

СТУДИЈЕ ПРИ УНИВЕРЗИТЕТУ
УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

ВЕЋЕ ЗА СТУДИЈЕ ПРИ УНИВЕРЗИТЕТУ

Предмет: Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидаткиње Анђеле М. Родић

Одлуком Већа за студије при Универзитету, именовани смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидаткиње **Анђеле М. Родић** под насловом:

“Биофизичко моделовање рестрикционо-модификационих система бактерија”

После прегледа достављене Дисертације и других пратећих материјала и разговора са Кандидаткињом, Комисија подноси Већу за студије при Универзитету у Београду следећи

РЕФЕРАТ

1. УВОД

1.1. Хронологија одобравања и израде дисертације

Кандидаткиња Анђела М. Родић је школске 2015./2016. године уписала програм мултидисциплинарних докторских академских студија Биофизика при Универзитету у Београду. Током студија је положила све испите предвиђене студијским програмом. Кандидаткиња је пријавила тему докторске дисертације „Биофизичко моделовање рестрикционо-модификационих система“, а Веће за студије при Универзитету је на седници одржаној дана 24.04.2017. године донело одлуку о именовању чланова Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације. Сенат Универзитета у Београду је на седници одржаној дана 21.06.2017. усвојио извештај Комисије за оцену научне заснованости предложене теме и донео одлуку о одобрењу теме докторске дисертације под насловом „Биофизичко моделовање рестрикционо-модификационих система бактерија“, а за менторе су именовани проф. др Марко Ђорђевић и др Магдалена Ђорђевић. Веће за студије при Универзитету је на седници одржаној дана 07.03.2022. године донело одлуку о именовању Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидаткиње Анђеле М. Родић под називом „Биофизичко моделовање рестрикционо-модификационих система бактерија“ у следећем саставу:

- проф. др Марко Ђорђевић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет
- др Магдалена Ђорђевић, научни саветник, Универзитет у Београду – Институт за физику
- проф. др Мирослав Живић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет
- др Ксенија Радотић Хаџи-Манић, научни саветник, Универзитет у Београду, Институт за мултидисциплинарна истраживања
- др Игор Салом, виши научни сарадник, Универзитет у Београду, Институт за физику

1.2. Научна област дисертације

Докторска дисертација Анђеле М. Родић припада научној области Биолошке науке, односно ужој научној области Биофизика. У оквиру Биофизике, као широке мултидисциплинарне области, специфична истраживачка област у коју се уклапа ова докторска дисертација је Моделовање биолошких система. Ментори докторске дисертације су аутори већег броја научних радова из моделовања биолошких система, при чему истраживачке области њихове стручности обухватају и Биоинформатику (проф. др Марко Ђорђевић), односно Теоријску физику високих енергија (др Магдалена Ђорђевић).

1.3. Биографски подаци о кандидату

Анђела М. Родић, рођена 19.9.1991. у Београду, је завршила основне академске студије Биологије (модул Молекуларна биологија и физиологија) и мастер академске студије Молекуларне биологије и физиологије (модул Биофизика) на Биолошком факултету Универзитета у Београду, да би 2015. године уписала мултидисциплинарне докторске академске студије Биофизике на Универзитету у Београду. Од 2015. је запослена на Биолошком факултету, при чему од 2017. ради у наставном звању асистента на групи предмета из биофизике.

До сада се примарно бавила научним истраживањем из области молекуларне системске биологије, на 4 национална и једном међународном пројекту. Објекат овог истраживања су били молекуларни системи који бране бактерије од унете ДНК чије је регулаторне механизме и принципе дизајна проучавала путем конструисања и анализирања математичких модела. Добијени резултати су објављени у оквиру 5 оригиналних научних радова средњег IF 6.3 (енг. *Impact Factor*) и једног поглавља у књизи издавача *Springer Nature*. У додатних 5 радова средњег IF 4.2 су објављени резултати њеног новијег истраживања у коме је путем математичког моделовања и статистичких метода испитана зависност развоја епидемије COVID-19 од фактора средине и популације. Њени радови су цитирани 115 пута према *Google Scholar* (h-index 6), односно 57 пута према *Web of Science* (h-index 5).

Током основних студија, Анђела је примљена на студентске праксе на Институту за нуклеарне науке „Винча“ и Универзитету у Лођу, Пољска. Фондација „Горан Љубијанкић“ јој је доделила годишњу награду за најбољи мастер рад из области Молекуларне биологије. Анђела је одржала презентације на више међународних и домаћих научних скупова, међу којима и два предавања по позиву. Добитник је стипендија за учешће у неколико међународних школа биофизике (у Аустрији, Хрватској и Бразилу), а на једној је освојила и награду за најбољу презентацију (у Русији).

Библиографија Кандидаткиње обухвата следеће публикације:

Поглавље у истакнутој монографији међународног значаја (M13)

1. Rodic A, Blagojevic B, Djordjevic M. (2018) Systems Biology of Bacterial Immune Systems: Regulation of Restriction-Modification and CRISPR-Cas Systems. In: Rajewsky N, Jurga S, Barciszewski J. (eds) *Systems Biology* (pp.37-58), Springer Nature, Cham.

Радови у међународним часописима изузетних вредности (M21a)

1. Markovic S, Rodic A, Salom I, Milicevic O, Djordjevic M, Djordjevic M. (2021) COVID-19 severity determinants inferred through ecological and epidemiological modeling. *One Health*, **13**:100355. [Public, Environmental & Occupational Health, 22/285, i.f.= 4.694]
2. Milicevic O, Salom I, Tumbas M, Rodic A, Markovic S, Zigic D, Djordjevic M. (2021) PM2.5 as a major predictor of COVID-19 basic reproduction number in the USA. *Environmental Research*, **201**:111526. [Public, Environmental & Occupational Health, 18/296, i.f.=6.498]
3. Klimuk E, Bogdanova E, Nagornykh M, Rodic A, Djordjevic M, Medvedeva S, Pavlova O, Severinov K. (2018) Controller protein of restriction-modification system Kpn2I affects transcription of its gene by acting as a transcription elongation roadblock. *Nucleic Acids Research*, **46**(20):10810-10826. [Biochemistry & Molecular Biology, 10/293, i.f.=11.561]
4. Morozova N, Sabantsev A, Bogdanova E, Fedorova Y, Maikova A, Vedyaykin A, Rodic A, Djordjevic M, Khodorkovskii M, Severinov K. (2016) Temporal dynamics of methyltransferase and restriction endonuclease accumulation in individual cells after introducing a restriction-modification system. *Nucleic Acids Research*, **44**(2):790-800. [Biochemistry & Molecular Biology, 14/290, i.f.=10.162]

Радови у врхунским међународним часописима (M21)

1. Djordjevic M, Salom I, Markovic S, Rodic A, Milicevic O, Djordjevic M. (2021) Inferring the main drivers of SARS-CoV-2 transmissibility. *GeoHealth*, **5**(9):e2021GH000432. [Public, Environmental & Occupational Health, 46/296, i.f.=4.529]
2. Rodic A, Blagojevic B, Djordjevic M, Severinov K, Djordjevic M. (2017) Features of CRISPR-Cas regulation key to highly efficient and temporally-specific crRNA production. *Frontiers in Microbiology*, **8**:2139. [Microbiology, 23/123, i.f.=4.165]
3. Rodic A, Blagojevic B, Zdobnov E, Djordjevic M, Djordjevic M. (2017) Understanding key features of bacterial restriction-modification systems through quantitative modeling. *BMC Systems Biology*, **11**(1):377-391. [Mathematical & Computational Biology, 11/57, i.f.=2.303]

Радови у истакнутим међународним часописима (M22)

1. Djordjevic M, Rodic A, Salom I, Zigic D, Milicevic O, Ilic B, Djordjevic M. (2021) A systems biology approach to COVID-19 progression in population. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, **127**:291-314. [Biochemistry & Molecular Biology, 157/297, i.f.=3.014]
2. Salom I, Rodic A, Milicevic O, Zigic D, Djordjevic M, Djordjevic M. (2021) Effects of Demographic and Weather Parameters on COVID-19 Basic Reproduction Number. *Frontiers in Ecology and Evolution*, **8**:617841. [Ecology, 70/169, i.f.=2.416]
3. Djordjevic M, Rodic A, Graovac S. (2019) From biophysics to omics and systems biology. *European Biophysics Journal*, **48**:413-424. [Biophysics, 37/73, i.f.=2.527]
4. Graovac S, Rodic A, Djordjevic M, Severinov K, Djordjevic M. (2019) Effects of population dynamics on establishment of a restriction-modification system in a bacterial host. *Molecules*, **24**(1):198. [Biochemistry & Molecular Biology, 141/297, i.f.=3.267]

Предавање по позиву са међународног скупа штампано у изводу (M32)

1. Salom I, Rodic A, Milicevic O, Zigic D, Ilic B, Djordjevic M, Djordjevic M. (2021) Biophysical and bioinformatics approach to study sociodemographic and weather impacts on the SARS-

CoV-2 virus transmissibility. Belgrade Bioinformatics Conference - BELBI 2021, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts (p.27), Biologia Serbica, Vol.43 - No.1 (Special Edition), Published by: Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad.

2. Rodic A, Blagojevic B, Djordjevic M, Djordjevic M. (2019) Possible code in dynamical properties of diverse bacterial immune systems. 6th International Conference in Code Biology 2019, Friedrichsdorf, Germany, Book of Abstracts (p.5), Published by: The International Society of Code Biology (ISCB).

Саопштења са међународних скупова штампана у целини (M33)

1. Rodić A, Blagojević B, Đorđević M, Severinov K, Đorđević M. (2018) Assessing CRISPR-Cas design principles by biophysical modeling. 14th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry - Physical Chemistry 2018, Belgrade, Serbia, Proceedings - Vol.1 (pp.455-458), Published by: Society of Physical Chemists of Serbia.
2. Graovac S, Rodić A, Đorđević M. (2018) Including population dynamics effects in modeling regulation of bacterial restriction modification systems. 14th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry - Physical Chemistry 2018, Belgrade, Serbia, Proceedings - Vol.1 (pp.459-462), Published by: Society of Physical Chemists of Serbia.

Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M34)

1. Markovic S, Milicevic O, Rodic A, Zigic D, Tumbas M, Salom I, Djordjevic M, Djordjevic M. (2021) A bioinformatics approach to inferring environmental drivers of SARS-CoV-2 transmissibility. Belgrade Bioinformatics Conference - BELBI 2021, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts (p.83), Biologia Serbica, Vol.43 - No.1 (Special Edition), Published by: Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad.
2. Rodic A, Blagojevic B, Djordjevic M, Severinov K, Djordjevic M. (2019) The logic of regulation design in bacterial restriction-modification systems. 8th International Conference on Computational Bioengineering - ICCB 2019, Belgrade, Serbia, Proceedings (p.50), Published by: Bioengineering Research and Development Centre BiolRC, University of Kragujevac.
3. Graovac S, Rodic A, Djordjevic M, Djordjevic M. (2019) Effects of bacterial cell growth rate on dynamics of a natural gene circuit. 8th International Conference on Computational Bioengineering - ICCB 2019, Belgrade, Serbia, Proceedings (p.50), Published by: Bioengineering Research and Development Centre BiolRC, University of Kragujevac.
4. Graovac S, Rodic A, Djordjevic M. (2018) Interplay of intracellular regulation and population dynamics in bacterial restriction-modification systems. 14th Greta Pifat Mrzljak School of Biophysics 2018, Split, Croatia, Book of Abstracts (p.81), Published by: Ruđer Bošković Institute & Croatia Biophysical Society.
5. Rodic A, Blagojevic B, Djordjevic M, Severinov K, Djordjevic M. (2018) Biophysical modeling of CRISPR-Cas regulation. 14th Greta Pifat Mrzljak School of Biophysics 2018, Split, Croatia, Book of Abstracts (p.107), Published by: Ruđer Bošković Institute & Croatia Biophysical Society.
6. Rodic A, Blagojevic B, Djordjevic M, Severinov K, Djordjevic M. (2018) Investigating the role of key features in CRISPR-Cas system regulation. Belgrade Bioinformatics Conference -

BELBI 2018, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts (p.92), *Biologia Serbica*, Vol.40 - No.1 (Special Edition), Published by: Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad.

7. Graovac S, Rodic A, Djordjevic M. (2018) Investigating interplay of intracellular regulation and population dynamics in a bacterial restriction-modification system. Belgrade Bioinformatics Conference - BELBI 2018, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts (p.73), *Biologia Serbica*, Vol.40 - No.1 (Special Edition), Published by: Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad.
8. Rodic A, Djordjevic M. (2017) Quantitative analysis of gene expression regulation of bacterial immune systems: CRISPR/Cas and restriction-modification systems. IMB Conference "Gene Regulation by the Numbers", Mainz, Germany, Book of abstracts (p.74), Published by: Institute of Molecular Biology gGmbH Mainz.
9. Rodic A, Djordjevic M. (2016) Modeling restriction-modification systems: expressing toxic molecules within a cell. 10th International Multiconference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology - BGRS/SB 2016, Novosibirsk, Russia, Book of abstracts (p.255), Published by: Federal Res. Center - Inst. of Cytology and Genetics SB RAS.
10. Rodic A, Djordjevic M. (2016) Modeling restriction-modification systems: expressing toxic molecules within a cell. 8th International Young Scientists School of Systems Biology and Bioinformatics - SBB 2016, Novosibirsk, Russia, Book of abstracts (p.63), Published by: Federal Res. Center - Inst. of Cytology and Genetics SB RAS.
11. Rodic A, Djordjevic M. (2016) Examining regulation of restriction-modification systems by quantitative modeling. Belgrade Bioinformatics Conference - BELBI 2016, Belgrade, Serbia, Book of abstracts (p.94), Published by: Faculty of Mathematics, University of Belgrade.
12. Rodic A, Djordjevic M. (2016) Understanding regulation of restriction-modification systems: combining quantitative modeling with in vivo single cell experiments. Advanced Lecture Course on Systems Biology - SYSBIO 2016, Innsbruck, Austria, Book of abstracts (p.131), Published by: SystemsX.ch.
13. Rodic A, Djordjevic M. (2015) Modeling in-vivo expression dynamics of the restriction-modification system Esp1396I. 6th European Conference on Prokaryotic and Fungal Genomics - ProkaGENOMICS 2015, Gottingen, Germany, Book of abstracts (p.86), Published by: Conventus Congressmanagement & Marketing GmbH.

Предавање по позиву са скупа националног значаја штампано у целини (M61)

1. Guzina J, Rodic A, Blagojevic B, Djordjevic M. (2017) Modeling and bioinformatics of bacterial immune systems: understanding regulation of CRISPR/Cas and restriction-modification systems. *Biologia Serbica*, **39**(1):112-122.

Предавања по позиву са скупова националног значаја штампана у изводу (M62)

1. Đorđević M, Guzina J, Rodić A, Božić B, Graovac S, Blagojević B, Đorđević M. (2018) Biofizika i bioinformatika CRISPR-Cas i restrikciono modifikacionih sistema bakterija. Drugi kongres biologa Srbije, Kladovo, Srbija, Knjiga sažetaka (p.7), Štampalo: Srpsko biološko društvo.

2. Guzina J, Rodić A, Blagojević B, Đorđević M. (2017) Modeling and bioinformatics of bacterial immune systems: understanding regulation of CRISPR-Cas and restriction-modification systems. 1st Congress of Molecular Biologists of Serbia - CoMBoS 2017, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts (p.192), Published by: Faculty of Biology, University of Belgrade.

Саопштења са скупова националног значаја штампана у изводу (M64)

1. Đorđević Graovac S, Rodić A, Đorđević M. (2018) Ispitivanje značaja dinamike populacije kod regulacije ekspresije bakterijskih restrikciono-modifikacionih sistema. Drugi kongres biologa Srbije, Kladovo, Srbija, Knjiga sažetaka (p.28), Štampalo: Srpsko biološko društvo.
2. Rodić A, Blagojević B, Đorđević M, Severinov K, Đorđević M. (2018) Analiza mehanizma aktivacije CRISPR-Cas sistema u *Escherichia coli*. Drugi kongres biologa Srbije, Kladovo, Srbija, Knjiga sažetaka (p.21), Štampalo: Srpsko biološko društvo.
3. Rodić A, Đorđević M. (2017) Quantitative modeling of gene expression regulation in bacterial restriction-modification systems. 1st Congress of Molecular Biologists of Serbia - CoMBoS 2017, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts (p.195), Published by: Faculty of Biology, University of Belgrade.

2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ

2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација под насловом “Биофизичко моделовање рестрикционо-модификационих система бактерија” је написана на српском језику ћириличним писмом на 89 страна рачунајући текст дисертације који је организован у оквиру следећих поглавља:

1. Увод
2. Хипотезе и циљеви истраживања
3. Методе
4. Резултати
5. Дискусија
6. Закључак
7. Литература

Садржи 30 слика, 4 табеле и 165 референци наведених абecedним редом. Докторска дисертација има укупно 101 страну са њеним осталим елементима међу којима су: насловна страница на српском језику; насловна страница на енглеском језику; страница са информацијама о менторима, члановима комисије за одбрану докторске дисертације и о датуму одбране; изјаве захвалности; страница са подацима о докторској дисертацији на српском језику; страница са подацима о докторској дисертацији на енглеском језику; садржај; биографија аутора; потписана изјава о ауторству; потписана изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада; потписана изјава о коришћењу.

2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

У Уводном поглављу су представљени бактеријски имунски системи, који су објекат истраживања, као и основни принципи коришћених метода моделовања. Прво су покривени класификација, структура, функције, екологија и значај рестрикционо-модификационих система. Указано је на разноврсност архитектура и регулаторних својстава различитих рестрикционо-модификационих система Типа II, као и на главна експериментална и теоријска запажања, претпоставке и тврдње из литературе о кључним квалитативним особинама динамике њихове експресије у новој ћелији-домаћину. Детаљније су описани познати механизми регулације гена 4 одабрана рестрикционо-модификациона система Типа II - AhdI, Esp1396I, EcoRV и Kpn2I. Затим су описани класификација, структура, екологија, значај и основни механизам деловања напредних имунских система прокариота, CRISPR-Cas, при чему је детаљније описана регулација гена у систему CRISPR-Cas типа I-E у *Escherichia coli*. У погледу метода коришћених у моделовању, објашњени су основни принципи термодинамичког моделовања регулације транскрипције, при чему је дато поступно извођење статистичких тежина конфигурација ДНК-везивног места за протеин (1) полазећи од равнотежних биохемијских реакција система, као и (2) према теорији статистичке термодинамике. Објашњени су и принципи динамичког моделовања експресије транскрипта и протеина система у ћелији. На крају је направљен осврт на тему експерименталног мерења динамике експресије протеина рестрикционо-модификационог система у појединачној ћелији и истакнути су изазови и потешкоће у испуњавању овог задатка.

У другом поглављу („Хипотезе и циљеви истраживања“) су дате хипотезе и специфични циљеви у оквиру главног циља који представља проучавање динамике експресије гена бактеријских имунских система од тренутка њихове активације у ћелији, и то из угла захтева које намећу основне функције ових система. Постављена је хипотеза да рестрикционо-модификациони системи треба да се одликују: (1) кашњењем експресије рестрикционе ендонуклеазе за експресијом метилтрансферазе, које даје времена метилтрансферази да модификује циљне секвенце у геному бактерије-домаћина и тиме их заштити од сечења; (2) брзим преласком експресије рестрикционе ендонуклеазе из искљученог у укључено стање, како би ћелија била што пре заштићена од вирусне и других врста стране ДНК; (3) ниским флукуацијама концентрација ензима у стационарном стању, због важности сталног одржавања њиховог балансираног односа за безбедност ћелије и њену ефикасну одбрану од стране ДНК. Постављено је за циљ да се пертурбишу кључне карактеристике регулације система AhdI и EcoRV и да се испита да ли се притом ремете ове пожељне динамичке особине. Експериментима сарадника је испитана регулација система Kpn2I, при чему је показано да С протеин у њему има сложено улогу у регулацији коју делом обавља и на нивоу елонгације транскрипције сопственог гена. Такође, они су експериментално измерили динамику експресије протеина система Esp1396I флуоресцентном микроскопијом на нивоу појединачних ћелија. Доступношћу ових вредних експерименталних података, постављени су циљеви да се конструишу модели регулације оба рестрикционо-модификациона система и да се испита да ли се у динамици њихове експресије могу уочити неке од предложених жељених динамичких особина које намеће основна одбрамбена функција свих рестрикционо-модификационих система. Коначно, предложен је начин да се испитају главне квалитативне особине динамике експресије CRISPR-Cas система типа I-E који је природно утишан у *Escherichia coli* и није познат сигнал нити услови који су потребни за

његову активацију. Наиме, уочена је сличност у карактеристикама регулације транскрипције CRISPR-Cas и система AhdI. Конкретно, различити експериментални подаци указују на то да се регулација транскрипције у систему CRISPR-Cas, слично регулацији С протеином у систему AhdI, састоји из елемената снажне кооперативне репресије, активације транскрипције која подразумева уклањање репресора са ДНК, и присуства ауторегулације. Због тога је предложен дизајн синтетичког генског кола у коме су гени стављени под контролу С протеина. Увођењем ових гена у ћелију која садржи CRISPR низ, покреће се експресија гена и протеина система. Као циљ је постављено да се анализом овог и упрошћених верзија модела испита улога истакнутих регулаторних карактеристика система, међу којима су брза неспецифична деградација pre-crRNA и висока кооперативност у везивању протеина-репресора за ДНК, на квалитативне особине динамике његове експресије.

У трећем поглављу (“Методe”) је објашњен поступак конструисања биофизичких модела регулације рестрикционо-модификационих система AhdI, Esp1396I, EcoRV и Kpn2I и синтетичког генског кола базираног на систему CRISPR-Cas типа I-E, који подразумева термодинамичко моделовање регулације транскрипције гена, динамичко моделовање експресије транскрипта и протеина, као и рескалирање величина и одређивање вредности параметара модела. Поред тога, описано је на који начин су у системима AhdI и EcoRV квантификовани ефекти ремећења специфичних конструктивних карактеристика ових рестрикционо-модификационих система на својства динамике њихове експресије. Конкретно, дефинисане су квантитативне мере степена испољености жељених својстава динамике и праћене су њихове промене приликом пертурбисања параметара који контролишу истакнута регулаторна својства система. Такође, описан је концепт предложеног синтетичког генског кола за испитивање динамике експресије природно утишаног система CRISPR-Cas у *Escherichia coli*, који подразумева замену непознатог механизма регулације транскрипције CRISPR-Cas детаљно изученим, а сличним механизмом регулације транскрипције рестрикционо-модификационог система AhdI. Ради испитивања изолованих ефеката кључних регулаторних својстава система CRISPR-Cas, моделоване су и анализиране три верзије овог синтетичког генског кола, које су назване граничним, конститутивним и кооперативним моделом.

У четвртном поглављу („Резултати“) су описани ефекти ремећења специфичних конструктивних карактеристика рестрикционо-модификационих система AhdI и EcoRV – конкретно, афинитета С протеина за формирање хомодимера, ефикасности транслације транскрипта с гена, и афинитета за кооперативно везивање два димера С протеина – на својства динамике експресије система. Притом је по први пут предвиђена динамика експресије система EcoRV. Резултати анализе показују да се ремећење ових истакнутих регулаторних својстава система негативно одражава на барем једну од квантитативних мера испољености жељених динамичких својстава. На основу експерименталних података и сазнања о регулацији рестрикционо-модификационог система Kpn2I, које су обезбедили сарадници на раду, конструисан је модел и предвиђена динамика експресије овог система. Показано је да овај систем, у коме је по први пут описана регулација С протеином на нивоу елонгације транскрипције, може да произведе жељене динамичке особине експресије као што су кашњење експресије рестрикционе ендонуклеазе и њен брз пораст према стационарном стању. Притом, фино подешена ефикасност блокаде пута РНК полимеразама, коју формирају везани С протеини, је кључна за правилно успостављање система у ћелији. Затим, показано је да модел Esp1396I система, који

узима у обзир све познате детаље његове регулације, може да репродукује најзначајније особине експериментално измерене динамике протеина овог система, а то су почетни пик у експресији метилтрансферазе и кашњење експресије рестрикционе ендонуклеазе. Одступање предвиђања модела од измерене динамике у каснијем интервалу експеримента је вероватно последица ефеката динамике раста популације, који нису узети у обзир у моделу, а могу имати значајан утицај и на крајњу динамику експресије протеина у ћелији. На крају, анализа динамике експресије синтетичког генског кола базираног на систему CRISPR-Cas је указала на то да се динамика изворног система вероватно одликује одређеним особинама које се срећу и у динамици рестрикционо-модификационих система – конкретно, понашањем типа прекидача, које обезбеђује да се производња crRNK активира при празној концентрацији Cas протеина, као и кашњењем почетка експресије crRNK за тренутком добијања сигнала за активацију система. Ово кашњење до сада није било предвиђено за системе CRISPR-Cas, а могло би да укаже на то да га неке функције система захтевају.

У петом поглављу („Дискусија“) је детаљно образложено запажање да заједничка функција структурно различитих рестрикционо-модификационих, као и CRISPR-Cas система намеће и одређене заједничке особине динамике експресије њихових гена и протеина. Дискутовано је и о различитим аспектима повезаности структуре и функције код рестрикционо-модификационих система, односно о комбинацијама регулаторних компоненти и својстава којима се у овим системима обезбеђују неопходне динамичке особине њихове експресије. Будући да је показано да се регулаторна својства у рестрикционо-модификационим системима не комбинују насумично, предложено је да се те динамичке особине могу назвати принципима дизајна њихове регулације. Истакнут је и значај ефеката динамике популације који заједно са механизмом регулације учествују у формирању коначне динамике експресије протеина у ћелији. Значај ефеката динамике популације – конкретно, брзине деобе ћелија и плаزمида – за репродуковање измерене динамике протеина Esp1396I у целом временском опсегу изведеног експеримента је накнадно потврђен.

У „Закључку“ су описани значај и примењивост резултата – како у разумевању понашања бактеријских имунских система, који имају еколошки и биотехнолошки значај, тако и у усмеравању дизајна синтетичких генетичких система. Описана су нека ограничења представљеног истраживања, као и могућности које оно отвара за будућа истраживања.

У „Литератури“ су систематично наведене референце које су коришћене и цитиране у тексту дисертације.

3. ОЦЕНА ДИСЕРТАЦИЈЕ

3.1. Савременост и оригиналност

Научне дисциплине Системска и Рачунарска биологија, којима припада тема истраживања представљеног у овој докторској дисертацији, су данас међу најмодернијим правцима развоја биологије као науке. Интензиван развој технологије, нарочито у молекуларној биологији и биохемији, је омогућио генерисање огромних количина експерименталних података, па је логичан развој ових научних дисциплина који је уследио због потребе да се биологија учини у већој мери квантитативном науком. Наиме,

јавила се потреба да се сви релевантни подаци за одређени биолошки процес прикупе и адекватно објасне у заједничком, системском контексту. Изведено истраживање се води овим принципима у проучавању структуре и функције молекуларних имунских система прокариота. Притом се посебна оригиналност истраживања огледа у тежњи да се идентификују општи принципи који се могу назвати принципима еволуционог дизајна несродних бактеријских система који деле сличну функцију. Разумевање ових принципа даје чврсту полазну основу за проучавање било ког појединачног бактеријског имунског система, а сазнања о повезаности регулације и динамике експресије гена добијена истраживањем у овај дисертацији се могу генерализовати и применити у проучавању много ширег спектра других молекуларно-биолошких система. У прилог савремености и оригиналности резултата истраживања говори и то да су они објављени у међународним научним часописима највиших категорија, M21 и M21a.

3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

Референтна литература на коју се директно ослања и надовезује приказано истраживање обухвата радове у међународним часописима од највишег значаја. Раније објављене студије у којима се проучавају регулација и експресија рестрикционо-модификационих система, а нарочито биотехнолошки изузетно значајних CRISPR-Cas система, сведоче о великом значају ових тема и развијености релевантног научног истраживања у свету. Написана докторска дисертација садржи темељну обраду релевантне литературе.

3.3. Опис и адекватност примењених научних метода

У дисертацији су детаљно описане методолошке процедуре којима су произведени резултати, а будући да је у питању теоријска рачунска анализа, то њене резултате чини у потпуности репродуцибилним. У истраживању су поштовани принципи научне етике и логичког закључивања. Сопствене идеје и резултати су јасно одвојени од туђих. Хипотезе су јасно образложене и засноване на експерименталним подацима и логичким претпоставкама и очекивањима. Дискусија и Закључак дају богату основу за критичко сагледавање истраживане теме и могућности за даља истраживања усмерена приказаним резултатима.

3.4. Примењивост остварених резултата

У овој дисертацији су анализирана правила комбиновања регулаторних својстава рестрикционо-модификационих система према принципима дизајна регулације који су идентификовани у конкретним динамичким својствима експресије гена, наметнутим основном функцијом система. Док би експериментално испитивање улоге појединих регулаторних својстава система у обликовању динамике експресије гена било веома захтевно, оно је у овој дисертацији изведено *in silico*. Овако добијени резултати могу усмерити дизајн експеримената за циљано истраживање ових система. Такође, будући да су ова правила установљена на овим природним генетичким мрежама, она могу бити врло корисна у конструисању синтетичких генских кола за контролисано обављање одређених функција у живом систему. Овим истраживањем је описан већи број регулаторних компоненти и архитектура које се могу употребити у синтетичкој биологији, а могу се применити и сами принципи њиховог еволуционог дизајна. Будући да се

предлаже и предвиђа употреба рестрикционо-модификационих система у борби против мултирезистентних бактеријских сојева, сазнања о њиховој регулацији се могу применити у постизању њиховог корисног и контролисаног дејства на ове сојеве. Синтетичко генско коло на бази система CRISPR-Cas се може директно конструисати и употребити за покретање активности CRISPR-Cas система у *Escherichia coli* уз постизање динамике експресије која је вероватно веома слична непознатој динамици оригиналног система. Тим путем се могу проучити бројне функције CRISPR-Cas система, међу којима је и имунска. Предвиђено кашњење почетка експресије crRNA за тренутком покретања активности система за сада нема јасно образложење у контексту функционисања CRISPR-Cas система. Предложено је да ово кашњење може бити значајно за олакшано стварање дугорочног имунитета на мутиране сојеве вируса, али могуће је да њега захтевају и неке друге функције CRISPR-Cas система које до сада нису биле разматране из тог угла.

3.5. Оцена достигнутих способности кандидата за самостални научни рад

На основу њеног истраживачког рада који је довео до научних радова са објављеним резултатима из ове докторске дисертације, као и личног познавања Кандидаткиње и упућености и у њен истраживачки рад на другим темама, сматрамо да је Анђела Родић способна: да самостално изводи рачунарске анализе из системске биологије, критички и систематично обрађује научну литературу, пише јасне, а информативне научне радове, као и да предлаже контекст за интерпретацију добијених резултата, и учествује у формулисању одговора на питања рецензента. Њена самосталност у осмишљавању и писању научног текста се огледа у њеном доминантном доприносу у изради поглавља за књигу *Systems biology* коју је издао *Springer Nature*. Анђела Родић је учествовала на већем броју конференција, при чему је одржала и 2 предавања по позиву, а добитник је и награде за најбољу усмену презентацију на школи за младе научнике одржаној у Новосибирску, што сведочи о њеној способности за самостално планирање и држање предавања на научним скуповима.

4. ОСТВАРЕНИ НАУЧНИ ДОПРИНОС

4.1. Приказ остварених научних доприноса

Главне резултате ове докторске дисертације представљају: (1) конструисани модели регулације 4 одабрана рестрикционо-модификациона система и предвиђања динамике њихове експресије приликом успостављања система у новој ћелији-домаћину; (2) идентификовани динамички принципи дизајна регулације рестрикционо-модификационих система, као и улога појединих регулаторних својстава у њиховом постизању; и (3) предлог дизајна и модел синтетичког генског кола за активацију природно утишаног CRISPR-Cas система у *Escherichia coli*, као и предвиђање особина непознате динамике експресије овог изворног система. Ови резултати су објављени у оквиру два рада у међународним часописима изузетних вредности (M21a: *Nucleic acids research*), и у оквиру два рада у врхунским међународним часописима (M21: *BMC Systems biology*, *Frontiers in microbiology*). Анђела Родић је први аутор наведених радова из категорије M21, док је у наведеним радовима категорије M21a, који су настали у сарадњи са групом која је извела лабораторijske експерименте, била одговорна за извођење комплетног теоријског

моделовања. Такође, Анђела Родић је први аутор поглавља књиге *Systems biology* издавача *Springer Nature*, у коме је дат преглед резултата њене докторске дисертације.

4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Резултати докторске дисертације Анђеле Родић су проистекли из квалитетно осмишљеног и изведеног истраживања. Конструисани модели се у највећој мери заснивају на претходним експериментално добијеним информацијама и подацима, а неопходне допунске претпоставке су утемељене и добро образложене. Резултати представљају теоријска предвиђања која се могу експериментално проверити, а у случају рестрикционо-модификационог система Esp1396I је за то и искоришћена прилика добијена првим експерименталним мерењем динамике експресије рестрикционо-модификационог система на нивоу појединачних ћелија. Динамички принципи дизајна рестрикционо-модификационих система који су доследно потврђени анализама различитих система дају посебну тежину појединачним, као и укупним резултатима докторске дисертације.

4.3. Верификација научних доприноса

Научни доприноси докторске дисертације су верификовани у следећим оригиналним научним радовима:

Радови у међународним часописима изузетних вредности (M21a)

1. Klimuk E, Bogdanova E, Nagornykh M, Rodic A, Djordjevic M, Medvedeva S, Pavlova O, Severinov K. (2018) Controller protein of restriction-modification system Kpn2I affects transcription of its gene by acting as a transcription elongation roadblock. *Nucleic Acids Research*, **46**(20):10810-10826. [Biochemistry & Molecular Biology, 10/293, i.f.=11.561]
2. Morozova N, Sabantsev A, Bogdanova E, Fedorova Y, Maikova A, Vedyaykin A, Rodic A, Djordjevic M, Khodorkovskii M, Severinov K. (2016) Temporal dynamics of methyltransferase and restriction endonuclease accumulation in individual cells after introducing a restriction-modification system. *Nucleic Acids Research*, **44**(2):790-800. [Biochemistry & Molecular Biology, 14/290, i.f.=10.162]

Радови у врхунским међународним часописима (M21)

1. Rodic A, Blagojevic B, Djordjevic M, Severinov K, Djordjevic M. (2017) Features of CRISPR-Cas regulation key to highly efficient and temporally-specific crRNA production. *Frontiers in Microbiology*, **8**:2139. [Microbiology, 23/123, i.f.=4.165]
2. Rodic A, Blagojevic B, Zdobnov E, Djordjevic M, Djordjevic M. (2017) Understanding key features of bacterial restriction-modification systems through quantitative modeling. *BMC Systems Biology*, **11**(1):377-391. [Mathematical & Computational Biology, 11/57, i.f.=2.303]

а представљени су и у следећим публикацијама:

Поглавље у истакнутој монографији међународног значаја (M13)

1. Rodic A, Blagojevic B, Djordjevic M. (2018) Systems Biology of Bacterial Immune Systems: Regulation of Restriction-Modification and CRISPR-Cas Systems. In: Rajewsky N, Jurga S, Barciszewski J. (eds) *Systems Biology* (pp.37-58), Springer Nature, Cham.

Саопштења са међународних скупова штампана у целини (М33)

1. Rodić A, Blagojević B, Đorđević M, Severinov K, Đorđević M. (2018) Assessing CRISPR-Cas design principles by biophysical modeling. 14th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry - Physical Chemistry 2018, Belgrade, Serbia, Proceedings - Vol.1 (pp.455-458), Published by: Society of Physical Chemists of Serbia.

Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (М34)

1. Rodic A, Blagojevic B, Djordjevic M, Severinov K, Djordjevic M. (2018) Investigating the role of key features in CRISPR-Cas system regulation. Belgrade Bioinformatics Conference - BELBI 2018, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts (p.92), Biologia Serbica, Vol.40 - No.1 (Special Edition), Published by: Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad.
2. Rodic A, Djordjevic M. (2017) Quantitative analysis of gene expression regulation of bacterial immune systems: CRISPR/Cas and restriction-modification systems. IMB Conference "Gene Regulation by the Numbers", Mainz, Germany, Book of abstracts (p.74), Published by: Institute of Molecular Biology gGmbH Mainz.
3. Rodic A, Djordjevic M. (2016) Modeling restriction-modification systems: expressing toxic molecules within a cell. 10th International Multiconference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology - BGRS/SB 2016, Novosibirsk, Russia, Book of abstracts (p.255), Published by: Federal Res. Center - Inst. of Cytology and Genetics SB RAS.
4. Rodic A, Djordjevic M. (2016) Modeling restriction-modification systems: expressing toxic molecules within a cell. 8th International Young Scientists School of Systems Biology and Bioinformatics - SBB 2016, Novosibirsk, Russia, Book of abstracts (p.63), Published by: Federal Res. Center - Inst. of Cytology and Genetics SB RAS.
5. Rodic A, Djordjevic M. (2016) Examining regulation of restriction-modification systems by quantitative modeling. Belgrade Bioinformatics Conference - BELBI 2016, Belgrade, Serbia, Book of abstracts (p.94), Published by: Faculty of Mathematics, University of Belgrade.
6. Rodic A, Djordjevic M. (2016) Understanding regulation of restriction-modification systems: combining quantitative modeling with in vivo single cell experiments. Advanced Lecture Course on Systems Biology - SYSBIO 2016, Innsbruck, Austria, Book of abstracts (p.131), Published by: SystemsX.ch.
7. Rodic A, Djordjevic M. (2015) Modeling in-vivo expression dynamics of the restriction-modification system Esp1396I. 6th European Conference on Prokaryotic and Fungal Genomics - ProkaGENOMICS 2015, Gottingen, Germany, Book of abstracts (p.86), Published by: Conventus Congressmanagement & Marketing GmbH.

5. ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је

извршена провера оригиналности докторске дисертације „Биофизичко моделовање рестрикционо-модификационих система бактерија“, аутора Анђеле Родић, констатујемо да утврђено подударане текста износи 3%. Овај степен подударности последица је личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника. На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујемо да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

6. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација коју смо прегледали сведочи о научној зрелости и достигнутом високом степену самосталности у научно-истраживачком раду Кандидаткиње Анђеле Родић. У спроведеном истраживању је коришћен савремен и мултидисциплинаран приступ, доследно су примењене научне методе, а произведени резултати имају висок научни значај и јасну примењивост. Резултати истраживања су успешно објављени у независно рецензираним врхунским међународним часописима. Софтверском провером оригиналности дисертације није установљен плагијаризам. Стога комисија сматра да је прегледана теза оригиналан научни допринос који заслужује да буде прихваћен као докторска дисертација. Овим је Кандидаткиња, будући да је претходно положила све студијским програмом предвиђене испите, задовољила све услове за заказивање одбране дисертације ради стицања доктората на Универзитету у Београду. На основу свега наведеног и директног вишегодишњег увида у рад Кандидаткиње, доле потписана Комисија са задовољством предлаже Већу Универзитета у Београду да се докторска дисертација под називом „Биофизичко моделовање рестрикционо-модификационих система бактерија“ Кандидаткиње Анђеле Родић прихвати, изложи на увид јавности и упути на коначно усвајање надлежним органима.

У Београду, 28.03.2022. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ




Проф. др Марко Ђорђевић, ванредни професор
Универзитет у Београду – Биолошки факултет



Др Магдалена Ђорђевић, научни саветник
Универзитет у Београду – Институт за физику



Проф. др Мирослав Живић, ванредни професор
Универзитет у Београду – Биолошки факултет



Др Ксенија Радотић Хаџи-Манић, научни саветник
Универзитет у Београду – Институт за мултидисциплинарна истраживања



Др Игор Салом, виши научни сарадник
Универзитет у Београду – Институт за физику