

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На VIII редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 14.06.2019. године, на основу молбе ментора др Светлане Радовић, редовног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду, и др Јелене Бркљачић, ванредног професора *The Ohio State University* у Охају, САД, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Милице С. Милутиновић**, истраживача сарадника у Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, под насловом „**Функционална карактеризација EML (EMSY-like) протеина као читача хистонских модификација са улогом у регулацији развића семена код *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.**”, у саставу: др Светлана Радовић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, др Јелена Бркљачић, ванредни професор *The Ohio State University* у Охају, САД, и др Данијела Мишић, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација **Милице С. Милутиновић** под насловом „**Функционална карактеризација EML (EMSY-like) протеина као читача хистонских модификација са улогом у регулацији развића семена код *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.**” написана је на укупно 154 страна компјутерски обрађеног текста.

Пагинирани текст (134 стране) садржи 8 поглавља докторске дисертације: **Увод** (стр. 1-31), **Циљ рада** (стр. 32), **Материјал и методе** (стр. 33-64), **Резултати** (стр. 65-95), **Дискусија** (стр. 96-109), **Закључци** (стр. 110), **Литература** (стр. 111-122) и **Прилози** (стр. 123-134). Дисертација садржи 32 слике (2 у поглављу Увод, 7 у поглављу Материјал и методе, 20 у поглављу Резултати, и 3 у поглављу Дискусија) и 22 табеле (1 у поглављу Увод, 6 у поглављу Материјал и методе, 2 у поглављу Резултати, и 13 у поглављу Прилози). Поглавље Литература садржи 212 библиографских јединица које су адекватно наведене у тексту. Непагинирани текст (15 страна на почетку и 5 страна на крају докторске дисертације) обухвата: насловне стране и сажетке на српском и енглеском језику, листу ментора и чланова комисије, захвалницу, садржај, листу скраћеница,

биографију, изјаву о ауторству, изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и изјаву о коришћењу.

Анализа докторске дисертације

Ова дисертација је из области физиологије и молекуларне биологије биљака.

У докторској дисертацији кандидат **Милица С. Милутиновић** је анализирао регулацију развића семена код биљке *Arabidopsis thaliana*, са посебним освртом на улогу EML протеина у читању одређених модификација хистона у семену, као и улогу ових гена у контроли ендогеног нивоа ауксина и његову компартментизацију која је неопходна за нормално формирање семена.

Поглавље **УВОД** се састоји из девет потпоглавља са детаљним приказом литературних података који подржавају проблематику докторске дисертације, са акцентом на развиће семена и факторе који утичу на развиће ембриона и семена. У прва два потпоглавља је истакнуто да се регулација експресије гена у еукариотским ћелијама одвија на више нивоа и представља један од најистраживанијих процеса у области молекуларне биологије. Појава да један регулаторни протеин у комбинацији са другим регулаторним протеинима учествује у регулацији транскрипције различитих гена назива се комбинаторна контрола. Од деведесетих година прошлог века једна од важних тема истраживања, поред структурне улоге, јесте и улога хистона у регулацији експресије гена еукариота. Треће потпоглавље обухвата кратак преглед података који се тичу епигенетике и хистонских „репова” као места посттранслационих модификација која мењају структуру појединачних нуклеозома и хроматина. Посттранслационе ковалентне модификације (скраћено ПТМ) хистонских протеина најчешће укључују фосфорилацију, ацетилацију, метилацију и убиквитинацију. Модификација хистона за последицу има препознавање нуклеозома од стране протеина укључених у процесе везане за одржавање интегритета и експресије генома. Испитивањима је потврђено да се протеини који поседују бромодомене, хромодомене као и Tudor и Agenet домене, везују тј. „читају” модификоване N-крајеве молекула хистона, доводећи до разлика у транскрипционој активности циљних гена. Механизми препознавања ПТМ од стране различитих читача код биљака још увек нису потпуно расветљени. У четвртом потпоглављу изложени су основни подаци о процесу развића семена. У петом потпоглављу „Апомиксија“ приказана је класификација апомиксије и преглед досадашњих сазнања о процесу бесполог размножавања код биљака. Такође, у потпоглављу „Развиће семена са поремећеном равнотежом доприноса родитеља” кандидат је указао на важност односа тј. равнотеже генома родитеља триплоидног ендосперма (2 сета хромозома пореклом од мајке и један сет који потиче од оца, 2m:1p) који је неопходан за правилно развиће овог ткива. За одржавање овог односа задужен је велики број до сада откривених механизма, као што су, примера ради, регулација гена и транспозабилних елемената деловањем Поликомб репресивног

комплекса 2 (енг. *Polycomb Repressive Complex 2*, PRC2) и/или патернално експримирани ауксин, што је детаљно описано у потпоглављима седам и осам. Наиме, фитохормони су органске супстанце мале молекулске масе које у малим количинама стимулишу или инхибирају растење и развиће биљака. Литературни подаци указују на значајност ауксина за развиће ендосперма и семењаче код *Arabidopsis*, као и да је транспорт ауксина неопходан за ембриогенезу код многих биљних врста. Прекомерна продукција ауксина у оплођеним семенима опонаша фенотип који се јавља код хибрида код којих постоји патернални вишак хромозома (енг. *paternal excess*). Такође, показано је да у семенима насталим у укрштањима где постоји патернални вишак хромозома постоји повишена експресија гена укључених у биосинтезу, транспорт као и трансдукцију сигнала ауксина. Поред свега поменутог, недавно је установљено да недостатак FIS-PRC2 функције као и прекомерно синтетисан матернални ауксин стимулише пролиферацију ендосперма и диференцијацију семењаче у одсуству оплођења. У последњем потпоглављу „Модел систем за генетичка истраживања - *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.“ истакнута је значајност коришћења врсте *Arabidopsis thaliana* као модел система у генетичким и епигенетичким истраживањима у биљној биологији.

У поглављу **ЦИЉЕВИ РАДА** постављено је осам главних циљева истраживања. Научни циљ истраживања ове дисертације била је карактеризација EML фамилије протеина код *Arabidopsis thaliana* и проучавање улоге ових протеина у развићу семена, добијање нових података о протеинима задуженим за читање епигенетичких модификација на хистонима у семенима, о чему не постоји довољно литературних података, као и прикупљање нових сазнања о улози и молекуларним механизмима деловања хормона на развиће семена код биљака. Један од циљева истраживања ове дисертације било је и стицање фундаменталних сазнања о апомиксији и могућностима примене генетичког инжењерства у циљу добијања семена бесполним развићем код биљака.

Поглавље **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** садржи укупно 17 потпоглавља, од којих је свако подељено у неколико одељака. У првом, другом и трећем потпоглављу приказани су основни подаци о биљном материјалу коришћеном у експериментима, условима за гајење биљака, као и генотипизацији *eml* мутаната у циљу функционалне карактеризације EML гена. Табеларно су приказане секвенце свих прајмера коришћених у различитим методама и експериментима у овој докторској дисертацији. У четвртном, петом, шестом и седмом потпоглављу, представљене су процедуре за изолацију циљних секвенци и стратегије за клонирање коришћењем *Gateway* система, као и рестрикционе методе клонирања. У циљу експресије EML1 и EML3 гена коришћени су вектори за експресију у бактеријским ћелијама, као и бинарни вектори за трансформацију биљака. Преглед процедура које су коришћене за анализу генске експресије дат је у осмом потпоглављу. У следећа два потпоглавља су приказани протоколи за методу *in vitro* везивања рекомбинантних EML1 и

EML3 протеина изолованих из бактерије *E. coli* за протеински чип од 384 пептида који препокривају хистонске репове са различитим ПТМ. Потпоглавља под насловом „Трансформација биљака“, „Ко-имунопреципитација протеина“ и „Western blot“ у сажетом обиму објашњавају методе сакупљања биљног материјала, изолације протеина и имунодетекције циљног протеина у узорцима у циљу *in planta* потврде резултата добијених *in vitro*. Табеларно су приказане примарна и секундарна антитела коришћена у *Western blot* анализи. У четрнаестом потпоглављу објашњена је метода за анализу транскриптома уз коришћење *Illumina HiSeq 4000* платформе. У петнаестом потпоглављу детаљно су приказане микроскопске методе коришћене у дисертацији (светлосна и конфокална микроскопија, као и диференцијално интерферентна контрастна микроскопија), и процедуре за хистолошку анализу семена, структура налик семенима и семених заметака. У последња два потпоглавља представљене су статистичке методе коришћене за анализу добијених података.

У поглављима **РЕЗУЛТАТИ** и **ДИСКУСИЈА** кандидат је представио резултате и дао упоредну анализу оригиналних резултата ове докторске тезе и података из литературе. У првом потпоглављу, у циљу утврђивања степена еволутивне конзервираности EML протеина, приказано је филогенетско стабло ENT-Tudor/Agenet протеина подгрупе Agenet протеина пореклом из различитих биљних врста. Филогенетска анализа је потврдила да су протеини ENT-Tudor/Agenet подгрупе широко распрострањени код 57 биљних врста, како код еволутивно најстаријих врста виших биљака као што су маховине и папрати, тако и код зелених алги, као и да *A. thaliana* и кукуруз поседују 4 и 5 паралога ENT-Tudor/Agenet подгрупе, редом. У другом потпоглављу установљено је да биљке одабране за даље анализе представљају *knock-out* односно *knock-down* мутанте. У следећем потпоглављу детаљно је описана фенотипска анализа мутаната на основу микроскопске анализе развића семена и ембриона *eml1-2*, *eml2-1*, *eml3-4* и *eml4-1* мутаната. Резултати показују да се код *eml* мутаната након дисекције ембриона испољава фенотип који се одликује успореном динамиком развића ембриона, у односу на дивљи тип (енг. *wild-type*, WT), при чему ефекат EML протеина зависи од дозе. Резултати локализације EML протеина су приказани у потпоглављу под насловом: „Локализација EML протеина“. На основу резултата приказаних у овом делу дисертације закључено је да и EML1 и EML3 имају гаметофитну функцију која се наставља и након оплођења, са заједничком улогом у ембриону и семењачи, и израженијом улогом EML1 у ендосперму. Уз осврт на резултате који указују на сличан експресиони образац *EML1* и *EML3* гена и локализацију протеина, а имајући у виду фенотипове које испољавају одговарајући мутанти, и међусобну интеракцију EML1 и EML3 у квасцима, дискутована је могућност постојања генетичке интеракције између ова два гена. У циљу тестирања ове хипотезе, конструисан је двоструки *eml1-2 eml3-4* мутант и идентификован одговарајући WT из исте F2 сегрегирајуће популације. У одељку „Генетичка и фенотипска анализа двоструког *eml1-2 eml3-4* мутанта након оплођења“ изложени су резултати који указују на то да су се код око 90% WT семена ембриони

налазили на ступњу линеарни котиледон, док су у љускама хомозиготног двоструког мутанта уочена три типа поремећаја у репродуктивном развићу: прекид развића семених заметака (абортирање), потпуни прекид развића семена (абортирана семена) и успорена динамика развића ембриона. Од укупног броја семених заметака, структура налик семенима и семена, 32% чине абортирани семени замеци. Преосталих 68% структура је показало присуство семењаче након бојења ванилином и због тога су оне класификоване као семена. Око 40% ових семена карактеришу мала димензија и минимално бојење ванилином, као и прекид развића семена убрзо након оплођења. Преостала семена у љускама двоструког мутанта су нормалних димензија и интензивно обојена ванилином, али се након дисекције уочава фенотип који се одликује успореном динамиком развића ембриона, у односу на WT семена. У оквиру одељка „Анализа транскриптома *eml1-2 eml3-4* мутанта” урађена је анализа транскриптома, методом РНК-*Seq* и идентификација циљних гена чија је експресија под контролом EML1 и EML3. Након филтрирања гена чији се ниво експресије у *eml1-2 eml3-4* двоструком мутанту разликовао 1.5 x у односу на WT, и за које је p вредност $\leq 0,05$, идентификовано је 584 гена који имају значајно повишен ниво експресије у двоструком мутанту и 174 гена чија експресија је снижена у односу на WT. Установљено је да су међу генима са повишеном експресијом најзаступљенији гени који учествују у биолошким процесима везаним за метаболизам ауксина, односно у транспорту и функцији преноса сигнала овог хормона. У следећем одељку представљен је резултат демаскулинизације двоструког мутанта и карактеризација апомиктичних семена која се формирају у одсуству оплођења. Тестирање интеракције EML протеина и хистона *in vitro*, извршено је везивањем пречишћених EML1 и EML3 протеина за хистонски протеински чип. Након везивања за хистонски чип, установљено је да оба протеина имају афинитет везивања за пептиде хистона H3, тачније везују се за истих 5 пептида који садрже следеће модификације: немодификовани H3K36, H3K36me1, H3K36me2, H3K36me3 и H3K36ac.1 У последњем потпоглављу резултати су показали да EML1 и EML3 имају способност интеракције са нуклеозомима *in planta*. Ови резултати су у складу са резултатима добијеним *in vitro* који сугеришу да је механизам функције EML протеина читање хистонских модификација. У оквиру сваког потпоглавља кандидат је свеобухватно продискутовао и протумачио добијене резултате у докторској дисертацији, поредећи резултате својих истраживања са публикованим подацима других аутора за тестиране врсте, у складу са савременим научним сазнањима.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** изнет је концизан и јасан преглед најзначајнијих закључака, изведених из резултата истраживања у оквиру докторске дисертације, а у складу са постављеним циљевима дисертације. Закључци су изложени кроз седам ставки. Полазећи од анализе *in vitro* и *in vivo* везивања утврђено је да су EML1 и EML3 читачи хистонских модификација, са преференцијом везивања за H3K36me3 модификацију. Истакнуто је на основу студија локализација протеина да EML1 и EML3 имају важну улогу у гаметофиту пре процеса оплођења. Присуство EML1 и EML3 протеина у

различитим деловима семена, указује на њихову регулаторну улогу и након оплођења када оба протеина имају највероватније преклопљене улоге у ембриону и семењачи, док је улога EML1 заступљенија током развића ендосперма. На основу фенотипске анализе *eml* мутантних биљака, закључено је да EML1 и EML3 имају матерналну регулаторну функцију, која се огледа у одржавању фертилизационог потенцијала семених земака. Улога ових протеина зависи од њихове дозе, која омогућава нормално развиће ембриона након оплођења, што је у сагласности са резултатима других аутора за протеине са сличним карактеристикама. Сумирањем резултата фенотипске анализе установљено је да су и EML1 и EML3 неопходни за превенцију развића семена *A. thaliana* у одсуству оплођења. Такође, на основу обраде РНК-Seq резултата добијених секвенцирањем транскриптома двоструког *eml1-2 eml3-4* мутанта закључено је да је функција EML1 и EML3 регулација транспорта и сигналне трансдукције ауксина што доводи до репресије очинске (патерналне) генске експресије, како пре, тако и након процеса оплођења. На основу свих приложених резултата у докторској дисертацији, предложено је да *EML* гени имају кључну улогу током развића семена и да овај регулаторни механизам представља контролну тачку за одржавање равнотеже удела родитељских генома након оплођења.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** садржи 212 библиографских јединица из међународних и домаћих извора. Литературни извори су адекватно одабрани, правилно и на одговарајућим местима цитирани у докторској дисертацији.

Поглавље **ПРИЛОГ** садржи табеле са додатним резултатима истраживања.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Milutinovic, M.**, Lindsey III, B.E., Wijeratne, A., Hernandez, J.M., Grotewold, N., Fernández, V., Grotewold, E., Brkljacic, J. (2019): Arabidopsis EMSY-like (EML) histone readers are necessary for post-fertilization seed development, but prevent fertilization-independent seed formation. *Plant Science*, 285: 99-109.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945219301293?via%3Dihub> **M21**
2. Coursey, T.*, **Milutinović, M.***, Regedanz, E., Brkljačić, J., Bisaro, D.M. (2018): Arabidopsis Histone Reader EMSY-LIKE 1 Binds H3K36 and Suppresses Geminivirus Infection. *Journal of Virology*, pp.JVI-00219. *ко-први аутори
<https://jvi.asm.org/content/92/16/e00219-18> **M21**

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Milutinović, M.**, Coursey, T., Lindsey, III E. B., Bisaro, M. D., Grotewold, E., Brkljačić, J. (2018): Arabidopsis EML histone readers are essential for seed development. Joint Meeting of 3rd International Conference on Plant Biology, 22nd Symposium of the Serbian Plant Physiology Society. Belgrade, Serbia. Book of abstracts p. 35. **M34**
2. **Milutinovic, M.**, Wijeratne, A., Fernandez, V., Morohashi, K., Grotewold, E., Brkljadic, J. (2013): Suggested Molecular and Developmental Roles of ACK Proteins as Histone Mark Readers. Ohio Plant Biotechnology Consortium (OPBC), Ohio, Book of abstracts, 30. **M34**
3. Brkljadic, J., Wijeratne, A., Fernandez, V., Hernandez, J. M., Morohashi, K., **Milutinovic, M.**, Petrovic, B., Grotewold, E. (2012): Understanding the role of Arabidopsis ACK proteins in chromatin function. Ohio Plant Biotechnology Consortium (OPBC), Ohio, Book of abstracts, 32. **M34**

Провера оригиналности докторске дисертације

Извештај провере оригиналности докторске дисертације **Милице С. Милутиновић**, добијен коришћењем програма *iThenticate* у Универзитетској библиотеци „Светозар Марковић“ у Београду, показао је индекс сличности од 10%.

Увидом у Извештај утврђено је да су подударана углавном последица употребе општих појмова, назива хемикалија, гена и протеина, претходно публикованих резултата истраживања проистеклих из докторандове дисертације, личних имена и библиографских података о коришћеној литератури. Додатно, одређени делови текста код којих је утврђено подударање нису повезани и немају смисао. Извештај провере оригиналности докторске дисертације Милице Милутиновић указује на позитивну оцену, односно на оригиналност докторске дисертације.

Мишљење и предлог Комисије

Увидом у докторску дисертацију **Милице С. Милутиновић** чији смо приказ дали у извештају, као и на основу приложене библиографије, сматрамо да теза садржи све елементе који су прописани стандардима Универзитета у Београду и да је у складу са задацима који су постављени у пријави теме. Кандидат добро познаје научну проблематику, што је резултирало јасно конципираним циљевима као и одговарајућим дизајном и методологијом у извођењу експеримената. Резултати ове докторске тезе објављени су у два научна рада (категорија М21) и представљени на три међународна научна скупа. Докторска дисертација **Милице С. Милутиновић** представља оригиналан научни допринос у оквиру разјашњења механизма деловања протеина читача приликом препознавања и везивања за специфичне модификације хистона. Идентификација протеина укључених у развиће семена отклања битну препреку за примену биотехнолошких метода у циљу добијања семена бесполним развићем.

Имајући у виду значај и научну вредност резултата, као и начин на који су изложени и интерпретирани, Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри кандидату **Милице С. Милутиновић** јавну одбрану докторске дисертације под насловом „Функционална карактеризација EML (EMSY-like) протеина као читача хистонских модификација са улогом у регулацији развића семена код *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.”.

КОМИСИЈА:

У Београду, 21.06.2019. године

др Светлана Радовић, редовни професор
Универзитета у Београду-Биолошког факултета

др Јелена Бркљачић, ванредни професор
The Ohio State University, Охајо, САД

др Данијела Мишић, научни саветник Института
за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
Универзитета у Београду