

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На VI редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 12.04.2019. године, на основу молбе ментора др Тање Аднађевић, вишег научниг сарадника Института за биолошка истраживања “Синиша Станковић”, Универзитета у Београду и др Јелене Благојевић, научног саветника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Марије С. Рајичић**, истраживача сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, под насловом: „**Молекуларна структура, порекло и функција Б хромозома код жутогрлог шумског миша, *Apodemus flavicollis* (Mammalia, Rodentia)**“, у саставу:

- др Тања Аднађевић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду – Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“,
- др Јелена Благојевић, научни саветник, Универзитет у Београду – Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“,
- др Михаило Јелић, доцент, Универзитет у Београду – Биолошки факултет

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

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација **Марије С. Рајичић** под насловом: „**Молекуларна структура, порекло и функција Б хромозома код жутогрлог шумског миша, *Apodemus flavicollis* (Mammalia, Rodentia)**“ садржи: Насловну страну на српском и енглеском језику, Страну са подацима о менторима и члановима комисије, Захвалницу, Стране са подацима о докторској дисертацији на српском и енглеском језику (Резиме, Кључне речи, Научна област, Ужа научна област и УДК број), Садржај, Текст рада по поглављима, Биографију аутора и попуњене и потписане изјаве (Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада, Изјава о коришћењу)

Докторска дисертација је написана на 90 страна и садржи 10 табела (7 у поглављу Материјал и методе и 3 у поглављу Резултати), 21 слику (све у поглављу Резултати) и 213 библиографских јединица. Пагинирани текст подељен је у 7 поглавља: **Увод** (15 страна), **Циљеви истраживања** (1 стране), **Материјал и методе** (16 страна), **Резултати** (21 страна), **Дискусија** (19 страна), **Закључци** (1 стране), **Литература** (17 страна).

Животиње коришћене у овом раду су из природних популација и не налазе се на листи ретких и заштићених врста.

Анализа докторске дисертације

Предмет докторске дисертације је испитивање порекла Б хромозома, као и механизма њиховог настанка и одржавања у популацијама врсте жутогрлог миша, *Apodemus flavicollis*. За ту сврху примењена је микродисекција Б хромозома из кариотипа, а потом низ савремених молекуларно генетичких метода које су омогућиле анализу секвенци које се налазе на Б хромозому. Добијене секвенце дефинисане су поређењем са најближом врстом, чији је цео геном секвенциран (*Mus musculus*) и нађени су гени или делови гена, чија транскрипциона активност је потом проверена код јединки са и без Б хромозома.

Кандидаткиња је поглавље **УВОД** поделила на осам целина и дала детаљан приказ савремених истраживања која се односе на проблематику и приступе коришћене у докторској дисертацији. У првој целини кандидаткиња представља опште карактеристике Б хромозома у живом свету, а затим даје научни осврт на досадашња истраживања порекла, настанка и одржавања Б хромозома код различитих врста, са посебним акцентом на Б хромозоме код врста сисара. Четврта целина је посвећена прегледу ефеката које Б хромозоми испољавају код својих носилаца. Постојање гена на Б хромозомима и њихова транскрипциона активност, те промене транскрипционе активности одређених гена у присуству Б хромозома су тема наредних целина. У овом делу је сумирано све што је до сада урађено у разним научним истраживањима а тиче се транскрипционе активности гена на Б хромозомима. Б хромозоми су јако дуго сматрани себичним генетичким елементима. Технолошки напредак у области молекуларне генетике је омогућио проверу и доказивање присуства гена на њима, као и показивање транскрипционе активности тих гена. Како се тема докторске дисертације надовезује на ова истраживања, која су пионирског значаја, кандидаткиња је са посебом пажњом покрила целокупан преглед публикованих радова. Поглавље се завршава целином која сумира сва досадашња истраживања Б хромозома на модел организму коришћеном у овој докторској дисертацији, жутогрлом мишу *Apodemus flavicollis*.

У оквиру поглавља **ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА** јасно су постављени циљеви који логично произилазе један из другог. Први и најважнији циљ јесте било издвајање Б хромозома, путем микродисекције, из кариотипа врсте *Apodemus flavicollis*. То је први пут да се методом микродисекције код ове врсте, циљано издвоји један хромозом из кариотипа. Претпостављено је да ће изоловање Б хромозома омогућити даљу анализу њиховог порекла. Секвенцирањем, умножавањем секвенци и њиховим флуоресцентним обележавањем кандидаткиња је поставила за циљ испитивање хомологије секвенци Б хромозома и основног кариотипа анализираних врста и дефинисање секвенци на Б хромозому на основу генома *Mus musculus*. Коначно, циљ је био испитивање транскрипционе активности секвенци идентификованих на Б хромозому, поређењем те активности међу јединкама са и без Б хромозома. Последњи наведени циљ представља предлагање могућег модела настанка и еволуције Б хромозома у светлу добијених резултата.

У оквиру поглавља **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**, које садржи 23 потпоглавља, кандидаткиња је дала детаљан преглед свих коришћених приступа и метода. Методе су дате у оквиру три фазе у којима се одвијао експеримент (анализа порекла Б хромозома, анализа структуре Б хромозома и провера транскрипционе активности секвенци на Б

хромозомима). Дат је табеларни преглед локалитета са којих су животиње изловљене, описани начини изловљавања, препарације и анализе хромозома. Описане су процедуре изолације ДНК и РНК, ћелијске културе, флуоресцентне *in situ* хибридизације (FISH), секвенцирања микродисекованих Б хромозома, идентификација циљаних региона, анализа варијације секвенце и репетитивних елемената и процедура анализе транскрипционе активности гена у присуству Б хромозома и гена на Б хромозомима.

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ** кандидаткиња излаже своје резултате у три потпоглавља које дели у 5 целина. Прво се односи на резултате који се баве пореклом Б хромозома. Приказом резултата добијених провером специфичности микродисекованог материјала помоћу FISH-а показана је хомологија секвенци Б хромозома и основног кариотипа анализираних врсте, али и јединство настанка Б хромозома на читавом ареалу распрострањења испитиване врсте. Потпоглавље које приказује резултате испитивања генетичког садржаја Б хромозома је подељено на две целина. Прва целина приказује резултате провере присуства гена чије присуство је утврђено на Б хромозомима других врста, *C-kit* гена и гена за 18S rRNA. Друга целина приказује резултате анализа секвенци Б хромозома код испитиване врсте и то листу хромозомских региона преклапања испитиване врсте и коришћеног референтног генома врсте *Mus musculus*. Добијени подаци су искоришћени за одабир и тестирање транскрипционих активности одабраних секвенци чији су резултати презентовани у следећем потпоглављу. Сви добијени резултати су адекватно документовани табеларно и сликама. Истакнути су најважнији резултати везано за разлике у транскрипционим активностима у односу на присуство и број Б хромозома, пол и старење.

У поглављу **ДИСКУСИЈА**, добијени резултати су упоређени и критички размотрени у односу на досадашња литературна сазнања из области истраживања Б хромозома. Пре свега, резултати јасно показују порекло Б хромозом на основу добијене хомологије Б хромозома и перичентромерног региона (*PR*) полних хромозома помоћу FISH-а. Сем хомологије са овим регионом полних хромозома, добијене секвенце Б хромозома показују хомологију и са субтеломерним регионом два пара малих аутозома и нешто слабију хомологију са дисталним делом Y хромозома. Поред тога, веома значајан је и налаз да је микродисекованих Б хромозом исти по пореклу и/или структури на читавом ареалу распрострањења врсте *Apodemus flavicollis* што је закључено на основу резултата добијених упоређивањем јединки пореклом из Србије и пореклом из Русије.

Анализа генетичког садржаја испитиваних Б хромозома код врсте *Apodemus flavicollis* је показала да не постоји разлика у броју копија гена *C-kit* гена и гена за 18S rRNA између јединки са и без Б хромозома. То наводи на закључак да присуство ових гена не представља универзалну карактеристику Б хромозома сисара. Поређењем секвенци читавог Б хромозома и референтног генома кућног миша, *Mus musculus*, показано је да су Б хромозоми изграђени од вишеструко поновљених секвенци пореклом са већине хромозома основног сета референтне врсте. У састав Б хромозома жутогрлог шумског миша улази 22 региона која у референтном геному воде порекло од 16 хромозома, и на њима је идентификовано 38 протеин кодирајућих гена. Гени, чији су паралоги лоцирани на Б хромозома, углавном су везане за ћелијски циклус и машинерију ћелијске деобе.

Генерално становиште је да су Б хромозоми претежно хетерохроматичне структуре те самим тим и транскрипционо неактивни елементи. Кандидаткиња је у овом делу дискусије детаљно образложила добијене резултате потврде присуства одређених гена у ДНК секвенцама свих тестираних носилаца који воде порекло из 8 популација. На овај начин је потврдила да су додатни хромозоми код врсте *Apodemus*

flavicollis на неки начин доследни у очувању генског садржаја. Потврда да постоји транскрипција секвенци директно са Б хромозома добијена је утврђивањем накупљених разлика у секвенци гена на Б хромозомима и одговарајућих генима на А сету.

У последњем потпоглављу, кандидаткиња предлаже модел настанка и одржавања Б хромозома код испитиване врсте. Модел настанка каже да су полни хромозоми исте врсте "донори" сегмента од којег је настао Б хромозом. Након настанка нео-Б хромозома кандидаткиња предлаже постепену интеграцију дуплираних гена као објашњење постојања фрагмента пореклом са различитих хромозома А сета. Гени лоцирани на Б хромозомима би могли да настану пребацавањем геномских фрагмената са А хромозома посредством транспозабилних елемената. Имајући у виду резултате секвенцирања, *PCR* анализе, као и формирање бивалената у мејози, изнета је тврдња да су ови хромозоми код врсте *Apodemus flavicollis* постигли и успешно одржавају одређену структуру.

Изостанак мејотичког драјва, потврђене транскрипционе активности и забележени позитивни фенотипски ефекти на носиоце, указује да је модел одржавања ових хромозома највероватније хетеротични. Б хромозоми нису ништа друго до значајно повећање генома, које обезбеђује велики асортиман малих РНК преко којих је могућ утицај на основни геном. Коначан резултат те интеракције у зависности од тренутних срединских услова, може варирати, те у зависности од тога, ови елементи бивају селекционо неутрални, фаворизовани или елиминисани из популација.

На основу добијених резултата кандидаткиња у поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** износи следеће ставове:

1. DAPI-бојењем Б хромозоми врсте *Apodemus flavicollis* се истичу као хетерохроматични.

2. Хибридизација Б-специфичних проба на метафазе различитих јединки ове врсте, недвосмислено указује да секвенцу Б хромозома карактерише:

- хомологија са перицентромерним регионом (ПР) полних хромозома,
- хомологија са субтеломерним регионима два пара малих аутозома и
- слабија хомологија са дисталним регионом Y хромозома.

3. Хомологија између секвенци различитих Б хромозома, као и Б хромозома и региона А хромозома је идентична без обзира на географску удаљеност популација из којих узорци воде порекло.

4. Без обзира на генералну заступљеност на Б хромозомима различитих врста, *C-kit* и *18S rRNA* ген нису пронађени на Б хромозомима врсте *A. flavicollis*.

5. Поређењем секвенци Б хромозома и референтног генома врсте *Mus musculus*, идентификовано је 39 гена са 22 хромозомска региона пореклом са 16 хромозома референтног генома.

6. Са изузетком Б хромозома пореклом из Русије, који има један додатни хромозомски регион који није нађен код осталих, сви Б хромозоми су изграђени од истих хромозомских региона.

7. Секвенца Б хромозома је у највећој мери обогаћена генима који кодирају протеине микротубула и ћелијског циклуса. Присутни су и гени који мапирају нуклеотид-везујуће, метал-везујуће протеине као и протеине мембране, као и великим бројем репетитивних секвенци. Гени смештени на Б хромозомима се налазе у различитим стадијумима деградације.

8. Псеудогени пореклом са Б хромозома се транскрибују.

9. Неизмењени гени са Б хромозома, или са основног генома у присуству Б хромозома, показују виши ниво експресије код женки у млађој животној доби. Ниво експресије је повезан и са бројем Б хромозома на начин да је највиши ниво експресије код носилаца једног Б хромозома, док са порастом броја Б хромозома ниво експресије опада.

10. Б хромозоми врсте *A. flavicollis*., највероватније воде порекло од *PR* хетерохроматина X хромозома који се налази непосредно уз *PAR*. Еволуцијом, овај додатни хромозом, је обogaћен секвенцама са готово свих хромозома основног сета.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Радови у часописима међународног значаја

- **Rajičić M**, Adnađević T, Stamenković G, Blagojević J, Vujošević M (2015) Screening of B chromosomes for presence of two genes in yellow-necked mice, *Apodemus flavicollis* (Mammalia, Rodentia). *Genetika* 47:311–321. doi: 10.2298/GENSR1501311R **M23**
<http://www.dgsgenetika.org.rs/abstrakti/vol47no1rad28.pdf>
- **Rajičić M**, Romanenko SA, Karamysheva TV, Blagojević J, Adnađević T, Budinski I, Bogdanov A S, Trifonov VA, Rubtsov NB, Vujošević M (2017) The origin of B chromosomes in yellow necked mice (*Apodemus flavicollis*) - Break rules but keep playing game. *PloS ONE*, issn: 1932-6203, doi:10.1371/journal.pone.0172704 **M21**
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0172704>
- Makunin AI, **Rajičić M**, Karamysheva TV, Romanenko SA, Druzhkova AS, Blagojević J, Vujošević M, Rubtsov NB, Graphodatsky AS, Trifonov VA (2018) Low-pass single-chromosome sequencing of human small supernumerary marker chromosomes (sSMCs) and *Apodemus* B chromosomes, *Chromosoma* 127: 301-311, doi: 10.1007/s00412-018-0662-0 **M21**
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00412-018-0662-0>

Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

- **Rajičić M**, Adnađević T, Bugarski-Stanojević V, Stamenković G, Jojić V, Budinski I, Jovanović V, Blagojević J, Vujošević M (2015) B chromosomes in *Apodemus flavicollis*. *International Conference Chromosome 2015, Novosibirsk, Russia. Book of Abstracts* p. 45. **M34**

Мишљење и предлог Комисије

На основу увида у докторску дисертацију **Марије С. Рајичић**, која је прошла формалну проверу оригиналности и чији смо приказ дали у извештају, као и приложене библиографије и непосредног увида у њен рад, сматрамо да докторска дисертација под насловом: „Молекуларна структура, порекло и функција Б хромозома код жутогрлог шумског миша, *Apodemus flavicollis* (Mammalia, Rodentia)“ представља оригиналан научни рад. У овој докторској дисертацији коришћене су савремене молекуларно-генетичке методе, а истраживања су обављена по свим критеријумима добре научно-истраживачке праксе. Резултати су детаљно и јасно приказани и критички

дискутовани, а научно засновани закључци су сажето изведени. Ова докторска дисертација представља оригиналан допринос разумевању порекла, механизма настанка и одржавања Б хромозома у популацијама жутогрлог шумског миша, *Apodemus flavicollis*.

Марија С. Рајичић је кроз рад на докторској дисертацији показала спретност и самосталност у раду почевши од теренских истраживања, вештини у раду са микродисекционим микроскопом, овладавању читавим низом метода молекуларне генетике, па све до обраде и анализе добијених резултата. У раду је испољавала ентузијазам, преданост и стрпљење, тако да комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри одбрану докторске дисертације Марије С. Рајичић у складу са важећим прописима.

КОМИСИЈА:

У Београду, 18.04.2019.

др Тања Аднађевић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду –
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“

др Јелена Благојевић, научни саветник
Универзитет у Београду –
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“

др Михаило Јелић, доцент
Универзитет у Београду – Биолошки факултет