молекуларна биологија, модул: Молекуларна биологија еукариота.

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

Име и презиме ментора: **др Душанка Савић-Павићевић,**

Звање: редовни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет.

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Peric S, Pesovic J, Savic-Pavicevic D, Rakocovic Stojanovic V, Meola G. Molecular and Clinical Implications of Variant Repeats in Myotonic Dystrophy Type 1. *Int J Mol Sci.* 2021; 23(1):354. doi: 10.3390/ijms23010354.
2. Pešović J, Perić S, Brkušnin M, Brajušković G, Rakočević-Stojanović V, Savić-Pavićević D. Repeat Interruptions Modify Age at Onset in Myotonic Dystrophy Type 1 by Stabilizing DMPK Expansions in Somatic Cells. *Front Genet.* 2018; 9:601. doi: 10.3389/fgene.2018.00601.
3. Peric S, Maksimovic R, Banko B, Durdic M, Bjelica B, Bozovic I, Balcik Y, Pesovic J, Savic-Pavicevic D, Rakocovic-Stojanovic V. Magnetic resonance imaging of leg muscles in patients with myotonic dystrophies. *J Neurol.* 2017; 264(9):1899-1908. doi: 10.1007/s00415-017-8574-0.
4. Pešović J, Perić S, Brkušnin M, Brajušković G, Rakočević-Stojanović V, Savić-Pavićević D. Molecular genetic and clinical characterization of myotonic dystrophy type 1 patients carrying variant repeats within DMPK expansions. *Neurogenetics.* 2017; 18(4):207-218. doi: 10.1007/s10048-017-0523-7.
5. Rakočević-Stojanović V, Perić S, Pešović J, Senčanić I, Božić M, Šviković S, Brkušnin M, Savić-Pavićević D. Genetic testing of individuals with pre-senile cataract identifies patients with myotonic dystrophy type 2. *Eur J Neurol.* 2017; 24(11):e79-e80. doi: 10.1111/ene.13401.

Обавештамо вас да је Наставно-научно веће Универзитета у Београду-Биолошког факултета, на седници одржаној 14. 06. 2022. год. размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације јер садржи оригиналну идеју и да је од значаја за развој науке, примену њених резултата, односно развој научне мисли уопште.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Љубиша Станисављевић

Прилог:

1. Предлог теме докторске дисертације са образложењем.
2. Акт надлежног тела факултета о подобности теме за израду докторске дисертације.
3. Електронска верзија
4. Потврда Етичке комисије



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

50/153-14.06.2022.

На основу члана 96. Закона о високом образовању, члана 62. став 1. тачка 12. Статута Универзитета у Београду-Биолошког факултета и члана 29. Правилника о докторским студијама на Универзитету у Београду-Биолошком факултету, бр: 15/276 од 07.09.2018; 15/122 од 14.06.2019.; 15/132 од 11.09.2020. године., Наставно-научно веће Факултета, на VIII редовној седници одржаној 14. 06. 2022. године, донело је

О Д Л У К У

о прихватању теме докторске дисертације и одређивању ментора

На основу Извештаја Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације прихвата се тема докторске дисертације и одређује ментор кандидату:

Немањи Д. Радовановићу, мастер биолог, студијског програма докторских студија: Молекуларна биологија, модул: Молекуларна биологија еукариота, под називом:

„Повезаност соматске нестабилности низа (CTG)_n и метилације ДНК у гену DMPK са прогресијом захваћености скелетних мишића и кардиолошких симптома код особа са миотоничном дистрофијом типа 1”

За менторе се одређују:

1. др Душанка Савић-Павићевић, редовни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Љубиша Станисављевић

Доставити:

- Универзитету у Београду,
- докторанту,
- ментору;
- Стручној служби Факултета

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду одржаној 13.05.2022. године, одређени смо у Комисију за оцену испуњености услова и научне заснованости предложене теме за израду докторске дисертације **Немање Д. Радовановића**, под насловом: „**Лонгитудинална анализа повезаности соматске нестабилности CTG мотива у гену DMPK и прогресије мишићних и кардиолошких симптома код миотоничне дистрофије типа 1**”.

На основу поднете документације и увида у досадашњи рад **Немање Д. Радовановића**, Комисија подноси Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду следећи:

ИЗВЕШТАЈ

А. Биографија:

Општи подаци:

Име, средње слово, презиме: Немања Д. Радовановић

Датум и место рођења: 22. септембар 1994. године, Краљево, Република Србија

Образовање:

- | | |
|-----------|--|
| 2019- | Докторске академске студије, Универзитет у Београду-Биолошки факултет, програм Молекуларна биологија, модул Молекуларна биологија еукариота |
| 2018-2019 | Мастер академске студије, Универзитет у Београду-Биолошки факултет, програм Молекуларна биологија и физиологија, модул Хумана молекуларна биологија (просечна оцена 10,00) |
| 2013-2018 | Основне академске студије, Универзитет у Београд-Биолошки факултет, програм Биологија, модул Молекуларна биологија и физиологија (просечна оцена 8,64) |

Запослење:

- | | |
|-------|--|
| 2019- | Истраживач приправник, Универзитет у Београду-Биолошки факултет, Катедра за биохемију и молекуларну биологију, Центар за хуману молекуларну генетику |
|-------|--|

Пројекти:

Национални пројекти:

- „Understanding repeat expansion dynamics and phenotype variability in myotonic dystrophy type 1 through human studies, nanopore sequencing and cell models – READ-DM1” (Ев. бр. 7754217), програм ИДЕЈЕ, Фонд за науку, Републике Србије, руководилац проф. Душанка Савић-Павићевић, 2022-2025

- „Анализа промена у структури генома као дијагностички и прогностички параметар хуманих болести“ (Ев. бр. 173016), МПНТР Републике Србије, руководилац проф. Душанка Савић-Павићевић, 2018-2019.

Чланство у научним друштвима:

- Српско друштво за молекуларну биологију
- Друштво генетичара Србије
- Српско биолошко друштво

Страни језици:

- Енглески језик (напредни ниво)
- Јапански језик (почетни ниво)

Посебне активности и награде:

2014. Недеља свести о мозгу „Сурфуј можданим таласима“. Организатор: Студентска секција Друштва за неуронауке Србије
2015. Недеља свести о мозгу „Моза(и)к у нашим главама“. Организатор: Студентска секција Друштва за неуронауке Србије
2019. Четврта петничка школа молекуларне биологије „ПЦР у биолошким и биомедицинским истраживањима“. Организатор: Одељење за биологију Истраживачке станице Петница и Центар за хуману молекуларну генетику Биолошког факултета Универзитета у Београду
- 2020- Реализација практичне наставе на курсу Молекуларна биологија еукариота, обавезни предмет за студенте треће године модула Молекуларна биологија и физиологија, Универзитет у Београду-Биолошки факултет.

Б) Библиографија:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. .

Б2. Радови у часописима домаћег значаја

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја штампана у целости

Б4. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја штампана у изводу

Б5. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

В. Тема докторске дисертације:

Наслов дисертације:

„Повезаност соматске нестабилности низа (CTG)_n и метилације ДНК у гену *DMPK* са прогресијом захваћености скелетних мишића и кардиолошких симптома код особа са миотоничном дистрофијом типа 1”

Полазне основе:

Миотонична дистрофија тип 1 (ДМ1, MIM#160900) је најчешћа мишићна дистрофија одраслих особа са клиничком учесталошћу 1 у 8000 особа и учесталошћу носилаца мутације 1 у 2000 особа. Клинички ток болести је прогресиван, а оболеле особе имају тежак степен инвалидитета и скраћен животни век. Карактеристични симптоми болести су миотонија, слабост и атрофија скелетних мишића, и низ мултисистемских симптома који обухватају кардиолошке, неуролошке и ендокрине поремећаје. У зависности од узраста при појави првих симптома, разликује се пет клиничких форми болести: конгенитална, дечија, јувенилна, адултна и касна. ДМ1 се наслеђује аутозомно-доминантно и одликује се израженом генетичком антиципацијом. Узрочна мутација је нестабилно повећање броја (експанзија) узастопно поновљених CTG мотива у 3' нетранслатирајућем региону гена *DMPK* (MIM#605377). Оболеле особе имају од 50 до неколико хиљада CTG мотива. Уопштено, што је број поновљених мотива већи, болест се раније испољава и има тежи клинички ток.

ДМ1 спада у најваријабилније моногенске болести, како са аспекта фенотипа, тако и са аспекта генетичких и епигенетичких особина узрочне мутације. Варијабилност клиничке презентације огледа се не само у симптомима који се испољавају код датог болесника, већ и у редоследу њиховог појављивања, што отежава предвиђање тока болести и правовремено симптоматско лечење [1]. Генетичка варијабилност се огледа не само у броју поновљених мотива (величини експанзије) [2,3], већ и у структурним варијацијама експанзије (присуство варијантних мотива) [4], док се епигенетичка варијабилност огледа у различитом степену локалне метилације ДНК зависном од броја поновљених мотива и присуства варијантних мотива [5,6,7].

Молекуларном основом прогресије болести сматра се изражена соматска нестабилност *DMPK* експанзије [2]. Соматска нестабилност мутације је континуирана током живота болесника, зависи од величине наслеђене експанзије, а догађаји повећања броја CTG мотива су чешћи него догађаји смањења броја мотива тако да се величина експанзије током времена повећава [3]. Студије на болесницима су показале да особе са израженијим степеном соматске нестабилности развијају симптоме болести раније него што би се очекивало само на основу броја поновљених CTG мотива [2,8]. Истовремено, резултати ових студија указују на то да постоје фактори који модификују ефекат наслеђеног броја CTG мотива на соматску нестабилност мутације, а тиме и њихов ефекат на прогресију болести.

Иако је соматска нестабилност *DMPK* експанзије постала мета иновативних каузалних терапија, индивидуалне разлике у соматској нестабилности међу болесницима као и њена повезаност са прогресијом симптома ДМ1 су недовољно испитани. Од интереса су симптоми везани за скелетне мишиће и срце, као и разумевање клиничке релевантности локалне метилације ДНК. Прогресија захваћености скелетних мишића и

поремећаји срчане проводљивости су главни узрочници инвалидитета и скраћеног животног века болесника [1]. Локална хиперметилација је описана код болесника са структурним варијацијама експанзије који имају мање изражену соматску нестабилност [5,7]. Да би се даље испитала повезаност локалне метилације ДНК и соматске нестабилности, потребно је окарактерисати је и код болесника који немају структурне варијације у *DMPK* експанзијама. Досадашња истраживања указују на то да се код таквих болесника детектује низак ниво метилације ДНК, чија повезаност са соматском нестабилношћу и клиничка релевантност остају непознате због независног испитивања од соматске нестабилности [5] и недостатка контрола у студијама [5,6].

Предмет докторске дисертације

Предмет докторске дисертације је испитивање молекулских аспеката прогресије захваћености скелетних мишића и кардилошких симптомима миотоничне дистрофије типа 1 у ретроспективној лонгитудиналној студији болесника.

Научни циљ истраживања

Циљеви истраживања су:

- Анализа експанзије СТG мотива у гену *DMPK* у две временске тачке одређивањем величине експанзије, степена соматске нестабилности, временске динамике соматске нестабилности, као и међусобне зависности ових параметара.
- Анализа метилације ДНК узводно и низводно од (СТG)_n низа у гену *DMPK* у две временске тачке код болесника и контрола одређивањем нивоа метилације ДНК и њене повезаности са величином и степеном соматске нестабилности *DMPK* експанзије.
- Анализа повезаности временске динамике соматске нестабилности експанзије СТG мотива и метилације ДНК у гену *DMPK* са прогресијом захваћености скелетних мишића, поремећаја срчане проводљивости и кардиомиопатије код ДМ1 болесника са дечијом, јувенилном, адултном и касном формом болести.

Материјал и методе који се користе

Студија на болесницима има ретроспективни лонгитудинални дизајн и обухватиће 40 болесника са генетички потврђеном дијагнозом ДМ1. Студија је одобрена од стране Етичког одбора Универзитетског клиничког центра Србије (бр. 745/3, 28.04.2022. године). Болесници ће бити регрутовани из Српског регистра за миотоничне дистрофије Клинике за неурологију Универзитетског клиничког центра Србије. Укључни критеријуми ће бити: старост преко 18 година, присуство дечије, јувенилне, адултне или касне форме болести, доступност демографских података (пол и узраст при клиничком испитивању), доступност податка о узрасту појаве првих симптома, доступност ДНК узорка из крви из две временске тачке са интервалом дужим од пет година и доступност параметра за процену захваћености скелетних мишића (енг. Muscular Impairment Rating Scale, MIRS) и електро- и ехокардиографских параметара из истих временских тачака када је узоркована крв за изоловање ДНК. Додатно, како би се испитао образац

метилације ДНК у гену *DMPK* специфичан за ДМ1, студија ће укључити и 20 контролних испитаника (са бројем CTG мотива у нормалном опсегу варирања и без историје ДМ1 у породици) који ће бити упарени по полу и узрасту са болесницима и којима је крв узоркована у две временске тачке са размаком од пет година.

Узорци ДНК болесника из две временске тачке биће анализирани применом *single cell small-pool* PCR-а. За сваки узорак биће урађено 20-30 реплика тако да се детектовало око 150 алела. Дужине појединачних алела биће одређене коришћењем софтверског пакета TotalLab Quant. На основу добијене дистрибуције учесталости величине алела, експанзија CTG мотива ће бити окарактерисана објективним статистичким параметрима: десетим перцентилом (као мером за најбољу процену наслеђене величине експанзије), модалном величином, и деведесетим перцентилом. Степен соматске нестабилности сваког узорака биће одређен као разлика деведесетог и десетог перцентиала величине експанзије, односно модалног и десетог перцентиала величине експанзије. Временска динамика соматског мозаицизма за сваког болесника биће одређена као разлика у модалној величини експанзије између две временске тачке.

Метилација ДНК у секвенцама узводно и низводно у односу на (CTG)_n низ у узорцима болесника и контрола из две временске тачке биће анализирана бисулфитним Illumina секвенцирањем. Обрада сирових података биће вршена применом софтверских алата платоформе Galaxy. За сваки анализирани узорак биће реконструисани епигенетски профили и биће одређен степен метилације по појединачном CpG динуклеотиду.

Испитивање повезаности захваћености слабости скелетних мишића и кардиолошких симптома, као и њихове прогресије биће урађено одговарајућим статистичким тестовима за континуиране и категоријске варијабле.

Најважнији литературни подаци који подржавају тему (до 10 референци)

1. Rakocovic-Stojanovic V, Peric S, Basta I, Dobricic V, Ralic V, Kacar A, Peric M, Novakovic I. Variability of multisystemic features in myotonic dystrophy type 1--lessons from Serbian registry. *Neurol Res.* 2015;37 (11):939-44. doi: 10.1179/1743132815Y.0000000068.
2. Morales F, Couto JM, Higham CF, Hogg G, Cuenca P, Braidia C, Wilson RH, Adam B, del Valle G, Brian R, Sittenfeld M, Ashizawa T, Wilcox A, Wilcox DE, Monckton DG. Somatic instability of the expanded CTG triplet repeat in myotonic dystrophy type 1 is a heritable quantitative trait and modifier of disease severity. *Hum Mol Genet.* 2012; 21(16):3558- 67. doi: 10.1093/hmg/dds185.
3. Monckton DG, Wong LJ, Ashizawa T, Caskey CT. Somatic mosaicism, germline expansions, germline reversions and intergenerational reductions in myotonic dystrophy males: small pool PCR analyses. *Hum Mol Genet.* 1995; 4(1):1-8. doi: 10.1093/hmg/4.1.1.
4. Pešović J, Perić S, Brkušanić M, Brajušković G, Rakočević-Stojanović V, Savić-Pavićević D. Repeat Interruptions Modify Age at Onset in Myotonic Dystrophy Type 1 by Stabilizing DMPK Expansions in Somatic Cells. *Front Genet.* 2018; 9:601. doi: 10.3389/fgene.2018.00601.
5. Hildonen M, Knak KL, Dunø M, Vissing J, Tümer Z. Stable Longitudinal Methylation

Levels at the CpG Sites Flanking the CTG Repeat of DMPK in Patients with Myotonic Dystrophy Type 1. *Genes* (Basel). 2020; 11(8):936. doi: 10.3390/genes11080936.

6. Morales F, Corrales E, Zhang B, Vásquez M, Santamaría-Ulloa C, Quesada H, Sirito M, Estecio MR, Monckton DG, Krahe R. Myotonic dystrophy type 1 (DM1) clinical subtypes and CTCF site methylation status flanking the CTG expansion are mutant allele length-dependent. *Hum Mol Genet.* 2021; 31(2):262-274. doi: 10.1093/hmg/ddab243.
7. Pešović J. Mitotička i mejotička nestabilnost DMPK ekspanzija sa varijantnim ponovcima kao genetički modifikator fenotipa miotonične distrofije tip 1. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu. 2019.
8. Morales F, Vásquez M, Corrales E, Vindas-Smith R, Santamaría-Ulloa C, Zhang B, Sirito M, Estecio MR, Krahe R, Monckton DG. Longitudinal increases in somatic mosaicism of the expanded CTG repeat in myotonic dystrophy type 1 are associated with variation in age-at-onset. *Hum Mol Genet.* 2020; 29(15):2496-2507. doi: 10.1093/hmg/ddaa123.

Г. Закључак и предлог:

Комисија је мишљења да је предлог теме докторске дисертације Немање Д. Радовановића научно заснован, оригиналан и актуелан имајући у виду да соматска нестабилност експанзија поновљених мотива представља мету за развој иновативних каузалних терапија не само за миотоничну дистрофију типа 1, већ и друге болести нестабилних експанзија. Циљеви докторске дисертације су јасно дефинисани, док су дизајн студије на болесницима и предложена методологија адекватни. Резултати предложеног истраживања ће пружити увид у динамику соматске нестабилности и метилације ДНК у гену *DMPK*, њихову повезаност са прогресијом симптома који су примарни узрок инвалидитета и смртности болесника са миотоничном дистрофијом типа 1. Добијени резултати ће бити од интереса за даљи развој иновативних каузалних терапија и стратификацију болесника у клиничким студијама.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета да утврди предлог којим се Немањи Д. Радовановићу одобрава израда докторске дисертације под измењеним насловом **„Повезаност соматске нестабилности низа (CTG)_n и метилације ДНК у гену *DMPK* са прогресијом захваћености скелетних мишића и кардиолошких симптома код особа са миотоничном дистрофијом типа 1”**.

За ментора докторске дисертације предлаже се др Душанка Савић-Павићевић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Београд, 23.05.2022.

Комисија:

др Душанка Савић-Павићевић, редовни професор,
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Видосава Ракочевић Стојановић, редовни професор,
Универзитет у Београду-Медицински факултет

др Јован Пешовић, научни сарадник,
Универзитет у Београду-Биолошки факултет



УНИВЕРЗИТЕТСКИ КЛИНИЧКИ ЦЕНТАР

СРБИЈЕ

11000 БЕОГРАД; ПАСТЕРОВА 2,
РЕПУБЛИКА СРБИЈА

ЕТИЧКИ ОДБОР

11000 Београд, Пастерова 2
011 366-2080, 264-4850, Факс 011 306-7180

Број: 745/3

Дана: 28.04.2022. године

На основу Закона о здравственој заштити Републике Србије („Сл. гласник РС“ бр. 25/2019), Закона о правима пацијената („Сл. гласник РС“, бр. 45/13), Закона о заштити података о личности („Сл. гласник РС“, бр. 97/2008, 104/2009, идр. Закон), Закона о здравственој документацији и евиденцијама у области здравства („Сл. гласник РС“, бр. „, бр. 123/2014, 106/2015, 105/2017), поступајући у складу са одредбама Етичког одбора Универзитетског клиничког центра Србије бр. 175/9 од 29.04.2021. године, Етички одбор Универзитетског клиничког центра Србије у саставу: Проф. др Андрија Богдановић- председник, Проф. др Бранислава Миленковић, Проф. др Марина Светел, Проф. др Бранислава Ивановић, Проф. др Александра Перић- Попадић, Др сци мед Дијана Шефер, Проф. др Александра Јотић, Проф. др Милош Кораћ, Проф. др Александар Стефановић, Доц. др Данијел Галун и Проф. др Милан Латас –лекари специјалисти запослени у Универзитетском клиничком центру Србије, одлучујући о захтеву Асист. др Стојана Перића, на својој 14. седници одржаној путем електронског гласања, дана 28.04.2022. године, донео је следећу

ОДЛУКУ

Одобрава се спровође клиничког испитивања под називом: "Лонгитудална анализа повезаности соматске нестабилности СТГ мотива у гену *DMPK* и прогресије мишићних и кардиолошких симптома код миотоничне дистрофије типа 1".

Главни истраживач је Асист. др Стојан Перић.

Чланови истраживачког тима су: Асист. др Стојан Перић и Немања Радовановић.

Истраживач сарадник је Проф. др Душанка Савић- Павићевић.

Испитивање ће бити спроведено на Клиници за неурологију Универзитетског клиничког центра Србије, у сарадњи са Биолошким факултетом Универзитета у Београду.

Приликом доношења ове одлуке, Етички одбор је разматрао следећу документацију:

- 1). Захтев за одобрење академског клиничког испитивања поднет Етичком одбору УКЦС,
- 2). Протокол испитивања/ синопсис,
- 3). Сагласност колегијума Клинике за неурологију УКЦС број 23/173 од 07.04.2022. године,
- 4). Сагласност декана Биолошког факултета (Проф. др Љубиша Станисављевић) Универзитета у Београду од 04.03.2022. године,
- 5). Информације за пацијента са обрасцем за давање писаног пристанка и
- 6). Биографија главног истраживача.



ПРЕДСЕДНИК ЕТИЧКОГ ОДБОРА

Проф. др Андрија Богдановић