

VEĆE ZA STUDIJE PRI UNIVERZITETU U BEOGRADU

IZVEŠTAJ O OCENI NAUČNE ZASNOVANOSTI TEME DOKTORSKE DISERTACIJE I ISPUNJENOSTI USLOVA KANDIDATA

Tema disertacije:

BIOFIZIČKO MODELOVANJE RESTRIKCIONO-MODIFIKACIONIH SISTEMA

Kandidat: Anđela Rodić, master biolog

I Podaci o komisiji

Veće za studije pri Univerzitetu u Beogradu na sednici održanoj 24. aprila 2017. godine, donelo je odluku o obrazovanju Komisije za ocenu naučne zasnovanosti teme doktorske disertacije (u daljem tekstu: Komisija) „Biofizičko modelovanje restrikciono-modifikacionih sistema“ i ispunjenosti uslova kandidata Anđele Rodić, u sledećem sastavu:

1. dr Marko Đorđević, vanredni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, uža naučna oblast: teorijska biofizika, bioinformatika (mentor)
2. dr Magdalena Đorđević, naučni savetnik, Institut za fiziku, Univerzitet u Beogradu, uža naučna oblast: teorijska fizika kvark gluonske plazme, modelovanje bioloških sistema (mentor)
3. dr Biljana Božić Nedeljković, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, uža naučna oblast: imunobiologija
4. dr Miroslav Živić, vanredni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, uža naučna oblast: biofizika, sistemska biologija
5. dr Gordana Pavlović Lažetić, redovni profesor, Matematički fakultet, Univerzitet u Beogradu, uža naučna oblast: bioinformatika

Komisija u navedenom sastavu je u propisanom roku razmotrila prijavu i priloženu dokumentaciju kandidata i, u vezi sa tim, podnosi ovaj izveštaj.

II Podaci o kandidatu

Anđela Rodić je rođena 19. septembra 1991. godine u Beogradu. Na osnovne studije Biologije, modul Molekularna biologija i fiziologija, na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala se 2010. godine, a diplomirala je 2014. sa prosekom ocena 9,63. Tokom 2014/2015. školske godine, na istom fakultetu, završila je master studije Biofizike sa prosekom 10,00 odbranivši master rad pod nazivom Modelovanje in vivo dinamike ekspresije Esp1396I restrikciono-modifikacionog sistema, koji je nagrađen godišnjom nagradom za najbolji master rad iz oblasti molekularne biologije, koju dodeljuje Fondacija „Goran Ljubijankić“ Instituta za

molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (Beograd). Od 2015. godine Anđela Rodić je upisana na multidisciplinarnu doktorsku studiju Biofizike pri Univerzitetu u Beogradu i radi na Biološkom fakultetu kao istraživač pripravnik i saradnik u nastavi na predmetima Osnove sistemske biofizike i Osnove molekularne biofizike. Prvu godinu doktorskih studija završila je u roku sa prosekom ocena 10,00. Tokom studiranja Anđela Rodić je dodeljeno više republičkih i gradskih studentskih stipendija. 2016. god. dobila je stipendiju organizatora za učešće u *Advanced Lecture Course on Systems Biology* (SYSBIO 2016) u Inzbruku (Austrija), kao i nagradu za najbolju prezentaciju na *8th International Young Scientists School of Systems Biology and Bioinformatics* u Novosibirsku (Rusija). U poslednjih godinu dana Anđela je održala više prezentacija na naučnim konferencijama i seminarima (Seminar Bioinformatika 2015/16, Matematički fakultet Univerziteta u Beogradu; *Belgrade Bioinformatics Conference 2016*, Beograd; *8th International Young Scientists School of Systems Biology and Bioinformatics 2016*, Novosibirsk (Rusija); *10th International Multiconference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology 2016*, Novosibirsk).

SPISAK OBJAVLJENIH NAUČNIH RADOVA I SAOPŠTENJA

M21a (međunarodni časopis izuzetnih vrednosti):

- N. Morozova, A. Sabantsev, E. Bogdanova, Y. Fedorova, A. Maikova, A. Vedyaykin, A. Rodić, M. Djordjevic, M. Khodorkovskii, K. Severinov (2016) Temporal dynamics of methyltransferase and restriction endonuclease accumulation in individual cells after introducing a restriction-modification system. *Nucleic Acids Research* **44**:790-800. (IF 9.2)

M21 (rad u vrhunskom međunarodnom časopisu):

- A. Rodić, B. Blagojevic, E. Zdobnov, M. Djordjevic, M. Djordjevic (2017) Understanding key features of bacterial restriction-modification systems through quantitative modeling. *BMC Systems Biology* **11**:1-15. (IF 2.9)

M32 (plenarna predavanja na skupovima međunarodnog značaja štampana u izvodu):

1. *Understanding regulation of restriction-modification systems: combining quantitative modeling with in vivo single cell experiments*, SBB 2016 - 8th International Young Scientists School of Systems Biology and Bioinformatics, Novosibirsk, Rusija, avgust 2016, štampao Federal Research Center - Institute of Cytology and Genetics SB RAS.

M34 (saopštenje na skupu međunarodnog značaja štampano u izvodu):

1. *Modeling CRISPR/Cas system induction: the significance of cooperative transcription regulation* (usmena prezentacija), BGRS/SB 2016 - 10th International Multiconference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology, Novosibirsk, Rusija, avgust 2016, štampao Federal Research Center - Institute of Cytology and Genetics SB RAS.
2. *Understanding regulation of restriction-modification systems: combining quantitative modeling with in vivo single cell experiments* (poster), BGRS/SB 2016 - 10th International Multiconference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology,

Novosibirsk, Rusija, avgust 2016, štampao Federal Research Center - Institute of Cytology and Genetics SB RAS.

3. *Examining regulation of restriction-modification systems by quantitative modeling* (usmena prezentacija), BELBI 2016 - Belgrade Bioinformatics Conference, Beograd, Srbija, jun 2016, štampao Matematički fakultet Univerziteta u Beogradu.
4. *Understanding regulation of restriction-modification systems: combining quantitative modeling with in vivo single cell experiments* (poster), SYSBIO 2016 – Advanced Lecture Course on Systems Biology, Inzbruk, Austrija, februar 2016, štampao SystemsX.ch.
5. *Modeling in vivo expression dynamics of the restriction-modification system Esp1396I* (poster), ProkaGENOMICS - 6th European Conference on Prokaryotic and Fungal Genomics, Gotingen, Nemačka, septembar 2015, štampao Kern GmbH DE.

III Predloženi mentori

PRVI MENTOR: dr Marko Đorđević, vanredni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Spisak odabranih radova koji kvalifikuju mentora za vođenje doktorske disertacije: 34 originalna naučna rada srednjeg IF 4.6, citirana skoro 1000 puta (po Google Scholar-u), odnosno preko 600 puta (po Web of Science).

1. Rodic A, Blagojevic B, Zdobnov E, Djordjevic M and Djordjevic M, *Understanding key features of bacterial restriction-modification systems through quantitative modeling*, BMC Systems Biology 11(S1):377 (2017).
2. Morozova N, Sabantsev A, Bogdanova E, Fedorova Y, Maikova A, Vedyaykin A, Rodic A, Djordjevic M, Khodorkovskii M, Severinov K, *Temporal dynamics of methyltransferase and restriction endonuclease accumulation in individual cells after introducing a restriction modification system*, Nucleic Acids Research 44:790 (2016).
3. Djordjevic M, *Efficient transcription initiation in bacteria: an interplay of protein-DNA interaction parameters*, Integrative Biology 5(5):796 (2013).
4. Djordjevic M, Djordjevic M, and Konstantin Severinov, *CRISPR transcript processing: a mechanism for generating a large number of small interfering RNAs*, Biol. Direct 7:24 (2012).
5. Djordjevic M and Bundschuh R, *Open complex formation by bacterial RNA polymerase – a quantitative model*, Biophysical Journal, 94(11): 4233 (2008).

DRUGI MENTOR: dr Magdalena Đorđević, naučni savetnik, Institut za fiziku, Univerzitet u Beogradu

Spisak odabranih radova koji kvalifikuju mentora za vođenje doktorske disertacije: 43 originalna naučna rada srednjeg IF 4.4, citirana skoro 2200 puta (po Google Scholar-u), odnosno skoro 1800 puta (po Web of Science).

1. Andjela Rodic, Bojana Blagojevic, Evgeny Zdobnov, Magdalena Djordjevic and Marko Djordjevic, *Understanding key features of bacterial restriction-modification systems through quantitative modeling*, BMC Systems Biology 11(S1):377 (2017).
2. Marko Djordjevic and Magdalena Djordjevic, *A simple biosynthetic pathway for large product generation from small substrate amounts*, Phys. Biol. 9:056004 (2012).
3. Marko Djordjevic, Magdalena Djordjevic and Konstantin Severinov, *CRISPR transcript processing: a mechanism for generating a large number of small interfering RNAs*, Biol. Direct 7:24 (2012).

4. Magdalena Djordjevic, *Complex suppression patterns distinguish between major energy loss effects in Quark–Gluon Plasma*, Phys. Lett. B **763**:439 (2016).
5. Magdalena Djordjevic, *Heavy flavor puzzle at LHC: a serendipitous interplay of jet suppression and fragmentation*, Phys. Rev. Lett. **112**:042302 (2014).

IV Ocena naučne zasnovanosti teme:

Predložena tema „Biofizičko modelovanje restrikciono-modifikacionih sistema” odgovara predmetu i sadržaju predloženih istraživanja.

Predmet disertacije je utvrđivanje dinamičkih principa uspostavljanja restrikciono-modifikacionih sistema bakterija u naivnom domaćinu putem biofizičkog modelovanja regulacije njihove ekspresije.

Naučna oblast disertacije pripada široj oblasti *biofizika*, odnosno užoj oblasti *molekularna sistemska biologija*, pri čemu se multidisciplinarni karakter disertacije ogleda u tome što korišćeni podaci potiču iz biohemijskih, genetičkih i molekularno-bioloških eksperimenata, dok su metode zasnovane na matematici i fizici.

Cilj istraživanja je formiranje biofizičkih/matematičkih modela reprezentativnih restrikciono-modifikacionih sistema koji se odlikuju različitim tipovima arhitekture i regulatornim svojstvima, i ispitivanje da li dotične konstrukcije mogu da obezbede predložene osobine dinamičkog odgovora sistema: kašnjenje sinteze restrikcione endonukleaze u odnosu na sintezu metiltransferaze, brz prelazak sistema iz isključenog u uključeno stanje, stabilno stacionarno stanje sa malim fluktuacijama u količinama enzima. Dodatni ciljevi istraživanja podrazumevaju:

- Perturbisanje modela kojim će biti ispitana uloga pojedinih elemenata arhitekture, odnosno način na koji doprinose oblikovanju dinamike sistema, kao i efekat uvođenja u sistem regulatornih svojstava koja on prirodno ne poseduje.
- Proveru postojećih hipoteza o delovanju određenih mehanizama regulacije u posmatranim sistemima (pošto će modeli biti zasnovani na postojećim eksperimentalno utvrđenim činjenicama). U slučaju značajnijeg neslaganja predviđanja modela sa eksperimentalnim podacima, cilj će biti određivanje najverovatnijih razloga tog neslaganja i nedostajućih mehanizama/pretpostavki koje će doprineti boljem slaganju.
- Utvrđivanje da li CRISPR/Cas, kao još jedna vrsta bakterijskih imunskih sistema, ispoljava neke od predloženih osobina dinamičkog odgovora i omogućavanje boljeg razumevanja dinamike/mehanizma prirodnog pokretanja njegove aktivnosti u bakterijskoj ćeliji. Takođe, biće predložen način za njegovo eksperimentalno pokretanje.

Polazne hipoteze. Da bi bio koristan za svog domaćina, restrikciono-modifikacioni sistem treba da obezbedi odbranu ćelije od virusne DNK, a da istovremeno ne izazove autoimunski odgovor. Za uspešno vršenje ove funkcije sistema, potrebna je visokokontrolisana ekspresija metiltransferaze i restrikcione endonukleaze u ćeliji. Sposobnost restrikciono-modifikacionih sistema da se na plazmidima, horizontalnim genskim transferom, šire među različitim bakterijskim vrstama nameće još jedan uslov: regulacija ekspresije gena restrikciono-modifikacionih sistema bi trebalo da bude relativno

nezavisna od regulatornih faktora domaćina, koji se mogu razlikovati kod različitih bakterija. Budući da se restrikciono-modifikacioni sistemi u prirodi javljaju sa različitim kombinacijama raznovrsnih regulatornih svojstava, osnovna pretpostavka ovog istraživanja je da su različite arhitekture restrikciono-modifikacionih sistema optimizovane da proizvedu određene, univerzalne osobine dinamičkog odgovora sistema. Pritom je predloženo da u te osobine spadaju: 1) kašnjenje sinteze restrikcione endonukleaze u odnosu na sintezu metiltransferaze, dovoljno da do početka aktivnosti restrikcione endonukleaze genom domaćina bude zaštićen, 2) brz prelazak sistema iz isključenog stanja, u kome je nivo restrikcione endonukleaze veoma nizak, u uključeno stanje sa dovoljnom količinom ovog enzima da odbrani ćeliju, 3) stabilno stacionarno stanje sa malim fluktuacijama u količinama enzima, kako bi te količine u svakom trenutku bile međusobno u ravnoteži, odnosno da neuravnotežen porast u količini restrikcione endonukleaze ne bi rezultirao uništenjem genoma domaćina. Dodatna hipoteza je da i CRISPR/Cas, kao još jedna vrsta bakterijskih imunskih sistema, ispoljava neke od predloženih osobina dinamičkog odgovora. U proučavanju nepoznatog mehanizma prirodnog pokretanja aktivnosti CRISPR/Cas sistema u bakteriji domaćinu, istraživanje se oslanja na postojanje kvalitativne sličnosti u mehanizmima regulacije transkripcije kod CRISPR/Cas i restrikciono-modifikacionih sistema (veoma kooperativno vezivanje represora za DNK i otklanjanje represije pomoću aktivatora/same RNK polimeraze), kao i na pretpostavku da ovi sistemi dele slična dinamička ograničenja nametnuta odbrambenom funkcijom koju obavljaju. Hipoteza je da se smisao specifične arhitekture CRISPR/Cas sistema može ispitati *in silico* analizom veštačkog genskog kola u kome je CRISPR/Cas sistem stavljen pod transkripcionu kontrolu dobro proučenog restrikciono-modifikacionog sistema.

Plan istraživanja podrazumeva da će biti izvršeni sledeći zadaci:

- Modelovanje dinamike restrikciono-modifikacionog sistema Esp1396I, pri čemu će predviđanja ovog modela biti upoređena sa prvim merenjima dinamike proteina restrikciono-modifikacionog sistema na nivou pojedinačnih ćelija (eng. *single-cell*), izvedenih na Esp1396I sistemu (od strane eksperimentalnih saradnika).
- Perturbisanje ranije postavljenog i proverenog modela AhdI sistema, kako bi se utvrdila uloga njegovih elemenata arhitekture u formiranju dinamike sistema, kao i efekat ukidanja pojedinih regulatornih svojstava.
- Postavljanje prvog modela divergentnog restrikciono-modifikacionog sistema - sistema EcoRV, koji ne poseduje regulatorna svojstva prisutna u sistemu AhdI, ali ima preklapljene promotore koji ne karakterišu AhdI. Biće ispitana dinamika ovog sistema, kao i efekat uvođenja regulatornih svojstava sistema AhdI u njega.
- Utvrđivanje mehanizma regulacije sistema Cfr9I sa linearnom organizacijom gena u kome nisu nađena regulatorna svojstva prisutna kod drugih restrikciono-modifikacionih sistema. Eventualne *antisense* RNK kodirane sistemom će biti bioinformatički predviđene i biće ispitan odgovarajući mehanizam regulacije u kome bi one učestvovala.
- Modelovanje regulacije sistema Kpn2I i ispitivanje uloge pretpostavljenog *roadblock* efekta koji imaju vezani C proteini na transkripciju svog gena.
- Predlog teorijskog nacrtu sintetičkog genskog kola za pokretanje aktivnosti CRISPR/Cas sistema pomoću dobro proučenog restrikciono-modifikacionog sistema, pri čemu će biti

ispitan značaj kooperativnosti u vezivanju H-NS proteina za DNK, kao i brze nespecifične degradacije pre-crRNK.

Naučne metode istraživanja. Regulacija transkripcije će biti modelovana termodinamički uz korišćenje klasičnog *Shea-Ackers* pristupa, koji podrazumeva određivanje statističkih težina svih mogućih konfiguracija RNK polimeraze i transkripcionih faktora na promotoru, i koristi osnovnu, uprošćavajuću pretpostavku da je stopa inicijacije transkripcije proporcionalna ravnotežnoj verovatnoći vezivanja RNK polimeraze za promotor. Model regulacije transkripcije će dati ulazne podatke za dinamički model promene koncentracija transkripata i proteina sistema, koji će biti definisan korišćenjem odgovarajućih nelinearnih diferencijalnih jednačina. Kako se restrikciono-modifikacioni sistemi tipično odlikuju visokom ekspresijom (reda veličine hiljade molekula), biće modelovani deterministički. Parametri modela će biti procenjeni na osnovu postojećih eksperimentalnih podataka ili će im biti dodeljene standardne vrednosti. Perturbacije modela će uključivati variranje odgovarajućih parametara, kao i formiranje alternativnih modela. Radi ispitivanja efekta perturbacija na dinamički odgovor sistema, biće uvedene mere promene predloženih željenih osobina tog odgovora. Predviđanja modela će, kada je moguće, biti upoređena sa rezultatima laboratorijskih eksperimenata koje će izvesti eksperimentalni saradnici u istraživanju. Simulacija modela, numerička analiza dobijenih rezultata i poređenje sa eksperimentalnim podacima biće izvedeni u MATLAB-u.

Odabrana polazna literatura ukazuje da kandidat dobro poznaje predloženu temu i metodologiju istraživanja pri čemu je naveden niz relevantnih izvora iz oblasti proučavanja regulacije restrikciono-modifikacionih i CRISPR/Cas sistema bakterija.

Očekivani naučni doprinosi. Po završetku predloženih istraživanja mogu se očekivati sledeći naučni doprinosi:

- Razvoj biofizičkih modela restrikciono-modifikacionih sistema sa različitim arhitekturama, odnosno osobinama regulacije.
- Utvrđeni univerzalni dinamički principi u osnovi različitih obrazaca regulacije restrikciono-modifikacionih sistema, odnosno smisao postojanja specifičnih kombinacija regulatornih svojstava kod ovih sistema.
- Okarakterisani elementi arhitekture restrikciono-modifikacionih sistema i objašnjen njihov efekat na ukupnu dinamiku sistema. Ovi podaci će biti od koristi u sintetičkoj biologiji, pri konstruisanju veštačkih genskih kola sa željenim osobinama dinamičkog odgovora.
- Proverene postojeće hipoteze o specifičnim mehanizmima regulacije određenih restrikciono-modifikacionih sistema, uz ukazivanje na eventualnu nepotpunost tih hipoteza, kao i na njihovo moguće poboljšanje.
- Analiza sintetičkog genskog kola sa kombinovanim elementima restrikciono-modifikacionog i CRISPR/Cas sistema će pružiti smernice za eksperimentalno konstruisanje takvog kola, koje se može upotrebiti za proučavanje nepoznatog mehanizma pokretanja aktivnosti CRISPR/Cas sistema u ćeliji.

Ukupno gledano, rezultati ovog istraživanja će doprineti boljem razumevanju restrikciono-modifikacionih i CRIPR/Cas sistema koji, osim odbrane ćelije od virusa, imaju i brojne druge uloge, kao što je modulacija sticanja genetičkog materijala horizontalnim genskim transferom kojim se, između ostalog, širi bakterijska rezistencija na antibiotike.

Ocena Komisije. Na osnovu podnete prijave i obrazloženja predložene teme, kao i spiska polaznih izvora i literature, članovi Komisije su zaključili da je tema doktorske disertacije originalna, naučno zasnovana, aktuelna i multidisciplinarnog karaktera. Predložena tema je značajna sa stanovišta utvrđivanja regulatornih mehanizama i dinamičkih principa delovanja restrikciono-modifikacionih sistema koji, osim odbrane bakterijske ćelije od invazivne DNK, imaju i druge značajne funkcije, kao što su: i) ograničavanje horizontalnog genskog transfera (što ima uticaj i na širenje bakterijske rezistencije na antibiotike) i razvoj heterogenosti bakterijske populacije, ii) regulacija ekspresije gena (metilacijom DNK) koja rezultira različitim fenotipovima, povećanom virulencijom i boljom adaptacijom bakterija na promenljive uslove sredine, kao i iii) oblikovanje genoma domaćina stabilizacijom susednih regiona DNK oko restrikciono-modifikacionog sistema, ali i izazivanjem rekombinacije i genomskog rearanžiranja uvođenjem dvolančanih prekida u DNK. Predložena tema ima i praktičan značaj budući da će biti okarakterisani mehanizmi i funkcije različitih regulatornih elemenata koji se mogu primeniti za konstruisanje veštačkih genskih kola u sintetičkoj biologiji, kao i da će biti dat konkretan nacrt za sintetičko gensko kolo koje omogućava eksperimentalno ispitivanje nepoznatog mehanizma pokretanja aktivnosti naprednog prokariotskog imunskog sistema, CRISPR/Cas.

U vezi sa nazivom predložene teme doktorske disertacije, komisija konstatuje da je nepotpun/nedorečen, odnosno predlaže da se prijavljeni naslov "Biofizičko modelovanje restrikciono-modifikacionih sistema" promeni u: "Biofizičko modelovanje restrikciono-modifikacionih sistema bakterija".

V Ocena ispunjenosti uslova kandidata

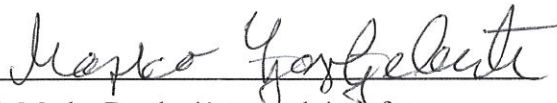
Na osnovu biografskih podataka i oblasti iz koje je urađen master rad kandidata, dosadašnjeg iskustva u istraživanjima iz oblasti modelovanja bioloških sistema, kao i objavljenih radova i obrazloženja predložene teme doktorske disertacije, Komisija ocenjuje da je Anđela Rodić, master biolog, pokazala izuzetnu sklonost i sposobnost za bavljenje naučno-istraživačkim radom i da ispunjava sve neophodne uslove za rad na predloženoj temi doktorske disertacije.

VI Zaključak

Na osnovu iznetih podataka Komisija smatra da je predložena tema doktorske disertacije Anđele Rodić, "Biofizičko modelovanje restrikciono-modifikacionih sistema bakterija", naučno zasnovana i predlaže Veću za studije pri Univerzitetu u Beogradu da je prihvati i odobri izradu ove disertacije.

U Beogradu, 09.05.2017. g.

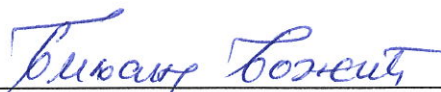
Članovi Komisije



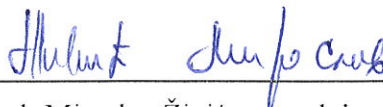
dr Marko Đorđević, vanredni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu



dr Magdalena Đorđević, naučni savetnik
Institut za fiziku, Univerzitet u Beogradu



dr Biljana Božić Nedeljković, redovni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu



dr Miroslav Živić, vanredni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu



dr Gordana Pavlović Lažetić, redovni profesor
Matematički fakultet, Univerzitet u Beogradu