

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На II редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 12.11.2021. године, прихваћен је извештај ментора проф. др Светлане Радовић и др Мире Милисављевић о урађеној докторској дисертацији **Јелене Ј. Малешевић (рођена Петковић)** истраживача сарадника Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, под насловом „Идентификовање и карактеризација ћелијских фактора укључених у процес обнављања популације ћелија *Ustilago maydis* након оксидативног стреса“ и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу др Ђорђе Фира, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, др Бранко Јовчић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, др Милорад Којић, научни саветник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и на основу овог прегледа и анализе Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Биолошког факултета подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Јелене Ј. Малешевић (рођена Петковић)** под називом „Идентификовање и карактеризација ћелијских фактора укључених у процес обнављања популације ћелија *Ustilago maydis* након оксидативног стреса“, написана је на 82 стране и садржи 23 слике (од којих је 20 оригинални резултат истраживања кандидата) и 1 табелу. Основне целине ове дисертације су Увод (15 страна), Циљ (1 страна), Материјал и методе (14 страна), Резултати (29 страна), Дискусија (10 страна), Закључци (1 страна), Литература (7 страна; 158 референци). Дисертација садржи и насловне странице на српском и енглеском језику (2 стране), страницу са информацијама о менторима и члановима комисије (1 страна), захвалницу (1 страна), сажетке на српском и енглеском језику (2 стране) и садржај (3 стране). У оквиру прилога се налазе: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације:

Предмет докторске дисертације кандидаткиње Јелене Ј. Малешевић (рођена Петковић) јесте испитивање механизма који су одговорни за преживљавање, односно, успостављање вијабилности популације ћелија *U. maydis* након деловања стресогених фактора и идентификовање ћелијских фактора који су укључени у овај феномен у циљу детаљнијег разумевања молекуларне основе испитиваног процеса.

У поглављу **Увод** које садржи 4 потпоглавља на систематичан начин су представљена досадашња сазнања о еволуционо-еколошким стратегијама преживљавања микроорганизама у неповољним срединским условима и описано је формирање биофилма, морфолошке промене ћелије, формирање спора и цисти, прајминг (енг. *priming*), опште стратегије бет-хединга (енг. *bet-hedging*), као и улога програмиране ћелијске смрти у преживљавању популација микроорганизама. Посебна пажња је посвећена механизмима деловања оксидативног стреса и молекуларним основама одбране ћелија од овог типа стресора. Финално је описан *Ustilago maydis*, главне карактеристике и животни циклус. Истакнуте су биолошке, генетичке и техничке/лабораторијске особине које га чине добрим експерименталним модел системом за истраживање приказано у раду.

У поглављу **Циљеви** су јасно дефинисани научни циљеви овог истраживања. Основни циљ ове тезе - утврђивање механизма успостављања вијабилности популације *U. maydis* након деловања стресогених фактора у условима гладовања и идентификовање ћелијских фактора укључених у овај феномен, је базиран на пажљиво проученој литератури. У складу са тим су дефинисани специфични циљеви:

1. Утврђивање механизма успостављања вијабилности популације *U. maydis* након деловања стресогених фактора у условима гладовања. Основно питање је да ли се обнављање популације заснива на унутарћелијској поправци оштећених макромолекула или на способности преживелих ћелија да се размножавају користећи нутритивни материјал пореклом од умрлих ћелија.
2. Идентификовање ћелијских фактора укључених у овај феномен у циљу детаљнијег разумевања молекуларне основе процеса неопходних за ефикасну обнову популације.

Поглавље **Материјал и методе** које обухвата 8 потпоглавља је написано прегледно са свим детаљима неопходним за репродуковање експерименталних процедура. Детаљно су приказане процедуре рада са ДНК, РНК, са експресионим системима, *U. maydis* и *Escherichia coli*, као и процедуре изоловања мутаната и идентификације гена. Током израде докторске дисертације кандидаткиња је користила широк спектар метода и поступака који се грубо могу поделити на: 1. Основне процедуре рада са ДНК; 2. Основне процедуре рада са РНК; 3. Рад са бактеријама; 4. Рад са *U. maydis*; 5. Идентификовање мутираних гена; 6. Анализа РОС-ова код ћелија

U. maydis инкубираних у води; 7. Бојење ћелија *U. maydis* пропидијум-јодидом; 8. Припрема култура *U. maydis* за изолацију РНК.

Приказ **резултата**, организован у 12 потпоглавља, у складу са постављеним циљевима, садржи образложење и специфичне детаље експерименталног приступа, резултате експеримената и непосредну дискусију. Резултати експеримената су документовани сликама које су јасно објашњене у легендама.

Први део резултата се односи на детаљну карактеризацију процеса обнове популације *U. maydis* након деловања оксидативног стреса (РУС, енгл. , *Repopulation Under Starvation, RUS*). Јасно је приказан експериментални приступ ка утврђивању механизма обнове, чиме је недвосмислено показано да се обнова популације заснива на мултипликацији преживелих ћелија на рачун умрлих, а не на унутарћелијској поправци стресом оштећених ћелија. Даље су детаљно испитани кинетика ослобађања биомолекула у спољашњи медијум, способност ћелија да их користе, као и опречни ефекат оштећених биомолекула на живе ћелије. Додатно је утврђено да *U. maydis* у условима лимитиране количине кисеоника остаје метаболички активан чиме генерише хипоксичне услове, индукује оксидативни стрес што на крају доводи до пада бројности популације за 5 редова величине. Значајно је да и овако девастирана популација има способност опоравка како у нормоксичним, тако и у хипоксичним условима.

Други део резултата се односи на изоловање мутаната, њихову карактеризацију и идентификовање гена који су укључени у процес обнове популације (РУС) након деловања снажног оксидативног стреса. Мутанти су изоловани на два начина и од испитиваних 4700 мутаната-кандидата, одабрано је десет са израженим падом способности обнове популације. Даље су идентификовани мутирани гени и утврђене позиције мутација. Додатно је, ради увида у шири спектар и динамику ћелијских фактора и функција важних за способност РУС-а, урађена анализа транскриптома ћелија инкубираних у супстрату изложеном оксидативном стресу, а резултати су графички јасно приказани и анализирани.

У поглављу **Дискусија** организованом у 6 потпоглавља добијени резултати су критички сагледани и дискутовани у светлу досадашњих сазнања. Резултати су дискутовани и кроз шири еволуционо-еколошки аспект. Очигледно је да је кандидаткиња детаљно упозната са релевантном литературом и да је своје резултате логично и са мером интерпретирала дефинишући теме за даља истраживања.

У секцији **Закључци**, у складу са постављеним циљевима, јасно су резимирани резултати:

1. Након излагања популације ћелија *U. maydis* оксидативном стресу долази до израженог пораста броја вијабилних ћелија и до ефикасне обнове популације, уколико се третиране ћелије дуже времена инкубирају у води. Утврђено је да се ова обнова

популације заснива на способности преживелих ћелија да за своју пролиферацију користе нутритивни материјал пореклом од умрлих ћелија.

2. Анализа ефекта ослобођеног материјала на раст неоштећених ћелија је показала опречну биолошку активност, указујући да би *U. maydis* морао поседовати ћелијске механизме укључене у, не само реапсорпцију ослобођених једињења из спољашње средине, него и у савладавање њихове токсичности која је индукована третманом.

3. *U. maydis* је метаболички активан у води, што у условима ограничене доступности кисеоника, генерише хипоксију и оксидативни стрес, који за последицу има масовно умирање ћелија. Продужена инкубација у условима који су узроковали аутогенерисану хипоксију и последични пад вијабилности популације, доводи до обнове популације на рачун репродукције малобројних преживелих ћелија. Према томе, веома је могуће да је *U. maydis* способан да се пребаци на ферментативни начин раста.

4. Претраживањем мутаната који су изгубили способност обнове вијабилности, идентификовано је 10 ћелијских фактора (**Adr1, Did4, Kell, Tbp1, Snf8, Slm1, Chk1, Gmt, Snf5, Hsf1**) који доприносе процесу. Познате су улоге идентификованих ћелијских фактора у различитим ћелијским процесима: регулација ћелијског циклуса, раст, вакуоларно сортирање протеина, организација актинских филамената, регулација генске експресије, ремоделовање хроматина, одговор на топлотни стрес, одржавање интегритета ћелијске и нуклеарне мембране и стабилност генома. Ови су резултати указали на сложену комбинацију ћелијских фактора и процеса чијом се оперативношћу постиже ефикасна реконституција стресом руинираних популација.

5. Мутанти у генима *Adr1, Did4, Kell, Tbp1, Snf8, Slm1, Chk1, Hsf1* су показали сензитивност на различите генотоксичне агенсе, што указује да су неки од ћелијских процеса задужених за рециклирање оштећених унутарћелијских једињења такође укључени и у заштиту интегритета генома *U. maydis*.

6. Анализа транскриптома ћелија инкубираних у супстратима пореклом од биомолекула оштећених оксидативним стресом, је показала да се највећа промена експресије гена дешава у ћелијама изложеним високотоксичном супстрату, те да у овим ћелијама долази до ексклузивне експресије 242 гена, који би могли имати улогу у савладавању токсичности супстрата. Из ове групе је одабрано 6 гена (UMAG_01716, UMAG_04098, UMAG_05938, UMAG_04974, UMAG_02336, UMAG_06503) за даљу анализу њихове улоге у РУС-у.

7. Добијени резултати имају значај у расветљавању механизма обнављања популације *U. maydis* након деловања оксидативног стреса.

У поглављу **Литература** на прегледан начин је приказано 158 цитираних радова који су на адекватан начин коришћени при писању дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

1. Milisavljevic M, **Petkovic J**, Samardzic J, Kojic M. Bioavailability of Nutritional Resources From Cells Killed by Oxidation Supports Expansion of Survivors in *Ustilago maydis* Populations. *Front Microbiol.* 2018 May 17;9:990. doi: 10.3389/fmicb.2018.00990. IF (2018) 4.259, **M21**.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5967202/>

2. **Petkovic J**, Kojic M, Milisavljevic M. Self-Generated Hypoxia Leads to Oxidative Stress and Massive Death in *Ustilago maydis* Populations under Extreme Starvation and Oxygen-Limited Conditions. *J Fungi (Basel)*. 2021;7(2):92. Published 2021 Jan 28. doi:10.3390/jof7020092 (IF (2020) 5.816, **M21**

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7912166/>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја:

1. **Jelena Petković**, Mira Milisavljević, Milorad Kojić. Cellular factors involved in reconstitution of oxidative damaged population of *Ustilago maydis*. 1st Congress of Geneticists in Bosnia and Herzegovina with International Participation. 2019, 2-4 October, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, Genetics & Applications: Special Edition, Book of abstracts, p.92 , **M34**

2. **Jelena Petković**, Mira Milisavljević, Milorad Kojić. The role of intracellular trafficking in reconstitution of oxidative damaged population of *Ustilago maydis*. The 6th congress of Serbian Genetic society. 2019, 13-17 October, Vrnjačka Banja, Serbia. Book of abstracts, p. 249, **M34**

3. Mira Milisavljevic, **Jelena Petković**, Milorad Kojić. Surviving oxidative stress- new cellular functions involved in recycling and genome protection in *Ustilago maydis*. The 6th congress of Serbian Genetic society. 2019, 13-17 October, Vrnjačka banja, Serbia, Book of proceedings, p. 53-61, **M63**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја:

1. **Јелена Петковић**, Мира Милисављевић, Милорад Којић. Ћелијски фактори укључени у реконституцију оксидативно оштећене популације ћелија *Ustilago maydis* у условима гладовања. Други конгрес биолога Србије. 2018, 25-30. Септембар, Кладово, Србија. Књига сажетака, р. 274, **M64**

Провера оригиналности докторске дисертације

Коришћењем програма iThenticate извршена је провера оригиналности докторске дисертације Јелене Ј. Малешевић (рођена Петковић). Извештај датиран 13.12.2021. је показао индекс подударности од 6%.

Увидом у Извештај утврђено је подударање са 68 извора. Подударање са једним извором је било 2% (подударање у оквиру поглавља Материјал и методе: у називима потпоглавља, у називима и генотиповима бактеријских сојева, у називима медијума за узгајање и кратким фразама уобичајеним у методолошким описима), док је са сваким од преосталих 67 извора подударање било једнако или мање од 1%. Подударање се највећим делом односило на стандардно присутне делове докторских дисертација (навођење назива институција, уобичајених скраћеница, стручних термина, општих фраза, назива поглавља, назива примењених метода, уређаја, реагенаса и комерцијалних китова, захвалницу), као и претходно публиковане радове кандидаткиње, а који су проистекли из њене докторске дисертације. Поред тога, уочено је делимично подударање и при описивању метода и процедура које се стандардно користе у молекуларној биологији или проистичу из упутства произвођача комерцијалних китова, као и при коришћењу терминологије при описивању методологије коришћене при статистичкој анализи података. Кандидаткиња је приликом израде дисертације поштовала академска правила цитирања и навођења литературних извора. Поред тога, увидом у Извештај потврђена је оригиналност резултата кандидаткиње.

Узимајући у обзир наведено и Правилник о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду („Гласник Универзитета у Београду” број 201/18), извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата Јелене Ј. Малешевић (рођена Петковић), под насловом „Идентификовање и карактеризација ћелијских фактора укључених у процес обнављања популације ћелија *Ustilago maydis* након оксидативног стреса“, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог комисије

На основу увида у докторску дисертацију **Јелене Ј. Малешевић (рођена Петковић)**, чији смо приказ дали у овом извештају, као и на основу библиографских података кандидата и непосредног увида у њен рад током експерименталног извођења тезе у Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду, имамо следеће мишљење о овој дисертацији и самом кандидату:

Докторска дисертација **Јелене Ј. Малешевић (рођена Петковић)** под насловом „Идентификовање и карактеризација хелијских фактора укључених у процес обнављања популације хелија *Ustilago maydis* након оксидативног стреса“ урађена је у складу са принципима доброг научног рада, уз поштовање основних етичких и научних норми за извођење експеримената и представљање добијених резултата. Кандидаткиња је кроз рад на овој дисертацији показала зрелост, знање, упорност и критицизам који треба да красе сваког успешног истраживача за стицање звања доктора наука. Својим радом кандидаткиња је дала значајан допринос разумењу биологије *U. maydis* и отворила нова поља истраживања. Стога, са задовољством предлажемо Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације Јелене Ј. Малешевић (рођена Петковић) у складу са важећим прописима.

КОМИСИЈА:

др Ђорђе Фира
редовни професор
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Бранко Јовчић
редовни професор
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Милорад Којић
научни светник
Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и
генетичко инжењерство,

У Београду 14.12.2021. године.