

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ			
1. Датум и орган који је именовано комисију: 04.04.2023. Научно-наставно веће Природно-математичког факултета у Новом Саду			
2. Састав комисије у складу са <i>Правилима докторских студија Универзитета у Новом Саду</i> :			
1.	Петри др Едвард Petri Edward, PhD	ванр. професор Assoc. Professor	биохемија Biochemistry 12.07.2018.
	презиме и име	звање	ужа научна област и датум избора
	Природно-математички факултет, УНС Faculty of Sciences, UNS		председник president
	установа у којој је запослен		функција у комисији
2.	Тонтош др Агнеш Tantos Ágnes, PhD	виши научни сарадник Senior Research Fellow	биохемија Biochemistry 01.12.2020.
	презиме и име	звање	ужа научна област и датум избора
	Истраживачки центар за природне науке, Истраживачка мрежа „Етвеш Лоранд“, Будимпешта, Мађарска Research Center for Natural Sciences, „Eötvös Loránd” Research Network, Budapest, Hungary		члан member
	установа у којој је запослена		функција у комисији
3.	Поповић др Жељко Д. Popović Željko D., PhD	ванр. професор Assoc. Professor	молекуларна биологија Molecular biology 01.03.2020.
	презиме и име	звање	ужа научна област и датум избора
	Природно-математички факултет, УНС Faculty of Sciences, UNS		члан – ментор member – advisor
	установа у којој је запослен		функција у комисији
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ			
1. Име, име једног родитеља, презиме: Милош (Срђан) Аврамов / Miloš (Srđan) Avramov			
2. Датум рођења, општина, држава: 21. октобар 1991. Нови Сад, Република Србија / Novi Sad, Republic of Serbia			
3. Назив факултета, назив претходно завршеног нивоа студија и стечени стручни/академски назив:			

Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, мастер академске студије, мастер биолог / Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Master studies in Biology, Master of Science in Biology

4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија:
2015. година, Доктор наука – биолошке науке / PhD in Biological Sciences

III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

„Intrinsically disordered proteins of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* (Hbn, 1796)“
„Структурно-неуређени протеини кукурузног пламенца *Ostrinia nubilalis* (Hbn, 1796)“

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Навести кратак садржај са назнаком броја страница, поглавља, слика, схема, графика и сл.

Докторска дисертација кандидата Аврамов Милоша „Структурно-неуређени протеини кукурузног пламенца *Ostrinia nubilalis* (Hbn, 1796)“ припада научној области биологија, ужој научној области биохемија. Написана је на енглеском језику, а сажетак је дат на енглеском и српском језику у кључној документацији и након садржаја.

Испред основног текста налазе се насловна страна, кључна документацијска информација, захвалница, списак скраћеница, списак слика, списак табела и садржај. Срж дисертације чине 166 страница А4 формата, а дисертација је подељена на 9 поглавља: 1. Увод, 2. Хипотеза и циљеви дисертације, 3. Материјал и методе, 4. Резултати, 5. Дискусија, 6. Закључци, 7. Литература, 8. Прилози и 9. Продужени апстракт на српском језику. На крају сржи дисертације налази се кратка биографија аутора, док се План третмана података налази на крају документа. Срж дисертације садржи 28 слика, од чега су 6 схеме, илустрације и фотографије, а 22 графика, као и 28 табела. Укупно је цитирано 240 публикација.

The doctoral dissertation „Intrinsically disordered proteins of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* (Hbn, 1796)“ written by candidate Miloš Avramov belongs to the scientific field of Biology, specific scientific field of Biochemistry. It is written in the English language, with abstracts in both English and Serbian given in the key documentation and after the Table of Contents.

Before the main text body there are the front page, key documentation, acknowledgements, list of abbreviations, table of figures, list of tables and table of contents. The main text body is written on 166 A4 pages and separated into 9 Chapters: 1. Introduction. 2. Thesis hypothesis and aims, 3. Materials and methods, 4. Results, 5. Discussion, 6. Conclusions, 7. Literature, 8. Supplementary materials and 9. Extended abstract in Serbian. The main text body ends with Author biography, while the whole document ends with the Data Treatment Plan. In total, there are 28 figures, of which 6 are illustrations and 22 are graphs, as well as 28 tables. The literature review contains 240 cited publications.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

У поглављу Увод кандидат кратким прегледом представља главне концепте на којима је заснована дисертација. Ово поглавље кандидат је поделио на два дела. У првом делу се упознаје тематика структурно-неуређених протеина и протеина са структурно-неуређеним регионима уз давање историјског контекста како су истраживања на овој специфичној групи протеина зачета. Наглашавају се главне карактеристике протеина са структурном неуређеношћу које се тичу њиховог специфичног аминокиселинског састава, облика структурне неуређености које могу поседовати, физичкохемијских знаменитости и значаја за функционисање биолошких система. У другом делу овог поглавља кандидат представља модел-систем који је коришћен у овој дисертацији, кукурузног пламенца *Ostrinia nubilalis*, његов значај у истраживањима везаним за дијапаузу, као фазу мировања организма, и адаптације које доводе до стицања отпорности на ниске температуре, као и преглед досадашњих истраживања и сазнања у овој области.

На основу прегледа литературе из првог поглавља, кандидат поставља Хипотезу да ће излагање гусеница петог ступња кукурузног пламенца ниским температурама и постепено стицање отпорности на ове услове довести до повећаног садржаја структурно-неуређених протеина. Истакнуто је 7 циљева истраживања у складу са постојећим сазнањима о структурно-неуређеним протеинима, као и са недостатком информација о њиховој заступљености и значају код организама који развијају отпорност на ниске температуре животне средине.

У поглављу Материјал и методе текстуално и графички су приказане две поставке у оквиру којих су оформљене експерименталне групе за потребе истраживања у овој докторској дисертацији. Такође су детаљно описане све *in vitro* и *in silico* технике које су коришћене како би се олакшала њихова репродукција, било за понављање огледа који су први пут извођени у овој дисертацији, било за будућа истраживања. Описани су поступци за термалну обраду узорак ради обogaћивања садржаја протеина са структурном неуређеношћу, за извођење специјализоване дводимензионалне електрофорезе на полиакриламидном гелу за детекцију структурно-неуређених протеина, за протеолизу и стварање пептидних фрагмената који ће се користити за идентификацију протеина течном хроматографијом куплованом са тандемском масеном спектрометријом, за биоинформатичке анализе идентификованих протеина, као и за анализу релативне експресије одабраних гена за протеине са структурном неуређеношћу.

Добијени Резултати дисертације су изложени у поглављу које је подељено на три дела и свеукупно су приказани помоћу 23 слике и 16 табела. У првом делу овог поглавља су приказани резултати протеомских анализа које су укључивале испитивање ефеката термалне обраде узорак ради обogaћивања садржаја структурно-неуређених протеина, идентификацију протеина у појединачним експерименталним групама као и ефекте које је термална обрада узорак имала на поступак идентификације протеина у погледу њиховог укупног броја и броја јединствених протеина који су детектовани. У другом делу поглавља приказани су резултати биоинформатичке анализе квалитативних и квантитативних параметара структурне неуређености идентификованих протеина, њихове функционалне карактеризације, као и осврта на утицај који је термална обрада узорак имала на садржај протеина са структурном неуређеношћу. У последњем делу овог поглавља су представљени резултати анализе релативне експресије гена за протеине са утврђеном значајном стопом структурне неуређености у различитим експерименталним групама, а статистички значајне разлике између група су јасно обележене.

Кандидат је резултате истраживања анализирао у поглављу Дискусија на систематичан и аргументован начин. Ово поглавље кандидат је такође поделио на три целине. Прве две целине се тичу техничких аспеката експерименталних група, с обзиром на то да овакав протеомски приступ раније није био примењиван када су у питању истраживања на кукурузном пламенцу. У оквиру првог дела су дискутовани различити приступи за обogaћивање садржаја протеина са структурном неуређеношћу и зашто је одлучено да се у ту сврху примени наведена термална обрада узорак. Поред тога сагледани су резултати провере успешности дате термалне обраде узорак на специјализованој дводимензионалној електрофорези на полиакриламидном гелу, идентификације протеина помоћу методе течне хроматографије купловане са тандемском масеном спектрометријом, као и на то како је термална обрада довела до идентификације већег броја протеина који не би били детектовани да није кориштен овај приступ обogaћивања узорак. Други део дискусије је посвећен *in silico* биоинформатичким анализама које су за циљ имале да утврде квалитативне и квантитативне показатеље структурне неуређености идентификованих протеина. Показано је да је предвиђени садржај протеина са структурном неуређеношћу на сличном нивоу као и у *in silico* студијама рађеним на другим еукариотским организмима. Такође, потврђени су благотворни ефекти термалне обраде на обogaћивање њиховог садржаја у узорцима. У овом делу је дат и критички осврт на утврђени аминокиселински

састав свих идентификованих група протеина у погледу оних аминокиселина које су биле најзаступљеније, а такође су дате и прве претпоставке о постојању предиспозиције структурно-неуређених протеина за одређеним аминокиселинским саставом која је потенцијално специфична за сваку врсту. Такође, у овом делу кандидат је представио резултате функционалне карактеризације протеина са структурном неуређеношћу и нагласио недостатке који и даље постоје у овој области, када су у питању инсекти. У последњем делу дискусије сви резултати су сагледани са екофизиолошког аспекта преживљавања дугих зимских месеци уласком у стање хипометаболизма и развијањем отпорности на ниске температуре, по чему је испитивана врста кукурузног пламенца знаменита. Кандидат је овде резултате продискутовао кроз промене које се дешавају како на нивоу протеома и садржаја протеина са структурном неуређеношћу, тако и на нивоу промена које се тичу експресије гена за одабране протеине. Ове различите аспекте екофизиолошких промена које се одвијају током дијапаузе и преживљавања на ниским температурама код кукурузног пламенца кандидат је адекватно и детаљно сагледао кроз постојећа сазнања о структурно-неуређеним протеинима код организама који настајују станишта са изразито неповољним условима живота, као и досадашњим истраживањима на инсектима и другим организмима који током свог животног циклуса пролазе кроз периоде заустављеног развоја и адаптирања на неповољне услове животне средине.

На основу добијених резултата и њихове дискусије кроз сазнања из публикација претходних истраживања, изведени су Закључци који јасно, сажето и прегледно истичу значај ових резултата у погледу бољег разумевања екофизиолошких основа стања мировања код инсеката, као и адаптација које се одвијају на различитим функционалним нивоима у циљу преживљавања ниских температура током дугог временског периода.

Све публикације које су цитиране у дисертацији су излистане у поглављу Литература и поређане су по абecedном реду. За цитирање је коришћен АПА стил навођења, а укупно је излистано 240 публикација. Комисија сматра да су одабране публикације прегледно навођене у тексту и да су релевантне за предмет истраживања дисертације.

У Прилозима се налазе две табеле. У првој табели су дате секвенце почетница које су коришћене у анализи релативне генске експресије, заједно са приступним бројевима гена на основу којих су почетнице дизајниране. У другој табели се налазе средње вредности резултата добијених анализом релативне генске експресије са њиховим стандардним грешкама.

Последње поглавље представља Продужени апстракт на српском језику као неопходни део дисертације, с обзиром на то да је дисертација писана на енглеском језику и на истом језику ће бити брањена. Продужени апстракт је написан на 23 странице и у њему су сумирана сва сазнања добијена у овој докторској дисертацији.

Комисија је позитивно оценила све појединачне делове докторске дисертације.

In the Introduction chapter the candidate presents a brief overview of the main concepts that comprise this dissertation. The candidate divided this chapter into two parts. The first part establishes the subject of intrinsically disordered proteins and proteins with intrinsically disordered regions while also giving the historical context behind the origin of studies on this particular group of proteins. The main properties of proteins with intrinsic disorder are highlighted, such as their unique amino acid composition, forms of intrinsic disorder that can occur in their structure, physicochemical peculiarities and their significance for the functionality of biological systems. In the second part of this chapter the candidate introduced the model system that was used in this dissertation, the European corn borer *Ostrinia nubilalis*, its significance for research on diapause as a resting state in insects, adaptations that lead to the acquisition of cold resistance, as well as an overview of previous research and findings in this field of study.

After the literature overview in the first chapter, the candidate proposed the Thesis hypothesis stating that exposing 5th instar larvae of the European corn borer to low temperatures and acquiring

cold hardiness will lead to an increase in the content of intrinsically disordered proteins. The candidate highlighted 7 aims in accordance with available findings on intrinsically disordered proteins, as well as a lack of information on their abundance and significance in organisms that develop resistance to low temperature conditions in the environment.

The Materials and methods chapter presents, in-text and illustrated, the two experimental designs that were used to form the experimental groups in this dissertation. The *in vitro* and *in silico* techniques that were used for the first time as part of this dissertation are also described in detail, so that they can be reproduced for replication of experiments, as well as for future studies. This chapter also includes detailed descriptions of sample heat treatment protocols for enrichment of intrinsically disordered proteins, as well as protocols for the detection of intrinsically disordered proteins using a specialized 2D polyacrylamide gel electrophoresis, protein digestion and generation of peptides for protein identification by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, bioinformatic analyses of identified proteins and analyses of relative gene expression of selected proteins with intrinsic disorder.

The obtained Results of the dissertation are shown in the chapter that is divided into three parts and are presented in 23 figures and 16 tables. In the first part of this chapter the results of proteomic analyses are presented. These include the effects of sample heat treatment for enriching the content of intrinsically disordered proteins, identification of proteins in individual experimental groups, as well as the effects of heat treatment on the number of total and unique proteins that were identified. The second part presents the results of bioinformatic analyses performed for the qualitative and quantitative properties of intrinsic disorder in the identified proteins, their functional characterization, with a look on the effects of heat treatment on the content of proteins with intrinsic disorder. The final part of this chapter shows the results of the relative gene expression analyses in different experimental groups for proteins that have been determined to possess significant amounts of intrinsic disorder, with clearly marked statistically significant differences in expression.

The candidate has given a critical and reasoned analysis of the results in the Discussion chapter, also separated into three parts. The first two segments are concerned with the technical aspects of the experiments, considering that such a proteomic approach has not been applied before when it comes to research on the European corn borer. In the first segment the candidate discusses the different approaches to enriching the sample content of proteins with intrinsic disorder and why heat treatment was chosen for this purpose. The results of the specialized two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis were also looked over, to ascertain how successful the sample heat treatment was, as well as the results of protein identification by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry and how heat treatment led to the identification of a significant number of proteins which would have otherwise remained undetected. The second segment is dedicated to the *in silico* analyses used to determine the quantitative and qualitative parameters of intrinsic disorder in the identified proteins. It is shown here that the content of proteins with intrinsic disorder is in line with previous studies on the prevalence of these proteins in eukaryotic organisms, and the effects of heat treatment on their enrichment is also confirmed. A critical assessment of the amino acid composition of all identified proteins is given in this segment, in regards to the most abundant amino acids. An initial assumption is also made about the seeming existence of a species-specific bias in the amino acid composition of intrinsically disordered proteins. Additionally, in this segment the candidate has presented the results of the functional characterization of proteins with intrinsic disorder and has highlighted the gaps that are still present in this field when it comes to insects. In the final segment of the discussion chapter all results are examined from the ecophysiological aspect of surviving the long winter months by entering a state of hypometabolism and attaining cold hardiness, which are all hallmarks of the European corn borer. The candidate has assessed these findings not only in relation to changes that occur on the proteomic level and content of proteins with intrinsic disorder, but also changes on the level of gene expression for selected proteins. These different aspects of ecophysiological alterations that take place during diapause and survival at low temperatures in the European corn borer the candidate examined appropriately and

comprehensively, taking into consideration the available information on intrinsically disordered proteins in organisms that inhabit extremely unfavorable habitats and also studies on insect and other species that experience periods of arrested development and adaptation to suboptimal environmental conditions during their life cycle.

The obtained results and their interpretation according to previous research are used to form the Conclusions which clearly and succinctly highlight the significance of the findings for the better understanding of the ecophysiological basis of insect diapause, as well as adaptations that occur on different functional levels that enable survival of long-term exposure to low temperatures.

All publications cited in the dissertation are ordered alphabetically and listed in the References chapter. The publications are cited using the APA format and there are 240 entries in total. The Board finds that the literature is clearly referenced in the text and that it is relevant to the research subject.

In the Supplementary materials two tables are given. The first table contains the sequences of primer pairs that were used for the analysis of relative gene expression, along with the accession numbers for genes that were used to design the primer pairs. The second table contains the means of results from the relative gene expression analyses, with their standard errors of means.

The final chapter is the mandatory Extended abstract in Serbian, considering that the dissertation was written and will be defended in English. The extended abstract spans 23 pages and summarizes all the findings of this dissertation.

The Board gives a positive evaluation of all dissertation chapters.

VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ:

Таксативно навести називе радова, где и када су објављени. Прво навести најмање један рад објављен или прихваћен за објављивање у складу са *Правилима докторских студија Универзитета у Новом Саду* који је повезан са садржајем докторске дисертације. У случају радова прихваћених за објављивање, таксативно навести називе радова, где и када ће бити објављени и приложити потврду уредника часописа о томе.

Avramov, M., Schád, E., Révész, Á., Turiák, L., Uzelac, I., Tantos, Á., Drahos, L., Popović, Ž.D. (2022). Identification of Intrinsically Disordered Proteins and Regions in a Non-Model Insect Species *Ostrinia nubilalis* (Hbn.). *Biomolecules*, 12(4), 592.

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА:

Кандидат је у докторској дисертацији комбиновао *in vivo*, *in vitro* и *in silico* приступе како би установио присуство, идентификовао и утврдио улогу протеина са различитим степенима структурне неуређености у процесима стицања отпорности на ниске температуре током дијапаузе мољца кукурузног пламенца *Ostrinia nubilalis*.

Један део истраживања се тицао успостављања и оптимизације методологије за детекцију, идентификацију и обогаћивање садржаја протеина са структурном неуређености у узорцима гусеница овог инсекта, с обзиром на то да овакав протеомски приступ тој тематици није раније примењиван код кукурузног пламенца. Овај циљ истраживања је веома успешно задовољен из неколико разлога. Утврђено је присуство протеина са структурном неуређеношћу код кукурузног пламенца, а њихов садржај је значајно обогаћен након термалне обраде узорака. Такође, показан је и значај термалне обраде узорака пре идентификације протеина, с обзиром на то да је велик број протеина у овој дисертацији идентификован тек након поступка обогаћивања садржаја структурно-неуређених протеина термалном обрадом узорака.

Други део истраживања се тицао одређивања степена структурне неуређености идентификованих протеина, утврђивања садржаја протеина са различитим нивоима структурне неуређености у узорцима излаганих различитим експерименталним условима и њихове карактеризације у погледу молекуларних функција које могу обављати у различитим

биолошким процесима. Биоинформатичким анализама је показано да је укупан садржај протеина са структурном неуређеношћу идентификованих код кукурузног пламенца у овој дисертацији у складу са процењеним садржајем ових протеина код еукариотских организама уопште. Функционална карактеризација је показала да постоје велике празнине у постојећим базама података о молекуларним функцијама већине идентификованих протеина из ове дисертације. Међу протеинима са структурном неуређеношћу за које постоје такви подаци, утврђено је да највећи број њих учествује у процесима у вези са организацијом и функционисањем цитоскелета, регулацијом сигналних путева и међумолекулским интеракцијама.

Последњи део истраживања је за циљ имао да утврди да ли и у којој мери протеини са структурном неуређеношћу учествују у променама које омогућавају организму да се адаптира на дуг период животног циклуса који проводи у стању смањене опште стопе метаболизма и током којег стиче отпорност на ниске температуре. Резултати овог дела истраживања су делимично потврдили почетну хипотезу да излагање ниским температурама током дијапаузе утиче на садржај протеина са структурном неуређеношћу у гусеницама кукурузног пламенца. Иако је показано да се садржај структурно-неуређених протеина не мења у различитим експерименталним групама, у дијапаузирајућим групама које су излагане ниским температурама значајно расте удео протеина који садрже структурно-неуређене регионе. Повишен садржај таквих протеина, који су флексибилни и функционални на кинетички неповољним ниским температурама, обезбеђује одржавање хомеостазе организма када је изложен стресним абиотским факторима као што су управо ниске температуре. Додатно, испитивана је релативна експресија гена који кодирају протеине за које је у овој дисертацији утврђено да поседују значајан степен структурне неуређености како би се утврдило да ли су детектоване промене на протеомском нивоу у сагласности и са променама на нивоу гена у различитим експерименталним групама. Праћена је експресија пет гена за протеине топлотног стреса, два за протеине у вези са функционисањем цитоскелета, једног за протеин хуморалног имунског одговора инсеката и једног за цитоскелетни протеин који регулише велик број сигналних путева. Релативна експресија већине испитиваних гена је била повишена у дијапаузирајућим групама излаганим ниским температурама, пратећи забележен пораст садржаја протеина са структурно-неуређеним регионима у тим експерименталним групама.

Слична истраживања, која су испитивала утицај неповољних услова животне средине на садржај протеина са структурном неуређеношћу, углавном су била извођена на прокариотским организмима, док се веома мали број њих бавио овом тематиком код еукариота и то углавном код биљних врста. Из тог разлога, резултати добијени овом докторском дисертацијом имају додатну тежину и значај како на пољу екофизиолошких улога структурно-неуређених протеина, тако и у разјашњавању молекуларних основа дијапаузе и промена које воде ка стицању отпорности на хладноћу.

In this doctoral dissertation the candidate has combined *in vivo*, *in vitro* and *in silico* approaches to detect the presence of, identify and determine the roles of proteins with different degrees of intrinsic disorder in processes that lead to the acquisition of cold hardiness during diapause in the European corn borer *Ostrinia nubilalis*.

One part of the research was dedicated to establishing and optimizing a methodology for the detection, identification and enrichment of proteins with intrinsic disorder in sampled larvae of the European corn borer, considering that such a proteomic approach has not been applied before in this species. This research goal is considered to be achieved due to several reasons. The presence of proteins containing intrinsic disorder has been detected in the European corn borer, while the content of these proteins has been enriched following sample heat treatment. Additionally, the significance of heat treating the samples before protein identification has been highlighted, as many proteins have been identified only following the heat treatment.

The second part of the research was concerned with determining the degree of intrinsic disorder in the identified proteins, assessing the content of proteins with different levels of intrinsic disorder in samples that were exposed to varying experimental conditions, as well as characterizing them in terms of their molecular functions and biological processes they can be involved in. Bioinformatical analyses established that the total content of proteins with intrinsic disorder identified in the corn borer in this dissertation is in accordance with their predicted content in eukaryotes in general. Functional characterization has shown that there are large gaps in existing databases when it comes to information on the molecular functions of the majority of proteins identified in this dissertation. Among proteins with intrinsic disorder that had available data points, most of them have been determined to be involved in processes concerning the organization and functionality of the cytoskeleton, regulation of signaling pathways and biomolecular interactions.

The aim of the final part of the research was to determine whether, and to what extent, proteins with intrinsic disorder are involved in changes that allow an organism to adapt to a long period of generally suppressed metabolism within its life cycle, during which it becomes cold hardy, as well. The hypothesis formulated for this dissertation is partially confirmed by the results acquired in this final stage of research. While it has been shown that the content of intrinsically disordered proteins does not differ between the experimental groups, larvae of diapausing groups exposed to low temperatures contain a significantly higher ratio of proteins with intrinsically disordered regions. Higher amounts of these proteins, which are flexible and retain their functionality at kinetically unfavorable cold temperatures, ensure that homeostasis is maintained when an organism is exposed to abiotic stressors such as these adverse temperatures. The relative expression of genes encoding proteins that were determined to contain a significant degree of intrinsic disorder has also been assessed, in order to ascertain whether the detected changes on the proteomic level are synchronized on the transcriptional level in different experimental groups, as well. The relative expression of five genes for heat shock proteins, two for cytoskeletal proteins, one for an insect humoral response protein and one for a cytoskeletal protein that regulates a multitude of signaling pathways has been analyzed. Most of the analyzed genes have been shown to be upregulated in diapausing groups exposed to low temperatures, mimicking the detected increase in the content of proteins with intrinsically disordered regions in these experimental groups.

Similar studies, which explored the effects of negative environmental conditions on the content of proteins with intrinsic disorder, were mostly done on prokaryotic organisms. Only a small number of them were conducted on eukaryotes, and mostly on plants at that. Because of that, the findings in this doctoral dissertation bear additional weight and significance not only in the field of the ecophysiological roles of intrinsically disordered proteins, but also in elucidating the molecular basis of insect diapause and changes that lead to the acquisition of insect cold hardiness.

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА:

Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.

Кандидат је адекватно и детаљно обрадио и приказао резултате на начин који јасно указује на њихов екофизиолошки значај у погледу биолошког контекста који је испитиван. Резултати су тумачени на систематичан начин, почевши од техничких аспеката метода које су коришћене и истицања предности коришћења истих у истраживању изведеном у овој дисертацији, до сагледавања добијених резултата у светлу истраживања других аутора и успостављања логичне и аргументоване везе са испитиваном тематиком.

Тестирањем на плагијаризам помоћу iThenticate софтвера (<https://www.ithenticate.com>) утврђен је проценат преклапања од 25%, од чега је 16% са радом на којем је кандидат први аутор, 3% са два рада на којима је коаутор, а за све остале изворе преклапање је мање од 1% понаособ.

The candidate has processed the results adequately and in detail, and presented them in a way that clearly points to their ecophysiological significance in regards the biological context that was being

studied. The results were interpreted systematically, starting with the technical aspects of the applied methods and highlighting their advantages for the studies carried out in this dissertation, to examining the results in light of findings from previous researchers and establishing a logical and reasoned connection with the studied subject.

Plagiarism testing was performed using the iThenticate software (<https://www.ithenticate.com>) and a literary overlap of 25% was determined. There was a 16% overlap with a publication where the candidate was the first author, a 3% overlap with two publications where he was a coauthor, and the overlap with the remaining sources was less than 1% each.

IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме?
Да, Комисија закључује да је ова дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

The Board concludes that the dissertation was written in accordance with the proposal submitted in the dissertation application.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе?
Да, Комисија закључује да ова дисертација садржи све битне елементе.

Yes, the Board concludes that the dissertation contains all the mandatory elements.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?

Истраживање рађено у оквиру ове дисертације је прво те врсте у којем је испитивана повезаност садржаја структурно-неуређених протеина и протеина са структурно-неуређеним регионима у процесима стицања отпорности на ниске температуре и адаптирања организма како би се одржала вијабилност током дугог периода хипометаболизма код врсте инсекта која служи као модел-систем за истраживања у вези са тим процесима. У овој дисертацији је успостављена и оптимизована метода за испитивање протеина са различитим степенима структурне неуређености у датом модел систему која комбинује *in vivo*, *in vitro* и *in silico* приступе, док резултати и закључци доприносе фундаменталној науци у погледу разумевања биохемијских и молекуларних основа хипометаболичког стања дијапаузе и адаптација које доводе до стицања отпорности на ниске температуре.

The research carried out in this dissertation is the first of its kind where the relationship between the content of intrinsically disordered proteins and proteins with intrinsically disordered regions and processes behind cold hardiness and adaptations to maintaining viability during a long period of hypometabolism was explored in an insect species that is used as a model system for studies related to these processes. This dissertation established and optimized a method for examining proteins with different degrees of intrinsic disorder in the given model system that combines *in vivo*, *in vitro* and *in silico* approaches, while the results and conclusions contribute to fundamental science in terms of understanding the biochemical and molecular basis of the hypometabolic state of diapause and adaptations that lead to the acquisition of resistance to low temperatures.

4. Који су недостаци дисертације и какав је њихов утицај на резултат истраживања?

Комисија сматра да дисертација нема недостатака, јер су задовољени циљеви истраживања који су били задати и добијени су резултати који представљају оригиналан и значајан допринос фундаменталној науци која се тиче екофизиолошких основа преживљавања организма у условима хипометаболичког стања дијапаузе и дуготрајне изложености неповољним условима животне средине.

The Board finds that the dissertation has no flaws because the set research goals were met and the obtained results represent an original and significant contribution to fundamental science concerning the ecophysiological basis of survival in a hypometabolic state of diapause and during long-term exposure to adverse environmental conditions.

X ПРЕДЛОГ:

На основу наведеног, комисија предлаже:

да се докторска дисертација кандидата **Милоша Аврамова** под називом „**Структурно-неуређени протеини кукурузног пламенца *Ostrinia nubilalis* (Hbn, 1796)**“ прихвати и да се кандидату одобри одбрана исте.

Taking into consideration the findings of this evaluation report, the Board recommends that the dissertation entitled „**Intrinsically disordered proteins of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* (Hbn, 1796)**“ written by candidate **Miloš Avramov** is to be accepted and the candidate allowed to proceed with its defense.

Место и датум: Нови Сад и Будимпешта, 05.04.2023.

1. др Едвард Петри, ванредни професор, председник
Edward Petri, PhD, Associate Professor, president

2. др Агнеш Тонтош, виши научни сарадник, члан
Ágnes Tantos, PhD, Senior Research Fellow, member

3. др Жељко Д. Поповић, ванредни професор, члан – ментор
Željko D. Popović, PhD, Associate Professor, member – advisor
