

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На V редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 13.03.2020. године, на основу молбе ментора, др Радмиле Ковачевић, професор емеритус, Универзитет у Новом Саду Природно-математички факултет и др Гордане Матић, редовни професор у пензији, Универзитет у Београду Биолошки факултет, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације Бранке, Д. Башице (рођене Глишић), мастер биологије, помоћник уредника, издавачка кућа MDPI, под насловом: „**Филогенетска анализа гена, развојна, ткивна и полна дистрибуција глутатион-S-трансфераза рибе зебрице – функционална карактеризација одабраних рекомбинантних протеина**“, у саставу: др Душанка Савић Павићевић, редовни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет, др Светлана Фа, научни сарадник, Универзитет у Новом Саду – Природно-математички факултет и др Небојша Андрић, доцент Универзитет у Новом Саду – Природно-математички факултет.

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 под насловом „Филогенетска анализа гена, развојна, ткивна и полна дистрибуција глутатион-S-трансфераза рибе зебрице – функционална карактеризација одабраних рекомбинантних протеина“ написана је на српском језику (ћириличним писмом) на 135 страница и садржи 51 слику, 13 табела, 9 прилога и 237 цитираних литературних навода. Дисертација је подељена на следећа поглавља: 1. Увод (1–2 стр.), 2. Преглед литературе (3–21 стр.), 3. Циљеви истраживања (22–23 стр.), 4. Материјал и методе (24–45 стр.), 5. Резултати (46–86 стр.), 6. Дискусија (87–100 стр.), 7. Закључци (101–102 стр.), 8. Литература (103–115 стр.) и Прилози (116–135 стр.). На почетку докторске дисертације се налази насловна страна на српском и енглеском језику, затим страна са информацијама о менторима и члановима Комисије, списак радова у којима се налази део резултата докторске дисертације, захвалница, сажетак на српском и енглеском језику са кључним речима, научном области и ужој научној области којој докторска дисертација припада. Затим следи садржај докторске дисертације. На крају докторске дисертације налази се листа скраћеница, биографија кандидата и изјаве (Изјава о ауторству, Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу).

Анализа докторске дисертације

У поглављу **УВОД** дат је кратак опис биотрансформације ксенобиотика, односно елемената који обезбеђују њихову апсорпцију, дистрибуцију, метаболизам и ослобађање из ћелије/организма. Наглашено је да су глутатион-S-трансферазе значајан елемент друге фазе биотрансформације ксенобиотика са примарном функцијом конјугације глутатиона

са хемијски различитим ксенобиотицима и ендогеним једињењима. Такође је наведено шта је предмет истраживања у дисертацији и да резултати представљају свеобухватну анализу гена *gst* у риби зебрици (*Danio rerio*), са циљем бољег разумевања њихове диверзификације и еволуције, физиолошког значаја ензима Gst и улоге као биомаркера изложености одређеним хемикалијама присутним у спољашњој средини.

Поглавље **ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ** подељено је на четири потпоглавља и у њима су приказани литературни подаци који се односе на проблематику докторске дисертације. У првом потпоглављу „Глутатион-S-трансферазе”, дате су опште карактеристике ових ензима, класификација суперпородице GST, структура ензима, филогенија ензимске суперпородице GST, механизам ензимске реакције конјугације глутатиона на различите супstrate, физиолошка улога ензима GST (некаталитичка улога, улога у развоју, улога у резистенцији на лекове), ензими Gst код рибљих организама, затим је дат преглед литературних података везан за ензиме GST као биомаркере изложености ксенобиотицима. У другом потпоглављу „Супstrate и инхибитори унутарћелијских ензима GST” дат је преглед познатих супstrата и инхибитора, као и преглед емергентних супстанци које су присутне у воденим екосистетима и које могу да буду потенцијални инхибитори ензима GST. У трећем потпоглављу „Биотрансформација ксенобиотика” описане су фазе биотрансформације ксенобиотика, са навођењем литературних података о биотрансформацији ксенобиотика код риба. У четвртном потпоглављу „Риба зебрица као модел организам” наведени су подаци који наглашавају значај зебрица као модел организма за проучавање различитих аспеката биологије кичмењака, наведене су предности у односу на друге модел организме и дат је преглед развојних стадијума ембриона зебрице.

У поглављу **ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА** дефинисани су следећи циљеви истраживања: идентификовање гена *gst* рибе зебрице и потпуна филогенетска анализа ензимске суперпородице Gst на основу чега би се одредио број гена у оквиру сваке филогенетске групе, гени *gst* зебрице позиционирали у односу на ко-ортологе других кичмењачких врста и доделила имена (анотирање) неименованим представницима суперпородице Gst код рибе зебрице; анализирање очуване синтеније у циљу утврђивања хромозомске локализације гена *gst* рибе зебрице, одређивање нивоа очуваности гена *gst* код рибе зебрице и човека; анализирање развојне, ткивне и полне дистрибуције иРНК идентификованих гена, и идентификација доминантно експримираних гена у ткивима кључним за процесе биотрансформације ксенобиотика (јетра, бубрези, црева и шкрге); функционална карактеризација одабраних рекомбинантних протеина Gst рибе зебрице уз одређивање параметара ензимски катализоване реакције; и одређивање инхибиторног потенцијала одабраних емергентних супстанци присутних у воденим екосистемима одређивањем константе инхибиције и типа интеракције коју оставарују са рекомбинантним протеинима Gst рибе зебрице.

Поглавље **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** садржи десет потпоглавља. Прво поглавље представља преглед коришћених хемикалија и антитела. У другом потпоглављу описан је експериментални модел, риба зебрица, начин изолације органа (мозак, шкрге, јетра, црево и гонаде) из адултних јединки и формирање узорака сваког органа/ткива из којих је вршена изолација укупне РНК ради анализе ткивне и полне дистрибуције иРНК гена *gst* рибе зебрице. Такође је описан поступак добијања и гајења ембриона и ларви који су коришћени за изолацију укупне РНК. У трећем потпоглављу описани су бактеријски сојеви и плазмиди који су коришћени за молекуларно клонирање и експримирање гена,

односно добијање рекомбинантних протеина Gst. Четврто потпоглавље „Филогенетска анализа” обухвата идентификацију гена *gst* коришћењем одговарајућих база података (NCBI, Ensembl, DOE *Joint Genome Institute*); Претходно познате хумане секвенце *GST* су именоване у односу на постојећу номенклатуру, док су се за секвенце осталих врста, вршиле претраге гена *gst* поређењем хуманих секвенци и генома: птица, гмизаваца, водоземаца, риба (зебрице, трободље, зелене тачкасте фугу рибе, јапанске фугу рибе и медаке), копљаша (амфиоксуса) и плашташа (асцидије); Вишеструка поравнања секвенци су изведена помоћу алгоритма *Muscle*. Контруисање филогенетских стабала вршено је у програмском пакету *PhyML 3.0.1* употребом *maximum likelihood* методе уз коришћење суперпородице глукуронилтрансфераза као *outgroup*, односно таксона ван монофилетичке групе који се користи за поређење приликом филогенетске анализе. За процену поверења чворова филогенетских стабала користио се тест aLRT. Све претходно неанотиране секвенце *GST* су анотирани према филогенетској анализи. За обраду, приказ и поравнања секвенци користио се програмски пакет *BioEdit* верзије 7.0, док се идентитет секвенци израчунавао помоћу програмског пакета *DNAstar*, верзије 7.0.0. Урађена су ортолошка предвиђања заснована на синтенијским односима између зебричних и хуманих гена од интереса коришћењем платформе *Genomicus*, која је претраживач очуване синтеније синхронизован са геномима из *Ensembl* базе података. Пето потпоглавље „Анализа експримирања гена” обухвата начин изолације укупне РНК и реверзну транскрипцију, дизајнирање прајмера за PCR, проверу специфичности дизајнираних прајмера, одређивање ефикасности дизајнираних прајмера и релативну квантификацију експримирања гена коришћењем методе квантитативне ланчане реакције полимеразе у реалном времену (qRT-PCR). Провера специфичности дизајнираних прајмера обухватала је припрему ампликона за клонирање, молекуларно ГА клонирање ампликона помоћу *pGEM-T Vector System I* комплекта и трансформацију DH5 α компетентних бактерије методом топлотног шока. Затим је вршено изоловање ДНК плазида употребом комерцијалног комплекта (*DNA-Spin*) и одређивање примарне структуре секвенцирањем у циљу потврде инсертованих секвенци. Ефикасност дизајнираних прајмера потврђена је апсолутном qRT-PCR методом коришћењем серије разблажења рекомбинантног плазида као матрице. Релативна квантификација експримирања гена *gst* урађена је qRT-PCR методом. Шесто потпоглавље „Рекомбинантно експримирање протеина” обухвата опис умножавања гена *gst* методом PCR коришћењем специфично дизајнираних прајмера, обраду ДНК ензимима, трансформацију DH5 α бактерија, изолацију рЕТ21a(+) плазида са уклонираним жељеним геном *gst* и потврду примарне структуре секвенцирањем, затим опис припреме компетентних BL21 бактерија које су коришћене за експримирање рекомбинантних протеина и њихову трансформацију. Даље је описана индукција експримирања рекомбинантних протеина у течној култури трансформисаних BL21 бактерија. Седмо потпоглавље „Пречишћавање рекомбинантних протеина” обухвата преглед метода за пречишћавање рекомбинантних протеина: ресуспендовање талога индукованих бактеријских ћелија, потом лизирање, сонификацију и издвајање унутарћелијске фракције бактерија која садржи рекомбинантни протеин центрифугирањем, њено пречишћавање методом афинитетне хроматографије са имобилизованим металом (HisТгар НР колона, Ni-NTA агароза) праћено дијализом ради уклањања имидазола који је саставни део пуфера за елуацију. Осмо поглавље „Анализа рекомбинантних протеина” обухвата опис полиакриламид електрофорезе са натријум додецилсулфатом (SDS-PAGE), дензитометријске анализе, одређивање количине

протеина по Бадфорд и имуноблот анализу. Девето поглавље „Функционална карактеризација рекомбинантних протеина” обухвата детаљан приказ ензимских тестова који су коришћени за одређивање кинетичких својстава рекомбинантних протеина употребом оптичких метода: спектрофотометрије и флуориметрије, тестирање инхибиторног потенцијала одређених емергентних супстанци и ендогених једињења и одређивање константе инхибиције и типа инхибиције коришћењем *GraphPad Prism 6.00* програмског пакета за анализу резултата нелинеарном регресијом, употребом модела мешовите инхибиције. Десето поглавље „Обрада података” садржи: приказ методе хијерархијског кластеровања помоћу одговарајућег програмског пакета за формирање топлотне мапе која је омогућила анализу међусобне повезаности образаца експримирања гена *gst* током ембрионалног и ларвеног стадијума развоја; статистичка анализа разлика у експримирању иРНК гена *gst* у различитим ткивима рађена је методом анализе варијансе (*ANOVA*) једног фактора варијабилитета и употребом Такијевог *post hoc* теста, као и анализа каталитичке ефикасности којом рекомбинантни протеини *Gst* трансформишу одговарајуће супstrate/ко-супstrate; предикција тродимензионалне структуре рекомбинантних протеина урађена је методом хомологног моделовања помоћу *ROBBERA* сервера, док је визуелизација модела омогућена употребом *Pymol* програмског пакета.

Поглавље **РЕЗУЛТАТИ** обухвата шест целина у којима приказ резултата прати постављене циљеве истраживања. У првом потпоглављу представљени су резултати идентификације 27 различитих чланова ензимске суперпородице *Gst* распоређених у 9 класа, са информацијама о приступном коду, дужини протеинских продуката и локализацији гена у геному. Приказана су филогенетска стабла унутарћелијске, митохондријске и микрозомалне ензимске породице *GST/Gst* и проценат идентичности аминокиселинских ланаца протеина унутар сваке класе код зебрица, као и са одговарајућим хуманим протеинима. Приказани су ортолошки односи гена зебрице и човека испитани анализом очуване синтеније за чланове свих класа изузев класе *Rho*, која није присутна у хуманом геному. За јединственог представника ове класе код зебрице, *gstr1*, утврђено је постојање идентичности аминокиселинског ланца протеина и постојећих ко-ортолога код других кошљориба у опсегу 54–64%, односно 49–54% са протеинима *Rho* амфиоксуса. У другом потпоглављу дата је анализа дистрибуције иРНК идентификованих гена *gst* током раног развоја зебрица, изузев представника класе *Kappa* митохондријске породице гена, као и чланова класе *MAREG* који немају трансферазну активност. Резултати су указали на веома висок ниво иРНК за гене *gstp1-2*, *gstm1-3*, *gst2*, *mgst3a* и *mgst3b*, као и висок ниво иРНК за гене *gst1-3*, *gstr1*, *gstt1b*, *mgst2* у првих 4 часа након фертилизације (*hpf*) вероватно као последица ускладиштених генских продуката мајке, ниске нивое транскрипата у периоду 8–24 *hpf*, а затим повећање транскрипције свих гена и достизање максимума 96 или при 120 *hpf*. У трећем потпоглављу дата је анализа ткивне и полне дистрибуције иРНК двадесет различитих гена *gst* код адултних јединки зебрице, сврстаних у 8 различитих класа. Експримирање индивидуалних гена анализирано је за представнике *Theta*, *Omega*, *Zeta*, *Rho*, као и 5 чланова микрозомалне класе, док је за класе *Alpha*, *Mu* и *Pi* представљено збирно експримирање свих чланова унутар класе, с обзиром на то да се ниво експримирања индивидуалних гена не може уочити *qRT-PCR* методом услед високе идентичности њихових секвенци унутар кластера. У четвртом потпоглављу приказани су резултати функционалне карактеризације три рекомбинантна протеина *Gstr1*, *Gstt2* и *Gstm3*. Прво је дат приказ трансформације гена за протеине *Gstr1*, *Gstt2* и *Gstm3* зебрице у хетероложном експресионом систему, *SDS-PAGE* анализа фракција

добијених приликом пречишћавања рекомбинантних протеина HisTrap HP колоном. Имуноблот анализа заснована на експримирању специфичног обележивача 6x His и употребом примарног специфичног антитела (*anti-His*) омогућила је визуелизацију изоформи Gst зебрице и потврдила је њихово успешно експримирање. Приказане су предикције тродимензионалне димерне структуре наведених рекомбинантних протеина. Коришћењем одговарајућих ензимских тестова показано је да све три изоформе протеина Gst каталишу конјугацију специфичних моделних супстрата, 1-хлоро-2,4-динитро бензена (CDNB) и монохлорбимана (MCB) са ко-супстратом глутатионом (GSH), а да ензимска активност одговара Михаелис-Ментен кинетици. Gstr1 је показао највећи афинитет за оба супстрата, као и највећу каталитичку ефикасност у поређењу са другим изоформама Gst. Најмањи афинитет и каталитичку ефикасност за MCB супстрат имао је Gstm3. У петом потпоглављу дат је преглед резултата одређивања инхибиторног потенцијала одабраних ендогених једињења и ксенобиотика у односу на активност два рекомбинантна протеина, Gstr1 и Gstt2. Прво је испитана ензимска активност у присуству и одсуству 100 μM одабраних једињења, а затим је дефинисан тип инхибиције и одређене константа инхибиције (K_i) и константа алфа (α) која указује на тип инхибиције. Активност Gstr1 као јединственог члана класе *Rho* и продукта високо експримираног гена *gstl1* у свим ткивима код оба пола, испитана је у присуству полних хормона, хормоне коре надбубрега, представника жучних киселина и различитих ксенобиотика, представника полицикличних ароматичних угљоводоника, индустријских хемикалија, пестицида, и лекова и производа за личну негу. Од 12 испитиваних стероидних хормона, прегненолон, прогестерон, дехидроепиандостерон-сулфат, тестостерон и кортикостерон су исказали компетитиван тип инхибиције активности Gstr1, што би указивало да су ови хормони могући физиолошки супстрати за овај ензим. Од испитиваних ксенобиотика, трибутилтин хлорид (ТВТ) се показао као веома јак некомпетитивни инхибитор Gstr1 са K_i у наномоларном опсегу. Органифосфорни пестицид диазинон, и лекови тетрациклин, еритромицин и метотрексат исказали су компетитивну инхибицију, односно указано је на могућу улогу Gstr1 у биотрансформацији ових једињења. Активност Gstt2 испитана је у присуству мањег броја ксенобиотика и хормона. За разлику од Gstr1, активност Gstt2 није била смањена у присуству ТВТ и тестостерона, док су се терцијарни-бутил-хирокинон и бисфенол А показали као слаби некомпетитивни инхибитори активности рекомбинантног протеина Gstt2. Такође, испитани су инхибиторни потенцијали фракција узорка комуналне отпадне воде које су садржале смеше неполарних, средње-поларних и поларних једињења на активност рекомбинантних протеина Gstr1, Gstt2 и Gstm3. Показано је да је поларна фракција једина инхибирала активност сва три ензима, а резултати су указали на сличну вредност K_i , с тим што је за Gstt2 показан некомпетитивни, а за остала два ензима компетитивни тип инхибиције.

У поглављу **ДИСКУСИЈА**, кандидаткиња је критички сагледала добијене резултате истраживања у светлу досадашњих литературних података о глутатион-S-трансферазама. Текст дискусије је подељен на 6 потпоглавља и прати приказане резултате. У првом потпоглављу дискусије наведено је да резултати који се односе на идентификацију гена и конструкцију филогенетског стабла представљају прву свеобухватну анализу ензимске суперпородице Gst зебрица, а ортолошки односи са хуманим генима *GST* додатно испитани анализом очуване синтеније омогућавају нови поглед на еволуцију ензима Gst код кошљориба и других хордата. Дискутовани су гени у оквиру свих испитиваних класа Gst у поређењу са подацима код других кошљориба и човека у контексту хромозомске

локализације гена и идентичности аминокиселинских ланаца. Овде треба напоменути да је овај део резултата заједно са резултатима о ткивној и полној дистрибуцији и функционалној карактеризацији *Gst* објављен 2015. године у часопису *Aquatic Toxicology*, а рад до данас има 40 хетероцитата. Резултати о развојној дистрибуцији иРНК 20 гена код ембриона и ларви зебрица дискутовани су у светлу публикованих резултата о експримирању гена *gst* и протеина *Gst* у овом узрасном периоду, а на крају овог потпоглава кандидаткиња закључује да уочене сличности у експримирању гена *gst/GST* током ембриогенезе зебрице и човека оправдавају употребу зебрица као модел организма у истраживањима биотрансформације ксенобиотика. Резултати о обрасцу ткивне и полне дистрибуције иРНК гена *gst* зебрица доприносе сагледавању различитих функција индивидуалних ензима *Gst* адултних зебрица. Анализа ткивно зависног експримирања гена *gst* у адултима зебрице је показала да су представници класа *Pi*, *Theta*, *Zeta*, *Rho* и *Mgst* значајни у процесима биотрансформације ксенобиотика, што се темељи на њиховом високом експримирању у баријерним ткивима/органима. Резултати о кинетици ензимских реакција катализованих са три рекомбинантна унутарћелијска ензима *Gst*, *Gstr1*, *Gst2* и *Gstm3*, дискутовани су и поређени са подацима о вредности K_m за моделне супstrate CDNB и MCB, и ко-супстрат GSH, за друге рибе и сисарске ко-ортологе. На основу резултата о експримирању гена *gst* и вредности кинетичких параметра дискутована је могућа улога појединачних ензима *Gst* зебрице. У наставку овог поглавља дискутовани су резултати о инхибиторном потенцијалу испитиваних ендогених једињења и емергентних суспензија у односу на блокаду активности ензима *Gstr1* и *Gst2*. На основу добијених резултата о компетитивној инхибицији *Gstr1* од стране прогестерона, прегненолона, дехидроепиандростерон-сулфата и тестостерона, кандидаткиња изводи закључак да су ови хормони потенцијални физиолошки супстрати за овај ензим. У дискусији се даље истиче да међу тестираним индустријским хемикалијама само ТВТ испољава јаку некомпетитивну инхибицију *Gstr1*, али не и *Gst2*. На основу компетитивне инхибиције *Gstr1* пестицидом диазиноном, и у светлу публикованих резултата да ензими *Gst* могу да каталишу конјугацију глутатиона са органофосфорним пестицидима, кандидаткиња претпоставља учешће *Gstr1* у биотрансформацији органофосфорних пестицида. У даљем тексту кандидаткиња дискутује резултате о инхибицији активности *Gstr1* и *Gst2* различитим лековима и наводи да компетитивни тип инхибиције одређеним лековима указује на могућу улогу *Gstr1* у њиховој биотрансформацији. На крају, дискусија резултата о инхибицији активности *Gstr1*, *Gst2* и *Gstm3* поларном фракцијом узорка отпадне воде указује да би есеј за мерење активности рекомбинантних протеина *Gst* могао да буде осетљив тест за процену токсичности отпадних вода.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** јасно су изведени следећи закључци истраживања: Филогенетска анализа је открила велику разноврсност гена *gst* код риба, са укупно 27 чланова у геному рибе зебрице, подељених у 9 засебних класа: *Alpha* (*gsta1*, *gsta2*, *gsta3*), *Mu* (*gstm1*, *gstm2*, *gstm3*), *Pi* (*gstp1*, *gstp2*), *Omega* (*gstol1*, *gstol2*), *Theta* (*gstt1a*, *gstt1b*, *gstt2*), *Zeta* (*gstz1*), *Rho* (*gstr1*), *Kappa* (*gstk1*, *gstk2*, *gstk3*, *gstk4*), MAPEG (*mgst1a*, *mgst1b*, *mgst2*, *mgst3a*, *mgst3b*, *lta4s*, *flap*, *ptges*). Анализа очуване синтеније решила је ортолошки однос идентификованих гена са хуманим генима, што је дало нови поглед на еволуцију ових гена код кошљориба и других хордата. Образац развојне, ткивне и полне дистрибуције иРНК идентификованих гена *gst* рибе зебрице пружио је увид у специфичности изоформи *Gst*, што даље имплицира њихове различите улоге у организму зебрице. Високо експримирање представника класа *Pi*, *Theta* (*Gstt1a*), *Zeta* (*Gstz1*) и *Rho* (*Gstr1*) у

екотоксиколошки важним ткивима зебрица и њихова функционална сличност са хуманим ортолозима, указује на значај ових ензима у процесима биотрансформације ксенобиотика. Такође, резултати указују да чланови класа *Alpha*, *Pi*, *Theta*, *Zeta* и *Rho* потенцијално могу имати кључну улогу у одређеним физиолошким процесима. Иницијална функционална карактеризација три унутарћелијска ензима Gst зебрице, Gstr1, Gstt2 и Gstm3, открила је њихове специфичне интеракције са моделним супстратима и омогућила поређење кинетичких својстава ензимске реакције са хуманим и/или рибљим ортолозима. Функционална карактеризација ензима Gstr1, јединог представника класе *Rho* у зебрицама, је показала да су прегненолон, прогестерон, DHEAS и тестостерон физиолошки супстрати овог ензима, односно да би Gstr1 могао да има одређену улогу у стероидогенези, метаболизму и/или физиолошкој активности андрогена код риба, насупротив изостанку овакве функције према естрогенима. Трибутилтин хлорид се показао као најпотентнији инхибитор активности Gstr1 са константом инхибиције у наномоларном опсегу. Компетитивна инхибиција Gstr1 од стране диазинона, еритромицина, метотрексата и тетрациклина указује да овај ензим има значајну улогу у биотрансформацији ксенобиотика и заштити риба од штетних загађивача из спољашње средине, као што су одређени органофосфорни инсектициди и лекови. Једињења присутна у поларној фракцији узорка отпадне воде инхибирају активност Gstr1, Gstt2 и Gstm3 ензима рибе зебрице са сличном K_i вредношћу, при чему је тип реверзибилне инхибиције различит за Gstt2 у односу на остала два рекомбинантна протеина. Инхибиторни потенцијал испитиваних емергентних супстанци и узорка отпадне воде према рекомбинантним протеинима Gst, указује да би оптимизовани есеј са мерење активности Gst могао да буде осетљив тест за процену токсичности отпадних вода.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Glisic, B., Mihaljevic, I., Popovic, M., Zaja, R., Loncar, J., Fent, K., Kovacevic, R., Smital, T., 2015. Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (Danio rerio). *Aquatic Toxicology* 158, 50–62., **M21a**, <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.10.013>
2. Glisic, B., Hrubik, J., Fa, S., Dopudj, N., Kovacevic, R., Andric, N., 2016. Transcriptional Profiles of Glutathione-S-Transferase Isoforms, Cyp, and AOE Genes in Atrazine-Exposed Zebrafish Embryos. *Environmental Toxicology* 31, 233–244., **M21**, <https://doi.org/10.1002/tox.22038>
3. Bašica, B., Mihaljević, I., Maraković, N., Kovačević, R., Smital, T., 2019. Molecular characterization of zebrafish Gstr1, the only member of teleost-specific glutathione S-transferase class. *Aquatic Toxicology* 208, 196–207., **M21a**, <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.01.005>

- Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја
1. B. Glisic, J. Hrubik, E. Petri, A. Tubic, R. Zaja, T. Smital, R. Kovacevic. Functional Characterization of Glutathione-S-transferase Rho (Gstr1) and Theta 2 (Gstt2) in Zebrafish (*Danio rerio*) and Their Sensitivity to Environmental Toxicants. *55th Society of Toxicology Annual Meeting and ToxExpo*, 13–17 March 2016, New Orleans, Louisiana, USA, Book of Abstract: 456, PS 2945, poster No. 637.
- Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја
1. Glisic B., Mihaljevic I., Popovic M., Zaja R., Loncar J., Fent K., Kovacevic R., Smital T. Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). *Molecules of Life, FEBS3+ Meeting and 11th Meeting of the Slovenian Biochemical Society*, 16–19 September 2015, Portorož, Slovenia, Book of Abstract: 97, S21.
 2. Glisic B., Zaja R., Hrubik J., Smital T., Kovacevic R. Functional Analysis of Toxicologically Relevant Glutathione-S-transferase Enzymes in Zebrafish (*Danio rerio*). *11th SERBIAN CONGRESS OF TOXICOLOGY “NEW FRONTIERS AND CHALLENGES IN TOXICOLOGY”*, 24–27 June 2014, Sremski Karlovci, Serbia, Book of Abstract 15–16, poster No. MP-2.
 3. Glišić B., Mihaljević I., Popović M., Žaja R., Lončar J., Smital T., Kovačević R. Phase II of cellular detoxification – example of the glutathione-S-transferase (GST) superfamily in zebrafish (*Danio rerio*). *SCOPE Valorization Grant workshop*, 22–24 April 2013, Novi Sad, Serbia, Book of Abstract, short presentation, p. 07.

Провера оригиналности докторске дисертације

Утврђени проценат подударности је 18%. Овај степен подударности претежно је последица подударања имена и афилијација ментора и чланова Комисије; имена аутора, наслова радова и других библиографских података о коришћеној литератури; назива гена, протеина, биолошких врста, хемијских једињења; симбола којима се означавају гени и протеини; назива коришћених метода; појединих детаља стандардних експерименталних процедура, као што су састави инкубационих смеша и раствора; делова реченица који сами за себе немају смисао (нпр. „што је у сагласности са претходно“, „резултати су приказани као средња вредност“, „На основу добијених резултата може се закључити да код“ и сл.) Сматрамо да су све пронађене подударности прихватљиве и да ни на који начин не утичу на оригиналност ове докторске дисертације.

Мишљење и предлог Комисије

Увидом у докторску дисертацију Бранке Башице закључујемо да је написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме. Дисертација је урађена у складу са принципима научно-истраживачког рада и садржи све неопходне елементе научног рада. Циљеви истраживања наведени у пријави теме успешно су реализовани. Добијени резултати истраживања су прегледно и јасно приказани. Критичка дискусија резултата истраживања и литературних података дала је концизне и јасне закључке. Комисија сматра да су резултати приказани у овој дисертацији оригинално научно дело и да представљају свеобухватну анализу ензимске суперпородице Gst рибе зебрице. Ово мишљење Комисије потврђује квалитет часописа у којима су објављени резултати докторске дисертације кандидаткиње Бранке Башице. Истраживања у оквиру ове докторске дисертације реализована су делом помоћу средстава са пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије под називом „Ксенобиотици са хормонском активношћу: репродуктивни, метаболички, развојни одговори и механизам дејства код одабраних модел организама и ћелијских линија” (број пројекта: ОИ 173037), а делом од SCOPES пројекта под називом „*Establishing and developing of an ecotoxicology platform in Serbia and Croatia*” a focus on zebrafish (*Danio rerio*)” Швајцарске националне фондације за науку (број пројекта: SCOPES IZ73Z0_128025). Део експерименталних истраживања урађен је у оквиру SCOPES пројекта током истраживачког рада Бранке Башице у Лабораторији за молекуларну екотоксикологију којом руководи др Твртко Смитал, Институт Руђер Бошковић, Загреб, Република Хрватска. Др Твртко Смитал је дао сагласност за коришћење добијених експерименталних резултата (у прилогу).

На основу укупне оцене дисертације, увида у истраживачки рад кандидата и сагласно свим претходно изнетим чињеницама у овом Извештају, Комисија предлаже Наставно-научном Већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да се докторска дисертација под називом „**Филогенетска анализа гена, развојна, ткивна и полна дистрибуција глутатион-S-трансфераза рибе зебрице – функционална карактеризација одабраних рекомбинантних протеина**“ Бранке Башице прихвати, а кандидаткињи одобри одбрана докторске дисертације.

КОМИСИЈА:

У Београду, 19.03.2020. године

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

др Светлана Фа, научни сарадник, Универзитет
у Новом Саду Природно-математички факултет

др Небојша Андрић, доцент, Универзитет у Новом Саду
Природно-математички факултет