

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ -
БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА**

На X редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 10. 09. 2021. године, на основу молбе ментора, др Снежане Којић, научног саветника Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду и др Драгице Радојковић, научног саветника Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Срђана З. Бошковића**, истраживача сарадника Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду под насловом: „Карактеризација гена *ankrd1a*, *ankrd1b* и *ankrd2* зебрице (*Danio rerio*) у развићу и одговору на стрес“, у саставу: проф. др Гордана Матић, редовни професор и научни саветник у пензији, проф. др Душанка Савић-Павићевић, редовни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет, проф. др Горан Брајушковић, редовни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет, др Драгица Радојковић, научни саветник, Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство и др Снежана Којић, научни саветник, Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство.

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

И З В Е Ш Т А Ј

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Срђана З. Бошковића је оригинално истраживање којим је успостављена зебрица као нови модел организам за изучавање експресије и функције мишићних протеина са анкиринским поновцима (фамилија MARP, енг. *muscle ankyrin repeat proteins*) у развићу и одговору на стрес.

Докторска дисертација је урађена у Лабораторији за молекуларну биологију Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду и

Департману за генетику развића Макс Планк Института за истраживање срца и плућа у Немачкој, којим руководи проф. др Дидиер Станинер.

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, садржај, текст рада по поглављима, литературу, биографију и три изјаве. Текст дисертације (85 страна) садржи следећа поглавља: Увод (странице 1-14), Циљеви рада (страница 15), Материјал и методе (странице 16-37), Резултати (странице 38-65), Дискусија (странице 66-73), Закључци (страница 74). Литература, у којој је цитирано 165 извора, је излистана на страницама 75-85. Након биографије, приложене су следеће изјаве: Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу. У дисертацији се налази 39 слика и 31 табела.

Анализа докторске дисертације

Предмет докторске дисертације Срђана З. Бошковића је анализа експресије и функције гена фамилије *MARP* зебрице у развићу и одговору на стрес.

Поглавље **Увод** је тематски подељено на два потпоглавља. Кандидат је у оквиру прве целине аналитички представио објављене резултате истраживања структуре, експресије и функције гена и протеина фамилије мишићних протеина са анкиринским поновцима, *MARP*, са посебним освртом на њихову експресију и функцију у одговору на стрес мишића сисара. У другом делу Увода описана је зебрица као модел организам, с обзиром да су у овој тези охарактерисани гени фамилије *MARP* зебрице. Кандидат је описао одлике и предности зебрице као модел система. Затим је описао ток и стадијуме развића зебрице, а посебну пажњу је посветио прегледу процеса развића скелетних мишића и срца. Од бројних алата за генетичке манипулатије, кандидат је детаљно описао принципе и предности генерисања трансгенских репортерских линија, као и принцип мутагенезе технологијом CRISPR/Cas9, која омогућава увођење прецизних измена у геном. С обзиром да су у току експериментално рада зебрице биле изложене стресу повећане физичке активности и повреди срца, у Уводу је описана просторна оранизација мишићних влакана различито типа и на који начин је могуће тренирати зебрице. Последње поглавље увода посвећено је опису молекуларних догађаја који воде до потпуне регенерације оштећеног ткива срца, укључујући дедиференцијацију и пролиферацију кардиомиоцита и уклањање фиброзног ожиљка.

У поглављу **Циљеви** је објашњено зашто је у студији коришћена зебрица као модел организам и постављен је општи циљ истраживања, да се окарактеришу гени фамилије *MARP* зебрице у развићу и одговору на стрес. Затим су наведени специфични циљеви студије: да се процени еволуциона очуваност чланова фамилије *MARP* зебрице, да се утврди развојни и ткивни профил њихове експресије током развића и на стадијуму адулта, да се анализира експресија гена *MARP* зебрице у одговору скелетних мишића и срца на стрес изазван повећаном физичком активношћу и током регенерације срца након повреде и да се генеришу мутанти за гене *MARP* ради проучавања њихове улоге у развићу и регенерацији срца зебрице.

Поглавље **Материјал и методе** обухвата два потпоглавља. У првом потпоглављу је најпре дат преглед експерименталног материјала (границци, антитела, састав раствора и пуфера), а затим протоколи за узгој и рад са зебрицама. У другом потпоглављу су описане експерименталне методе, које су организоване у следеће целине: биоинформатичка анализа секвенци гена и протеина, генетичке манипулатије (генерисање трансгене репортерске линије, генерисање и генотипизација мутаната), манипулатије адултним јединкама зебрице (тренинг форсираним пливањем у виру и криоповреда срца), анализа експресије гена на нивоу молекула РНК, локализација транскрипта *in situ* РНК хибридизацијом, хистолошка бојења, микроскопија, квантификација пролиферације кардиомиоцита и статистичка анализа.

У поглављу **Резултати**, уобличеном у 6 потпоглавља, представљени су резултати докторске дисертације, документовани slikama и графицима. Биоинформатичком анализом идентификовани су ортолози гена *MARP* у геному зебрице (*ankrd1a*, *ankrd1b* и *ankrd2*), утврђене су сличности и разлике у примарној структури гена и протеина чланова фамилије *MARP* зебрице, човека и миша, анализирана је синтенија хромозома и конструисано је филогенетско стабло чланова фамилије *MARP* еволуционо удаљених врста. По први пут је описан профил експресије гена *MARP* зебрице квантификацијом и одређивањем локализације транскрипата током развића и у срцу и скелетним мишићима адултних јединки зебрице. Посебна пажња је усмерена на праћење динамике и локализације експресије гена *ankrd1a* у трансгеној репортерској линији зебрице *TgBAC(ankrd1a:EGFP)*, коју је кандидат генерисао. За испитивање експресионог одговора гена МАРП зебрице у условима повећане физичке активности успостављен је једноставан

и економичан систем за тренирање зебрица форсираним пливањем у виру. Након што је овакав режим тренинга валидиран, показано је да форсирено пливање у виру доводи до индукције експресије гена фамилије MARP, и то *ankrd1a* у срцу, а *ankrd1b* и *ankrd2* у скелетним мишићима.

Повишена експресија *ANKRD1* у патолошким стањима срца, укључујући инфаркт миокарда, и резултати анализе транскриптома повређеног срца зебрице усмерили су део истраживања ка анализи гена *ankrd1a* у повређеном срцу зебрице. У периоду од првог до седмог дана након криоповреде коморе срца, детектован је повишен ниво транскрипта *ankrd1a*, као и репортера у трансгенуј линији *TgBAC(ankrd1a:EGFP)*, док им је локализација била специфична, у кардиомиоцитима граничне зоне повреде. Тридесет дана након повреде срца су показивала различит степен регенерације и у свим срцима трансген је детектован уз ивицу ожилка. Овим експериментима је показано да *ankrd1a* маркира повређено ткиво срца. У последњем потпоглављу Резултата описаны су резултати функционалне анализе гена *MARP* у развију зебрице и регенерацији повређеног срца. У циљу утврђивања функције чланова фамилије MARP, генерисане су три линије зебрице са мутираним геном *ankrd1a*, *ankrd1b*, односно *ankrd2* коришћењем технологије CRISPR/Cas9. Развиће мутаната је посматрано од оплођења до адулта. Није било видљиве промене фенотипа, мутанти су били вијабилни и нормално су се развијали до адулта. С обзиром на експресиони профил *ankrd1a* након повреде срца, посебна пажња је усмерена ка проучавању његове улоге у процесу регенерације миокарда, праћењем пролиферације кардиомиоцита и уклањања ожилка. Проценат пролиферишућих кардиомиоцита је био значајно мањи код мутанта него код јединки дивљег соја, док недостатак функционалног протеина Ankrd1a није утицао на процес уклањања ожилка.

Поглавље **Дискусија** је организовано у 7 потпоглавља и садржи критичку анализу добијених резултата у контексту резултата сродних истраживања. Дискусија се односи на: еволуциону очуваност структуре ортолога чланова фамилије MARP, експресиони профил гена MARP зебрице, праћење експресије *ankrd1a* у репортерској линији *TgBAC(ankrd1a:EGFP)*, улогу гена фамилије MARP у развију зебрице, моделовање повећане физичке активности и њен утицај на експресију гена MARP зебрице и експресију и улогу гена фамилије MARP у регенерацији срца зебрице. На крају дискусије дате су смернице за даља истраживања. Кандидат је истакао да је овим истраживањем направљен

кључни корак ка успостављању зебрице као модел организма за даље проучавање функције чланова фамилије MARP.

У поглављу **Закључци** су јасно и концизно изведени закључци на основу резултата анализе еволуционе очуваности фамилије MARP зебрице, њихове експресије током развића и одговора на стрес, као и анализе носилаца мутација у генима *MARP*. Закључци су у складу са постављеним циљевима докторске тезе и сумирани су у 11 тачака:

- Чланови фамилије MARP зебрице су по структури слични ортолозима еволуционо удаљених врста што указује на очуваност њихове функције.
- Експресиони профили *ankrd1a* и *ankrd1b* током формирања скелетних мишића зебрице су слични експресији сисарских ортолога. Експресија *ankrd2* зебрице је изузетно ниска.
- Експресија *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* верно рекапитулира експресију *ankrd1a* и омогућава њено лако праћење, са резолуцијом на нивоу једне ћелије.
- *ankrd1a* је експримиран у спорим мишићним влакнima током раних фаза развића скелетних мишића. Његова експресија није детектована срцу.
- Применом протокола форсираниог пливања у виру успешно је моделована повећана физичка активност зебрице.
- Тренинг зебрице форсираним пливањем у виру је индуковао експресију гена *ankrd1a* у срцу и *ankrd1b* и *ankrd2* у скелетним мишићима.
- Након криоповреде коморе срца зебрице, експресија *ankrd1a* локализована је у кардиомиоцитима граничног региона повреде, слично профилу експресије сисарских ортолога након инфаркта миокарда.
- У касној фази регенерације срца (30 дана након повреде), *ankrd1a* је експримиран у кардиомиоцитима унутрашње зоне повреде, уз заостали ожилјак, али не и у регенерисаним кардиомиоцитима.
- Зебрице у којима мутације у генима *MARP* доводе до формирања преурањеног „стоп“ кодона немају очигледне промене фенотипа у односу на јединке дивљег соја и развиће им тече неометано.
- *ankrd1a* учествује у регулацији пролиферације кардиомиоцита након криоповреде срца зебрице.

- Експресија нефункционалног Ankrd1a нема утицаја на крајњи исход регенерације срца зебрице.

Поглавље **Литература** садржи 165 адекватно цитираних библиографских јединица.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Boskovic S**, Marín-Juez R, Jasnic J, Reischauer S, El Sammak H, Kojic A, Faulkner G, Radojkovic D, Stainier DYR, Kojic S. Characterization of zebrafish (*Danio rerio*) muscle ankyrin repeat proteins reveals their conserved response to endurance exercise. PLoS One. 2018 Sep 25;13(9):e0204312. doi: 10.1371/journal.pone.0204312. (M21).

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30252882/>

2. **Boskovic S**, Marín Juez R, Stamenkovic N, Radojkovic D, Stainier DY, Kojic S. The stress responsive gene *ankrd1a* is dynamically regulated during skeletal muscle development and upregulated following cardiac injury in border zone cardiomyocytes in adult zebrafish. Gene. 2021 Aug 5;792:145725. doi: 10.1016/j.gene.2021.145725 (M22).

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34010705/>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Boskovic S**, Ruben MJ, Jasnic-Savovic J, Radojkovic D, Stainier D, Kojic S. Characterization of MARPs in zebrafish. Conference on Structure and Dynamics of the Sarcomere, Beograd, Srbija, 4-6. maj, 2016. Књига апстраката, стр 56. M34
2. **Boskovic S**, Marin-Juez R, Stamenkovic N, Jasnic J, Milosevic E, Novkovic M, Radojkovic D, Stainier DY, Kojic S. *ankrd1a* in zebrafish development and heart regeneration. European Zebrafish Meeting 2020, virtuelni, Prag, Češka Republika, 26-27. oktobar, 2020. Књига апстраката P191, str. 177. M34

Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација је послата на проверу оригиналности 08.09.2021. С обзиром да извештај није достављен ментору до дана потписивања овог извештаја, оцена извештаја о провери оригиналности докторске дисертације Срђана З. Бошковића се налази у прилогу овог извештаја.

Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација **Срђана З. Бошковића**, под насловом „**Карактеризација гена *ankrd1a*, *ankrd1b* и *ankrd2* зебрице (*Danio rerio*) у развићу и одговору на стрес**”, представља оригинални рад који даје значајан научни допринос у области биологије мишићне ћелије и регенеративне биологије. Осим конкретног научног доприноса у проширењу сазнања о експресији и функцији гена *ankrd1a*, *ankrd1b* и *ankrd2* у развићу и одговору на стрес, овај рад изузетног квалитета даје и значајан допринос нашој научној заједници кроз увођење и оптимизацију нових методолошких приступа специфичних за одабрани модел организам. Докторска дисертација Срђана З. Бошковића аргументовано промовише зебрицу као доступан модел организам за изучавање експресије и функције одабраних гена *in vivo*. Кандидат је успешно савладао савремене методе генетичког инжењерства за генерирање трансгених животиња и мутаната. Моделовао је тренинг зебрице на оригиналан начин, форсираним пливањем у виру. Савладао је поступак криоповреде коморе срца којим се моделује инфаркт миокарда и тиме омогућио истраживања у области регенерације срца.

Дисертација је урађена у сагласности са образложењем наведеним у пријави теме. У складу је са принципима научно-истраживачког рада и садржи све потребне елементе прописане за завршетак докторске дисертацију. Циљеви докторске дисертације су јасно дефинисани и применом адекватно одабраних метода истраживања успешно реализовани. Добијени резултати истраживања приказани у докторској дисертацији у складу су са постављеним циљевима и задацима истраживања, а закључци произилазе из добијених резултата. Резултати су критички дискутовани, и јасно указују не само да је зебрица адекватан модел организам за даље проучавање гена фамилије *MARP*, већ и на велики

потенцијал зебрице као модел организма у бројним другим научним областима (биомедицина, токсиколоја, биологија тумора, итд).

Резултати ове докторске дисертације публиковани су у два оригинална рада у међународним научним часописима категорије M21 и M22, и представљени на два међународна скупа категорије M34.

С обзиром да је кандидат **Срђан З. Бошковић** испунио све формалне услове неопходне за одбрану докторске дисертације под насловом „**Карактеризација гена *ankrd1a*, *ankrd1b* и *ankrd2* зебрице (*Danio rerio*) у развићу и одговору на стрес**“, Комисија има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да усвоји Извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације Срђана З. Бошковића.

КОМИСИЈА:

У Београду, 15. 09. 2021. године

проф. др Гордана Матић
редовни професор и научни саветник у пензији

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

проф. др Горан Брајушковић
редовни професор
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Драгица Радојковић
научни саветник
Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство

др Снежана Којић
научни саветник
Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство