

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

На VI редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 11.04.2023. године, на основу молбе ментора, др Јелене Арамбашић-Јовановић, научног саветника, Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду и др Мелите Видаковић, научног саветника, Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације Марије Б. Ђорђевић, истраживача сарадника, Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду под насловом: „Трансдиференцијација алфа ћелија панкреаса миша у ћелије које производе инсулин циљаном метилацијом ДНК применом Ери-CRISPR система“, у саставу: др Душанка Савић-Павићевић, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду; др Светлана Динић, научни саветник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду и др Ања Толић, научни сарадник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду.

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

### **ИЗВЕШТАЈ**

#### **Општи подаци о докторској дисертацији**

Докторска дисертација **Марије Б. Ђорђевић** под насловом „Трансдиференцијација алфа ћелија панкреаса миша у ћелије које производе инсулин циљаном метилацијом ДНК применом Ери-CRISPR система“ урађена је на

Одељењу за молекуларну биологију Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду, у оквиру пројекта „Сигнални молекули у дијабетесу: идентификација потенцијалних биолошких маркера укључених у модификацију и интеграцију сигналних путева у циљу предикције и интервенције у дијабетесу“, потпројекат „Генетска предиспозиција за развој дијабетеса тип 1 и нови приступи у превенцији дисфункције  $\beta$  ћелија у дијабетесу: изучавање путева преноса сигнала посредованих CXCL12 (ОИ173020) и Плана и програма рада Института за 2020. годину (451-03-69/2020-14/200007), 2021. (451-03-9/2021-14/200007), 2022. (451-03-68/2022-14/200007) и 2023. (451-03-47/2023-01/200007) годину финансираних од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије. Израда ове докторске дисертације је једним делом финансирана и од стране Европске Фондације за истраживања у дијабетесу (ЕФСД), помоћу истраживачког гранта компаније AstraZeneca.

Докторска дисертација садржи укупно 116 страна од чега је нумерисано 96 страна. Нумерисани текст је подељен на 8 поглавља: **Увод** (21), **Циљеви** (2), **Материјал и методе** (14), **Резултати** (22), **Дискусија** (14), **Закључци** (1), **Литература** (17) и **Прилози** (5). Дисертација укључује и 269 литературних цитата који су исправно назначени у тексту. На уводним непагинираним странама се налазе насловне стране на српском и енглеском језику, листа ментора и чланова комисије, изјава захвалности, сажетци на српском и енглеском језику, листа скраћеница и садржај (20 страна на почетку).

## **Анализа докторске дисертације**

У поглављу **Увод**, кандидаткиња Марија Б. Ђорђевић је кроз седам одељака дала детаљан и систематичан преглед података из научне литературе који описују релевантна сазнања која су у вези са предметом истраживања докторске дисертације. У одељку **Дијабетес** кандидаткиња даје основне информације о распрострањењу и учесталости дијабетеса, његовој класификацији са описом узрока настанка и развоја болести. Следећи одељак је **Ендокрини панкреас** у коме је описана структура панкреаса са посебним освртом на организацију и распрострањеност ћелија које улазе у састав ендокриног дела панкреаса. У одељку **Идентитет ћелија ендокриног панкреаса и њихово одржавање**

кандидаткиња је истакла значај епигенетичких механизма у процесу ћелијске диференцијације који представља пут ка стицању различитих ћелијских идентитета код вишећелијских организама при чему ћелије поседују исти генетички материјал. Епигенетички механизми су одговорни и за касније одржавање стеченог ћелијског идентитета. Побројани су регулаторни фактори чија временска и просторна експресија утиче на стицање, одржавање и адекватну функцију ћелија ендокриног панкреаса. С обзиром на проблематику докторске дисертације, детаљније су описане алфа и бета ћелије ендокриног панкреаса као и улоге њихових хормона, инсулина и глукагона. Посебан акценат је стављен на ген *Arx* и његову улогу у формирању и одржавању идентитета алфа ћелија панкреаса. Након прегледа базичних информација везаних за метилацију молекула ДНК као епигенетичкој модификацији која регулише генску експресију, дат је детаљан приказ позиција регулаторних региона и транскрипционих фактора који су важни за регулацију експресије гена *Arx* у ћелијама ендокриног панкреаса. У наредном одељку **Терапија дијабетеса** кандидаткиња је дала преглед актуелних приступа у терапији дијабетеса и трендова у истраживањима који су фокусирани на проналажење алтернативних извора бета ћелија у циљу надомештања њиховог броја код оболелих од дијабетеса. Затим следи одељак **Модел конвезија соматских ћелија у ћелије које производе инсулин** у коме је кандидаткиња представила детаљан преглед литературе која се односи на покушаје трансдиференцијације различитих соматских типова ћелија у ћелије које производе инсулин. У овом одељку је показано под којим условима се покреће процес промене идентитета разних непанкреатичних и панкреатичних ћелија. Посебно су истакнуте алфа ћелије као најадекватније за трансдиференцијацију у ћелије које производе инсулин. Одељак **Епигенетичко едитовање** даје приказ основа функционисања алата за епигенетичко едитовање и важност њихове потенцијалне примене. Истакнути су CRISPR/Cas9 систем и модификација овог алата која има способност да циљано уводи метилацију молекула ДНК. У последњем одељку су описане **Трансфекције** као лабораторијска метода од великог значаја за изучавање разних молекуларно биолошких феномена. Кандидаткиња је дала основну поделу метода за трансфекцију и описала две најрелевантније методе за предмет истраживања своје докторске дисертације.

У поглављу **Циљеви** су јасно и концизно формулисани циљеви ове докторске дисертације који су дефинисани на основу актуелних приступа у проналажењу

адекватније терапије за оболеле од дијабетеса која се односи на повећање масе бета ћелија и познатих чињеница из литературе о одржавању идентитета алфа ћелија панкреаса. Имајући у виду чињеницу да су раније коришћени приступи за директну конверзију ћелијског идентитета често укључивали компликоване процедуре, кандидаткиња истиче важност једноставнијег приступа и минималну манипулацију у току процеса трансдиференцијације индуковањем циљаних епигенетичких модификација за потенцијалну примену у *in vivo* системима. Стога је општи циљ ове докторске дисертације дефинисан као трансдиференцијација алфа ћелија панкреаса у ћелије које производе инсулин помоћу циљане метилације промотора гена *Arx* уз помоћ алата за епигенетичко едитовање у *in vitro* условима. Пут до постизања овог циља је подразумевао и некаолико посебих циљева који укључују: **1)** Одабир и оптимизацију методе за трансфекцију алфа ( $\alpha$ TC1-6) ћелијске линије панкреаса миша; **2)** Испитивање успешности увођења метилације молекула ДНК на промотору гена *Arx*; **3)** Анализу ефеката уведене циљане метилације на експресију гена *Arx* и трансдиференцијацију ћелија  $\alpha$ TC1-6; **4)** Испитивање степена трансдиференцијације трансфектованих  $\alpha$ TC1-6 ћелија.

У поглављу **Материјал и методе** које је подељено на пет одељака, кандидаткиња је дала детаљан опис свих коришћених експерименталних метода, начина обраде и приказивања добијених резултата, као и све реагенсе и апаратуру која је коришћена у експерименталном раду. У првом одељку су дате информације о манипулацији са коришћеним ћелијским културама, оптимизацији трансфекције, припреми плазида за трансфекцију и анализи ефикасности трансфекције у циљу ефикасног уношења алата за епигенетичко едитовање у  $\alpha$ TC1-6 ћелијску линију. У следећем одељку су детаљно описане методе за манипулацију нуклеинским киселинама изолованим из контролних и трансфектованих  $\alpha$ TC1-6 ћелија у неколико различитих временских тачака након трансфекције. Изоловани материјал је коришћен за анализу метилације циљаног региона молекула ДНК као и анализу транскриптома у циљу праћења индукованих промена на молекулу ДНК као и ефеката уведених промена на генску експресију транскрипционих фактора. Трећи одељак описује методе које су коришћене за манипулацију протеинима као што су имуноцитохемијска и имуноблот анализа, ензимски имуноесеј за анализу присуства ослобођених хормона као и хроматинска имунопреципитација за анализу присутности циљаних протеина и њихових модификација на специфичним секвенцама.

Последња два одељка се односе на информације везане за прављење схема и статистичку анализу добијених података.

Поглавље **Резултати** је подељено на три већа одељка у којима кандидаткиња приказује и интерпретира резултате који су добијени у току израде ове докторске дисертације а који су илустровани са укупно 18 слика. У првом одељку **Оптимизација трансфекције за  $\alpha$ TC1-6 ћелијску линију** приказани су резултати добијени након трансфекције  $\alpha$ TC1-6 ћелија помоћу полиетиленимина, а затим и резултати оптимизације нуклеофекције помоћу којих су дефинисани параметри за ову методу а који су обезбедили високу ефикасност трансфекције  $\alpha$ TC1-6 ћелијске линије. У одељку **Анализа панкреатичних алфа и бета ћелија** приказан је и поређен транскриптом алфа и бета ћелијске линије миша, ниво присуства главних хормонских продуката ових ћелија, као и анализа епигенетичких маркера који се налазе у циљаном делу промотора гена *Arx* као што су метилација и хистонске модификације. Ниво циљано уведене метилације на молекулу ДНК помоћу Epi-CRISPR алата анализиран је и описан у одељку **Иницирање промене фенотипа  $\alpha$ TC1-6 ћелија након циљане метилације помоћу Epi-CRISPR система**. Резултати су показали да је циљана метилација достигла ниво који је детектован у NIT-1 бета ћелијској линији. Као последица уведених измена, детектована је супресија *Arx*-а која је праћена иницијацијом синтезе инсулина у  $\alpha$ TC1-6 ћелијама. Анализом транскриптома трансфектованих ћелија утврђено је да након циљаног увођења метилације долази до промена у обрасцу експресије укупно 623 гена, а да један део ових гена има важну улогу у обликовању идентитета бета ћелија панкреаса. Детектоване су транзијентне промене у експресији неколико гена који су карактеристични за бета ћелије. Детекција инсулина у овим ћелијама указује на појаву бихормоналног стања које је праћено смањеним ослобађањем глукагона ван ћелија.

У оквиру поглавља **Дискусија** кандидаткиња је представила упоредну анализу добијених експерименталних резултата и релевантних литературних података. У овом поглављу описан је процес одржавања ћелијског идентитета и значај његове промене у примени у регенеративној медицини за коју је дијабетес добар кандидат с обзиром на узрок настанка болести. Такође, дати су разлози који оправдавају избор алфа ћелија панкреаса као атрактиван и оптималан извор ћелија за трансдиференцијацију у ћелије које производе инсулин. Представљани су примери и значај примена епигенетичких алата у

циљу промена ћелијског идентитета. Кандидаткиња је описала процес оптимизације трансфекције  $\alpha$ ТС1-6 ћелија и образложила избор методе као и различите факторе који могу да утичу на ефикасност овог процеса. Друга половина овог поглавља се односи на анализу процеса трансдиференцијације након циљаног увођења метилације на промотору гена *Arx*. Описана је и поређена способност и механизам увођења метилације коришћених фузионих конструктора у оквиру докторске дисертације и у другим биолошким системима у којима су ови типови конструктора већ били коришћени. Кандидаткиња је дискутовала одабир конструктора, одабир временских тачака за анализу као и праћење присуства конструктора у ћелијама које је дефинисано транзијентном трансфекцијом. Анализиран је и дискутован ефекат уведене метилације на промену експресије дела гена који су повезани са бета ћелијама и почетак ћелијске трансдиференцијације. Такође је коментарисала и степен и трајање промена које су настале након једне трансфекције и поредила са литературним подацима, истичући значај хроматинске структуре за успешност ћелијског репрограмирања. Кандидаткиња је на крају коментарисала и потенцијалне могућности за додатна истраживања која би за циљ имала додатну стабилизацију промена у експресији гена *Arx* и повећање степена трансдиференцијације алфа ћелија.

У поглављу **Закључци** кандидаткиња је јасно и концизно сумирала и навела осам основних закључака на основу добијених и анализираних резултата: **1)** Ћелијска линија алфа ћелија панкреаса миша  $\alpha$ ТС1-6 је добар модел систем за испитивање способности промене ћелијског идентитета увођењем епигенетичких модификација; **2)** Ефикасност трансфекције  $\alpha$ ТС1-6 ћелија се разликује у зависности од примењене методе; **3)** Епигенетички пејзаж (метилација молекула ДНК и хистонске модификације H3K4me3 и H3K9me3) промотора гена *Arx* одговара функционалној генској експресији у  $\alpha$ ТС1-6 ћелијама и одсуству експресије у NIT-1 ћелијама; **4)** Уведена циљана метилација гена *Arx* доводи до временски ограничене, дуго мање експресије нивоа иРНК, која се враћа на почетни ниво 12 дана након трансфекције; **5)** Пролазно смањење експресије гена *Arx* довољно је за покретање процеса трансдиференцијације  $\alpha$ ТС1-6 ћелија у ћелије које производе инсулин. 1% транзијентно трансфектованих ћелија производи 35% више инсулина у односу на лажно трансфектоване ћелије. Инсулин је детектован на нивоу иРНК и протеина унутар и ван ћелија до 15 дана након трансфекције; **6)** Транскрипциони профил епигенетички модификованих  $\alpha$ ТС1-6 ћелија је сличнији профилу алфа ћелија

него бета ћелија; 7)  $\alpha$ TC1-6 ћелије које производе инсулин ослобађају мање глукагона иако не показују промене у експресији иРНК за глукагон; 8) Изнети закључци о ефекту пролазно уведене метилације потврђују значај стабилности епигенетичких модификација у очувању/промени ћелијског идентитета и пружају добру основу за даљу примену епигенетичких алата у циљу епигенетичког репрограмирања.

Поглавље **Литература** садржи листу од 269 библиографских јединица што указује да је кандидаткиња темељно приступила проучавању тематике коју обрађује у оквиру докторске дисертације. Референце се тичу истраживања која су од значаја за ову докторску дисертацију, адекватно су цитиране и објашњавају добијене резултате.

На крају текста ове докторске дисертације у поглављу **Прилози** се налазе биографија аутора, изјава о ауторству, изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и изјава о коришћењу.

## **Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације**

### **Б1. Радови у часописима међународног значаја**

1. **Ђорђевић М**, Paunović V, Jovanović Tucović M, Tolić A, Rajić J, Dinić S, Uskoković A, Grdović N, Mihailović M, Marković I, Arambašić Jovanović J, Vidaković M. Nucleofection as an Efficient Method for Alpha TC1-6 Cell Line Transfection. *Applied Sciences*. 2022; 12(15):7938. **M22**, <https://doi.org/10.3390/app12157938>
2. **Ђорђевић М**, Stepper P, Feuerstein-Akgoz C, Gerhauser C, Paunović V, Tolić A, Rajić J, Dinić S, Uskoković A, Grdović N, Mihailović M, Jurkowska R, Jurkowski T, Arambašić-Jovanović J, Vidaković M. EpiCRISPR targeted methylation of Arx gene initiates transient switch of mouse pancreatic alpha to insulin-producing cells. *Frontiers in Endocrinology*. 2023; (14) 1134478. **M21**, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2023.1134478/full>

### **Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја**

1. **Ѕинадиновић М**, Arambašić Jovanović, J., Tolić, A., Ђорђевић, М., Mihailović, М., Grdović, N., Uskoković, A., Rajić, J., Poznanović, G., Dinić, S., Jurkowski, T.P., Vidaković, M., 2017. Transdifferentiation of pancreatic alpha to beta cells via targeted epigenome editing by Epi-CRISPRs-s directed DNA DNA methylation, in: Mourdjeva, M., Kistanova, E., Fazeli, A., Brevini, T. (Eds.), In vitro 3-D Total Cell Guidance and

Fitness. Jointly published by the Institute of Biology and Immunology of Reproduction, BAS, COST Action CA16119 and Mouseprint Ltd., Albena Resort, Bulgaria, p. 80. **M34**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **Sinadinović, M.**, Arambašić Jovanović, J., Tolić, A., Đorđević, M., Mihailović, M., Grdović, N., Uskoković, A., Rajić, J., Dinić, S., Jurkowski, T.P., Vidaković, M. Transdifferentiation of pancreatic alpha to beta cells using Epi-CRISPR directed DNA methylation. In: Brajušković, G., Đorđević, A. (Eds.), 1st Congress of Molecular Biologists of Serbia - CoMBoS. Belgrade: University of Belgrade, Faculty of Biology, Belgrade, Serbia, September 20-22, 2017, p. 73. **M64**



## Софтверска провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертације кандидаткиње Марије Б. Ђорђевић послата је дана 29.03.2023. године на софтверску проверу оригиналности, а извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио дана 30.03.2023. Након провере оригиналности докторске дисертације Марије Б. Ђорђевић под насловом „Трансдиференцијација алфа ћелија панкреаса миша у ћелије које производе инсулин циљаном метилацијом ДНК применом Epi-CRISPR система“, коришћењем програма *iThenticate* у Универзитетској библиотеци „Светозар Марковић“, извештај је показао индекс сличности од **12%**. Анализом извештаја утврђено је да је степен подударности текста последица употребе скраћеница које се налазе у општој употреби, назива институција, пројеката, личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, претходно публикованих резултата који су део докторске дисертације, назива одређених произвођача, хемикалија, као и описа стандардизованих експерименталних метода. Све наведено је у складу са чланом 9. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и указује на оригиналност докторске дисертације кандидаткиње Марије Б. Ђорђевић те је настављен прописани поступак припреме за њену одбрану.

## Мишљење и предлог Комисије

Увидом у докторску дисертацију под насловом „Трансдиференцијација алфа ћелија панкреаса миша у ћелије које производе инсулин циљаном метилацијом ДНК применом Ери-CRISPR система“, Комисија констатује да она представља оригинални научни рад кандидаткиње Марије Б. Ђорђевић. Резултати из ове докторске дисертације су показали да је циљано индуковање метилације помоћу ЕриCRISPR система на промотору гена *Arx* довољно да доведе до покретања процеса трансдиференцијације и производње инсулина у овим ћелијама. Приказани резултати представљају важан научни допринос у разјашњавању процеса промене ћелијског идентитета услед увођења епигенетичких модификација на циљаним позицијама, и пружају добру основу за будућа истраживања и примену система за увођење епигенетичких модификација у *in vivo* системима. На значај истраживања и резултата добијених током израде ове докторске дисертације указују и две објављене публикације у врхунским међународним часописима (M21 и M22).

Имајући у виду квалитет докторске дисертације **Марије Б. Ђорђевић**, под насловом „Трансдиференцијација алфа ћелија панкреаса миша у ћелије које производе инсулин циљаном метилацијом ДНК применом Ери-CRISPR система“, Комисија има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену Комисије и одобри јавну усмену одбрану докторске дисертације кандидаткиње Марије Б. Ђорђевић.

**КОМИСИЈА:**

У Београду, 25.04.2023. године

---

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

---

др Светлана Динић, научни саветник,  
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ -  
Институт од националног значаја за Републику Србију,  
Универзитет у Београду

---

др Ања Толић, научни сарадник,  
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ -  
Институт од националног значаја за Републику Србију,  
Универзитет у Београду