

Универзитет у Београду – Хемијски факултет

Наставно-научно веће

Предмет: Извештај Комисије за преглед и оцену докторске дисертације Ане Г. Пантелић, мастер биохемичара.

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду, одржаној 12.02.2026. године, одлука бр. 1197/7, одређени смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације мастер биохемичара Ане Пантелић, истраживача сарадника Универзитета у Београду – Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, под насловом:

„Идентификација и карактеризација ЛЕА протеина и метаболичких путева одговорних за толеранцију на десикацију биљке *Ramonda serbica* Pančić“

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је на својој седници одржаној дана 25.04.2024. године, на захтев Хемијског факултета, дало сагласност на предлог теме докторске дисертације под редним бројем 61206-527/4-24.

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

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Ане Г. Пантелић написана је на 126 страна А4 формата (фонт Times New Roman, величина 12 pt, проред 1, маргине 2 cm) и садржи 58 слика и 12 табела. Рад обухвата следећа поглавља: Увод (1 страна), Општи део (12 страна), Резултати (61 страна), Дискусија (16 страна), Експериментални део (18 страна), Закључак (1 страна), Литература (14 страна, 258 цитата) и Прилози (2 стране). Поред наведеног, дисертација садржи Захвалницу (2 стране), Сажетак на српском и енглеском језику (2 стране), Садржај (3 стране), Списак симбола и скраћеница (3 стране), Биографију кандидата (1 страна), Списак објављених и саопштених радова проистеклих из дисертације (1 страна), Изјаву о ауторству (1 страна), Изјаву о

истоветности штампане и електронске верзије докторског рада (1 страна) и Изјаву о коришћењу (2 стране).

Дисертација је по својој структури и садржају у складу са стандардним прописима Универзитета у Београду.

У **УВОДУ** су приказана разматрања везана за тему истраживања и указано је на значај испитивања толеранције на десикацију биљака васкрсница. Дефинисан је предмет и циљ истраживања докторске дисертације. Дат је увид у структуру докторске дисертације.

У **ОПШТЕМ ДЕЛУ** је кроз три поглавља дат преглед литературе и објашњени су термини који ће бити коришћени у наставку ове докторске дисертације. Дат је осврт на досадашња знања о десикацији и механизмима укљученим у толеранцију на десикацију, као и тренутна сазнања о толеранцији на десикацију српске рамонде. Посебан акценат је стављен на промене које се дешавају у ћелијском зиду током десикације, као и структурној и функционалној карактеризацији ЛЕА протеина.

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ** приказани су резултати добијени током израде ове докторске дисертације. Резултати испитивања толеранције на десикацију српске рамонде приказани су у четири потпоглавља. Укратко је дат преглед о току истраживања у првом потпоглављу.

У другом потпоглављу детаљно су представљени резултати добијени транскриптомском и протеомском анализом, као и одређивање одабраних метаболита (растворљиви шећери и фенолна једињења) током десикације и у условима потпуне хидратације. Такође, приказани су резултати утицаја десикације на фотосинтезу српске рамонде.

У трећем потпоглављу описане су хистолошке промене одређене светлосном микроскопијом и промене у саставу гликопротеина визуелизоване имуноцитохемијским бојењем и конфокалном микроскопијом. Окарактерисане су и промене у саставу полисахарида одређене FTIR спектроскопијом у циљу карактеризације ремоделовања компоненти ћелијског зида током десикације и у различитим фазама рехидратације (1, 24 и 48 сати од поновног заливања).

У четвртм потпоглављу идентификовани су ЛЕА протеини на основу транскриптомске анализе, описане су промене у експресији гена који кодирају ЛЕА протеине. Након идентификације ЛЕА протеини су подељени у групе и подгрупе, и *in silico* структурно и физичко-хемијски окарактерисани. Одабрана су три представника, произведена рекомбинантном ДНК технологијом и окарактерисана *in vitro* при различитим условима.

Поглавље **ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО** обухвата детаљне информације о биљном материјалу, као и о свим коришћеним методама, уређајима, и протоколима употребљеним у овој докторској дисертацији. Описани су поступци изоловања ДНК, протеина, и метаболита, као и оптимизовани протоколи за производњу одабраних ЛЕА протеина. Наведени су сви коришћени софтвери и програми.

У **ЗАКЉУЧКУ** су сумирани сви добијени резултати.

У делу **ЛИТЕРАТУРА** налази се укупно 258 литературних извора наведених по абecedном реду.

Поред наведеног, докторска дисертација садржи и **ПРИЛОГ** у коме се налази додатни материјали објављених радова, коришћених у овој докторској дисертацији, као и слика вектора и секвенце прајмера.

Б. Кратак опис постигнутих резултата

У оквиру овог рада добијен је списак диференцијално експримираних гена, различито заступљених протеина и метаболита (растворљивих шећера и полифенола) у хидратисаним и десикованим листовима српске рамонде. На основу добијених резултата протеомиком и транскриптомиком идентификовани су главни метаболички путеви који се активирају током десикације, као што су С1 метаболизам, метаболизам хема и азота, биосинтеза скроба и синтеза протеина. Хроматографском анализом хидратисаних и десикованих листова српске рамонде, примећена је акумулација специфичних олигосахарида и шећерних алкохола током десикације, док је анализом параметара брзе кинетике флуоресценције хлорофила (ОЈР) показана инхибиција фотосинтезе услед губитка активних реакционих центара у листовима српске рамонде. Такође, утврђене су значајне промене у количини заштитних ЛЕА протеина. Посебан сегмент истраживања обухватио је идентификацију 433 ЛЕА протеина (на основу транскриптомике), од којих је 318 класификовано према хомологији у седам група (ЛЕА1-5, СМП, дехидрини). Групе су даље подељене у подгрупе, на основу присуства специфичних мотива. Сви ЛЕА протеини су структурно (предвиђање секундарне и терцијарне структуре) и физичко-хемијски (pI, *Grav*у индекс, проценат аминокиселина, молекулска маса, итд.) окарактерисани. Такође је предвиђена њихова локализација у ћелији. Након спроведених *in silico* анализа, три одабрана ЛЕА протеини која припадају ЛЕА4 протеинској групи српске рамонде су произведена технологијом рекомбинантне ДНК и пречишћени, након чега је *in vitro* испитана њихова структура спектроскопијом циркуларног дихроизма у условима сличним

десикацији и у присуству миметика мембране, као и при различитим рН вредностима. Показан је структурни прелаз одабраних ЛЕА протеина из неуређене конформације у уређену, одабраних ЛЕА протеина у условима сличним десикацији, као и у присуству миметика мембране. При различитим рН вредностима, није дошло до промене неуређене структуре изабраних протеина. С обзиром на то да српска рамонда спада у хомоихлорофилне биљке које не разграђују хлорофил и одржавају структуру тилакоида током суше, претпостављена је и заштитна улога ЛЕА протеина у очувању тилакоидних мембрана, пошто су два од три произведена протеина предвиђена да се налазе у хлоропластима. Такође, опсежно су испитане су промене у саставу компоненти ћелијског зида неопходне за десикацију и опоравак након рехидратације. У циљу анализе диференцијално заступљених протеина, оптимизован је протокол за изоловање јонски везаних протеина из фракције обогаћене ћелијском зидом, и примењена је селективна протеомика ове фракције. Резултати су указали на пет диференцијално заступљених протеина, од којих су два ЛЕА протеина, која припадају ЛЕА4 протеинској групи, где је претпостављено да имају заштитну улогу. Могу имитирати молекуле воде или механизмом молекулског штита, спречити агрегацију макромолекула у ћелијском зиду. Истовремено, светлосна микроскопија је показала смањење запремине ћелије и набирање ћелијског зида, без прекида у његовом континуитету. Такође, примећено је да пектин заједно са хемицелулозом има кључну улогу у одговору српске рамонде на десикацију, као и на рехидратацију. Финално, показано је да су промене које доводе до ремоделовања архитектуре ћелијског зида и повећања његове еластичности реверзибилне и да обухватају смањење арабиногалактанских протеина и повећање високометилестерификованог хомогалактуронана.

В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Суша, као главни узрок огромних економских губитака у агрокултури, погађа више од 60 % површине обрадивог земљишта [1]. Предвиђања указују да ће током наредне деценије климатске промене индуковати повећање учесталости и интензитета сушних периода. Успех биотехнолошких и синтетичко-биолошких метода које се користе у циљу побољшања отпорности на сушу, заснивају се на познавању молекулских механизма који се налазе у основи толеранције на десикацију отпорних биљних врста. Особине биљака које су отпорне на сушу би могле да се пренесу на биљне врсте од пољопривредног значаја, које су осетљиве на смањену количину воде у земљишту. Биљке васкрснице, које преживљавају дуге периоде десикације и представљају одличан модел-систем за овакав приступ [2].

Српска рамонда (*Ramonda serbica* Panč.) је биљка васкрсница, која припада породици *Gesneriaceae*. Са еволутивног становишта, као ендемска врста и терцијарни реликт [3], српска рамонда додатно представља одличан модел-систем за проучавање толеранције на десикацију – феномена који се сматра кључним кораком у еволуцији примитивних копнених биљака.

Толеранција на десикацију је комплексан процес који зависи од строге регулације на нивоу гена, протеина и метаболита, али и на физиолошком и морфолошком нивоу. Код неколико до сада испитиваних биљака васкрсница важну улогу током процеса десикације и рехидратације има више метаболичких путева који су временски и просторно строго координисани. Једну од кључних улога у овом феномену имају протеини заступљени у касној фази ембриогенезе – LEA протеини (енг. *late embryogenesis abundant*), који имају способност стабилизације структуре ћелијских протеина и мембрана у условима дефицита воде [4].

Током десикације долази до значајног смањења запремине ћелије услед губитка воде, при чему плазмалема и ћелијски зид морају синхронизовано да прате ове промене. Поменути процес подразумева контролисано сабијање ћелијског зида, без прекида његовог континуитета чиме се спречава кидање механичких веза између плазмалеме и зида, што је од пресудног значаја за одржавање интегритета ћелије [5].

Интердисциплинарни приступ, заснован на принципима системске биологије, омогућава свеобухватан увид у сложене механизме толеранције који укључују велики број ћелијских фактора, њихове међусобне интеракције и регулаторне мреже [6]. Интеграцијом информација о променама нивоа транскрипта, протеина и метаболита током десикације и рехидратације, омогућава целовит приказ метаболичког стања биљке током испитиваних стања и директно указује на метаболичке путеве који су кључни за опстанак у екстремним условима нрдостатка воде [7].

Досадашње студије о расветљавању механизма толеранције на десикацију, код српске рамонде, подразумевале су анализу антиоксидативних ензима, пре свега појачане активности појединих ензима аскорбат-глутатион циклуса, супероксид-дисмутазе и полифенол-оксидазе, посебно током рехидратације када је и стварање реактивних кисеоничних врста највеће. Осим тога, испитиване су и морфолошко-анатомске промене српске рамонде током десикације и опоравка. Показана је и значајна акумулација моносахарида и дисахарида, пролина, као и промене у садржају фенолних и органских киселина, али и фотосинтетских параметара [3,8–10].

Ова дисертација представља прву свеобухватну студију која на молекуларном нивоу објашњава метаболизам српске рамонде и регулацију међусобно повезаних путева током десикације и рехидратације, посебно оних метаболичких процеса који су укључени у промене

садржаја протективних протеина и реорганизацију структуре ћелијског зида. Стога предмет истраживања ове тезе представља идентификацију метаболичких путева одговорних за толеранцију на десикацију, као и оних неопходних за успешан опоравак српске рамонде, са посебним освртом на заштитне LEA протеине и ремоделовање архитектуре ћелијског зида.

Литература

1. VanBuren R, Man Wai C, Giarola V, Župunski M, Pardo JJ, Kalinowski M, Grossmann G, Bartels D. Core cellular and tissue-specific mechanisms enable desiccation tolerance in *Craterostigma*. *Plant J*. 2023;114(2):231–245. <https://doi.org/10.1111/tpj.16165>
2. Farrant JM, Hilhorst HWM. What is dry? Exploring metabolism and molecular mobility at extremely low water contents. *J Exp Bot*. 2021;72(5):1507–1510. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa579>
3. Rakić T, Lazarević M, Jovanović S, Radović S, Siljak-Yakovlev S, Stevanović B, Stevanović V. Resurrection plants of the genus *Ramonda*: prospective survival strategies—unlock further capacity of adaptation, or embark on the path of evolution? *Front Plant Sci*. 2014;4:550. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00550>
4. Ingram J, Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1996;47:377–403. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.377>
5. Jung NU, Giarola V, Chen P, Knox JP, Bartels D. *Craterostigma plantagineum* cell wall composition is remodelled during desiccation and the glycine-rich protein CpGRP1 interacts with pectins through clustered arginines. *Plant J*. 2019;100:661–676. <https://doi.org/10.1111/tpj.14479>
6. Liu Z, Shen C, Chen R, Fu Z, Deng X, Xi R. Combination of transcriptomic, biochemical, and physiological analyses reveals sugar metabolism in *Camellia drupifera* fruit. *Front Plant Sci*. 2024;15:1424284. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1424284>
7. Challabathula D, Bartels D. Desiccation tolerance in resurrection plants: new insights from transcriptome, proteome and metabolome analysis. *Front Plant Sci*. 2013;4:482. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00482>
8. Veljović Jovanović S, Kukavica B, Navari-Izzo F. Characterization of polyphenol oxidase changes induced by desiccation of *Ramonda serbica* leaves. *Physiol Plant*. 2008;132:407–416. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01040.x>
9. Veljović Jovanović S, Kukavica B, Stevanović B, Navari-Izzo F. Senescence- and drought-related changes in peroxidase and superoxide dismutase isoforms in leaves of *Ramonda serbica*. *J Exp Bot*. 2006;57(8):1759–1768. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl007>
10. Gođevac D, Ivanović S, Simić K, Anđelković B, Jovanović Ž, Rakić T. Metabolomics study of the desiccation and recovery process in the resurrection plants *Ramonda serbica* and *R. nathaliae*. *Phytochem Anal*. 2022;33(6):961–970. <https://doi.org/10.1002/pca.3151>

Г. Научни радови објављени у међународним часописима и саопштења са скупова који чине део докторске дисертације

Из резултата ове докторске дисертације проистекла су три рада објављена у водећим међународним часописима (M21):

1. **Pantelić A**, Iliina T, Milić D, Gradišar H, Radosavljević J, Vidović M. Structural flexibility of a recombinant intrinsically disordered LEA protein from *Ramonda serbica*. *Sci Rep.* 2025;15(1):34808. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-18648-w>
2. Vidović M, Battisti I, **Pantelić A**, Morina F, Arrigoni G, Masi A, Veljović Jovanović S. Desiccation tolerance in *Ramonda serbica* Panc.: an integrative transcriptomic, proteomic, metabolite and photosynthetic study. *Plants (Basel)*. 2022; 11(9):1199. <https://doi.org/10.3390/plants11091199>
3. **Pantelić A**, Stevanović S, Komić SM, Kilibarda N, Vidović M. In silico characterisation of the late embryogenesis abundant (LEA) protein families and their role in desiccation tolerance in *Ramonda serbica* Panc. *Int J Mol Sci.* 2022;23(7):3547. <https://doi.org/10.3390/ijms23073547>

M34 - Саопштење са међународног скупа штампано у изводу

1. **Pantelić A**, Iliina T, Vidović M, Divac Rankov A. Transcriptomes and proteomes of the desiccation-tolerant resurrection plant *Ramonda serbica*. In: *Book of Abstracts of the Belgrade Conference for Early-Career Life Scientists*; 2025; Belgrade, Serbia, 2025.
2. **Pantelić A**, Iliina T, Milić D, Gradišar H, Vidović M. LEA4 protein family group originated from *Ramonda serbica*: structural analysis. In: *Proceedings of the 15th European Biophysics Congress*; 2025; Rome, Italy, 2025.
3. **Pantelić A**, Iliina T, Milić D, Gradišar H, Bednarikova Z, Vidović M. Structural properties of intrinsically disordered dehydrins underlying their protective role in desiccation tolerance. In: *Proceedings of the 15th European Biophysics Congress*; 2025; Rome, Italy, 2025
4. **Pantelić A**, Iliina T, Milić D, Senčanski M, Vidović M. Aggregation of LEA proteins from *Ramonda serbica*: in silico vs. in vitro. In: *Proceedings of the 5th Belgrade Bioinformatics Conference*; 2024; Belgrade, Serbia, 2024.
5. **Pantelić A**, Stevanović S, Milić Komić S, Kilibarda N, Vidović M. Two contrasting late embryogenesis abundant protein family groups of *Ramonda serbica* Panc. In: *Proceedings of the 4th Belgrade Bioinformatics Conference*; 2023; Belgrade, Serbia, 2023.
6. **Pantelić A**, Senčanski M, Prodić I, Milić D, Vidović M. Group 4 late embryogenesis abundant (LEA) proteins as a model to study propensity for oligomerisation. In: *Non-globular proteins in the era of machine learning*; 2023; Bratislava, Slovakia, 2023.
7. **Pantelić A**, Stevanović S, Milić D, Milić Komić S, Kilibarda N, Vidović M. Late embryogenesis abundant (LEA) proteins in *Ramonda serbica* Panc.: identification, classification and structural

characterization. In: *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Biology and 23rd SPPS Meeting*; 2022; Belgrade, Serbia, 2022.

8. **Pantelić A**, Stevanović S, Kilibarda N, Milić Komić S, Radosavljević J, Vidović M. Characterization of the late embryogenesis abundant (LEA) proteins family in hydrated and desiccated *Ramonda serbica* Panc. leaves. In: *Biochemical Insights into Molecular Mechanisms*; 2021; Kragujevac, Serbia; 2021.
9. **Pantelić A**, Stevanović S, Kilibarda N, Vidović M. De novo transcriptome sequencing of *Ramonda serbica*: identification of late embryogenesis abundant proteins. In: *Proceedings of the Belgrade Bioinformatics Conference*; 2021; Belgrade, Serbia. Belgrade, 2021.

Д. Провера оригиналности докторске дисертације

На основу увида Оригиналност докторске дисертације Ане Г. Пантелић је проверена употребом програма iThenticate на начин прописан Правилником о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду („Гласник Универзитета у Београду“, бр.204/18). Резултати провере оригиналности су показали да је степен подударности од 8 % настао услед коришћења универзалних скраћеница, назива једињења или метода, као и претходно публикованих резултата истраживања проистеклих из дисертације, што је прихватљиво у складу са чланом 9. овог Правилника. Комисија сматра да је докторска дисертација Ане Г. Пантелић оригинална, као и да су у потпуности испоштована академска правила цитирања.

Е. Закључак

На основу увида у целокупну садржину докторске дисертације под називом „Идентификација и карактеризација ЛЕА протеина и метаболичких путева одговорних за толеранцију на десикацију биљке *Ramonda serbica* Pančić“ Комисија сматра да је кандидаткиња, мастер биохемичар, Ана Г. Пантелић, у потпуности одговорила на све постављене истраживачке задатке. Кандидаткиња је успешно идентификовала главне метаболичке путеве који су укључени у десикацију. ЛЕА протеини су окарактерисани *in silico*, успешно произведени и пречишћени у циљу даље структурне и функционалне карактеризације *in vitro*. Такође, окарактерисане су промене у ремоделовању архитектуре ћелијског зида, током десикације али и у различитим фазама рехидратације.

Резултати истраживања проистекли из ове докторске дисертације објављени су у оквиру

три научна рада у међународним часописима категорије M21. Поред тога, резултати су саопштени на више научних међународних скупова.

На основу свега изложеног, Комисија је закључила да се ова дисертација у потпуности уклапа у савремене токове истраживања из области протеинске и биљне биохемије, те предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Хемијског факултета да прихвати поднету докторску дисертацију Ане Г. Пантелић под насловом: „Идентификација и карактеризација ЛЕА протеина и метаболичких путева одговорних за толеранцију на десикацију биљке *Ramonda serbica* Pančić” и одобри њену јавну одбрану, чиме би били испуњени услови за стицање научног звања доктор биохемијских наука.

У Београду, 05.03.2026.

Чланови комисије:

др Веле Тешевић, редовни професор,
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

др Мира Милисављевић, виши научни сарадник,
Универзитет у Београду – Институт за молекуларну
генетику и генетичко инжењерство

др Гордана Крстић, доцент,
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

Ментори:

др Љубодраг Вујисић, ванредни професор,
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

др Марија Видовић, научни саветник,
Универзитет у Београду – Институт за молекуларну
генетику и генетичко инжењерство