

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На Х редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 07. септембра 2018. године, прихваћен је извештај ментора др Бранка Јовчића, ванредног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду о урађеној докторској дисертацији **Катарине Д. Нововић**, истраживача сарадника у Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Београд, под насловом **„Регулација генске експресије и диверзитет CarO и Omp33-36 порина рода *Acinetobacter spp.*“**, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу др Бранко Јовчић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, др Милан Којић, научни саветник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, и др Јелена Лозо, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Катарине Д. Нововић** под насловом **„Регулација генске експресије и диверзитет CarO и Omp33-36 порина рода *Acinetobacter spp.*“** написана је на 119 страна (проред 1,5), у оквиру којих се налази 16 табела и 21 слика. У докторској дисертацији је цитирано 190 извора литературе. Докторска дисертација садржи: Насловну страну на српском и енглеском језику, Податке о ментору и члановима комисије, Резиме на српском и енглеском језику са кључним речима, Садржај, Текст по поглављима, Литературу и Прилоге. Текст дисертације садржи следећа поглавља: **Увод** (стр. 1-24), **Циљ рада** (стр. 25-26), **Материјал и методе** (стр. 27-48), **Резултати** (стр. 49-80), **Дискусија** (стр. 81-91), **Закључци** (стр. 92-94), **Литература** (стр. 95-116) и **Прилози** (стр. 117-119). Поред наведеног у прилогу садржи: Биографију аутора, Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације, Изјаву о коришћењу, као и научне радове објављене у научним часописима са ISI листе који су директно проистекли из докторске дисертације.

Анализа докторске дисертације:

Поглавље **Увод** докторске дисертације садржи четири потпоглавља. У њему су сажето приказани литературни подаци који су непосредно повезани са темом докторске дисертације.

У потпоглављу „Род *Acinetobacter*“ су описане основне морфолошке, биохемијске, физиолошке и генетичке карактеристике овог рода. Поред тога, наведене су врсте рода *Acinetobacter* које су до сада идентификоване, као и најсавременије методе за њихову исправну идентификацију до нивоа врсте. Изузетан диверзитет станишта врста овог рода је такође истакнут у овом потпоглављу. У одељку „Врста *Acinetobacter baumannii*“ је описана врста *Acinetobacter baumannii* као узрочник болничких и ванболничких инфекција. Типови и учесталост инфекција, као и морталитет који узрокује ова врста, су наглашени у овом одељку. Фактори ризика за настанак инфекције изазване *A. baumannii* су такође истакнути. Овај одељак је посвећен и особинама *A. baumannii* које доприносе опстанку ове врсте у болничким и условима унутар домаћина. То су урођена отпорност на бројне стресоре и изузетна пластичност генома. На овај начин врста *A. baumannii* испољава бројне вирулентне карактеристике и вишеструку резистенцију на клинички значајне антибиотике, који су наведени у овом одељку. Будући да је проценат изолата ове врсте који показују вишеструку резистенцију на антибиотике све већи, приказана је њихова распрострањеност на глобалном нивоу. Истакнута је припадност *A. baumannii* ESKAPE групе патогена са најучесталијом резистенцијом на антибиотике, као и чињеница да је Светска здравствена организација позиционирала *A. baumannii* резистентне на карбапенеме на врх листе патогена за које је неопходан проналазак нових антимикуробних агенаса.

Потпоглавље „Резистенција на карбапенеме“ је подељено на одељке „Карбапенеме“, „Механизми резистенције на карбапенеме“ и „Механизми резистенције на карбапенеме код *A. baumannii*“. У одељку „Карбапенеме“ су, пре свега, описане основне карактеристике бета-лактамских антибиотика (структура, механизам деловања на бактерије и њихов вишедеценијски развој). Као најпотентнијој групи бета-лактамских антибиотика, карбапенемима је посвећен други део овог одељка, у ком су истакнуте предности и мане представника ове групе антибиотика са најширом клиничком применом. Одељак „Механизми резистенције на карбапенеме“ се бави значајем и механизмима резистенције на карбапенеме код Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија. Будући да се карбапенеме примењују у терапији инфекција изазваних вишеструко резистентним патогеним бактеријама, појава и глобално распрострањење изолата резистентних на ову групу антибиотика значајно ограничава избор ефикасних терапеутика. Механизми резистенције на карбапенеме су далеко разноврснији код Грам-негативних, него код Грам-позитивних бактерија. С обзиром да је хидролиза карбапенема, посредована ензимима карбапенемазама, најчешћи механизам резистенције на карбапенеме, у овом одељку су наведене основне карактеристике ове групе ензима (асоцираност са мобилним генетичким елементима, спектар деловања и осетљивост на инхибиторе), као и представници различитих класа карбапенемаза. У одељку „Механизми резистенције на карбапенеме код *A. baumannii*“ су описани различити механизми резистенције на карбапенеме код *A.*

baumannii (продукција карбапенемаза, промена експресије или структуре порина, прекомерна експресија ефлукс пумпи и промена експресије протеина који везују пеницилин).

Потпоглавље „Порини“ је посвећено структури и функцији протеина спољашње мембране Грам-негативних бактерија (порина). У овом потпоглављу је истакнут диверзитет порина, као и њихова улога у резистенцији на антибиотике и вируленцији патогених бактерија. У одељку „Порини одговорни за резистенцију на карбапенеме код *A. baumannii*“ су описани порини *A. baumannii*, чија је улога у резистенцији карбапенеме детаљно проучена (CarO и Omp33-36), као и порини за које не може са сигурношћу да се тврди, али постоје индиције да су укључени у овај феномен (OprD, порини од 22, 37, 44 и 47 kDa). У пододељку „CarO“ су описане структурне (мономерни протеин спољашње мембране који формира структуру бета-бурета) и функционалне карактеристике овог порина (канал који је специфичан за имипенем и базне аминокиселине). Различите варијанте порина CarO поседују различиту специфичност за супstrate. Поред тога, учешће овог порина у резистенцији на карбапенеме је у највећем броју случајева посредовано инсерционом инактивацијом гена који га кодира (*carO* ген), док је вирулентан карактер порина CarO предложен, али не и доказан. Пододељак „Omp33-36“ је посвећен порину, који поред улоге у резистенцији на карбапенеме, омогућава улазак молекула воде у бактеријску ћелију, али и представља значајан фактор вируленције *A. baumannii*. У одељку „Остали порини одговорни за резистенцију на карбапенеме код *A. baumannii*“ су наведени порини који остварују потенцијалну улогу у резистенцији на карбапенеме (OprD, порини од 22, 37, 44 и 47 kDa).

У потпоглављу „Неантибиотске терапије инфекција изазваних *A. baumannii*“ су истакнути различити видови терапија инфекција изазваних *A. baumannii* поред антибиотских (антимикробни пептиди, протеини који везују метале, бактериофаги, фотодинамичка терапија, терапија базирана на азот оксиду и модулација инфламаторног одговора домаћина). Као златном стандарду неантибиотске терапије, одељак „Вакцине“ је посвећен активној и пасивној имунизацији против *A. baumannii*. У овом одељку су наглашене предности и мане вишеккомпонентних, као и вакцина које садрже појединачне антигене. Такође, предложене су карактеристике које би требало да поседује вакцина ефикасна против ове групе патогена.

У поглављу **Циљеви рада** дефинисана су три главна научна циља ове докторске дисертације.

Први научни циљ рада се односи на молекуларну карактеризацију колекције изолата *A. baumannii* резистентних на карбапенеме пореклом из Србије. Са једне стране, овај циљ подразумева молекуларну идентификацију и одређивање припадности клоналним групама, док са друге подразумева одређивање осетљивости на различите групе бета-лактамских антибиотика и присуства молекуларних детерминанти резистенције на ову групу антибиотика код датих *A. baumannii* изолата.

Други део истраживања има за циљ испитивање утицаја различитих сигнала на транскрипцију *carO* и *omp33-36* гена (фазе раста, субинхибиторне концентрације карбапенема, хипоксије и контакта са еукариотским ћелијама) клиничких сојева *A. baumannii*, као и нивоа цитотоксичности који остварују дати сојеви на еукариотске ћелије.

Трећи научни циљ подразумева биоинформатичку анализу порина CarO и Omp33-36 рода *Acinetobacter*. Поред анализе *carO* и *omp33-36* gena izolata *A. baumannii* из Србије, овај циљ се односио и на класификацију порина CarO и Omp33-36 рода *Acinetobacter*, одређивање њихове трансмембранске топологије, полиморфности и варијабилности региона, утицаја варијабилности аминокиселина на биолошку улогу, као и на предикцију потенцијалних антигена у оквиру њихове аминокиселинске секвенце.

Поглавље **Материјал и методе** садржи петнаест потпоглавља у којима су описани бактеријски изолати, као и детаљни методолошки поступци коришћени у овој тези.

У потпоглављу „Бактеријски изолати“ су дати списак и подаци о изолатима који су изучавани у овој тези (здравствена установа, датум и место изолације). Идентификација izolata укључених у ову тезу помоћу VITEK 2 система, као и умножавањем и секвенцирањем gena за 16S рибозомалну РНК, је описана у потпоглављу „Идентификација бактеријских izolata“. Потпоглавље „Генотипизација izolata *A. baumannii* резистентних на карбапене“ обухвата опис две методе генотипизације izolata *A. baumannii*, идентификацију клоналних група *A. baumannii* и електрофорезу у пулсирајућем пољу („Pulsed-Field Gel Electrophoresis“, PFGE). У потпоглављу „Медијуми за раст бактерија“ су описани медијуми у којима су гајене бактерије (у присуству или одсуству одређених антибиотика), као и услови у којима су расле (температура и аерација). Методе за испитивање осетљивости коришћених *A. baumannii* izolata на бета-лактамске антибиотике су наведене у потпоглављу „Одређивање осетљивости на бета-лактамске антибиотике“ (VITEK 2 систем и микродилуциона метода). Поступци за изолацију укупне ДНК из бактеријских ћелија, као и умножавање циљних ДНК фрагмената методом ланчане реакције полимеразе („Polymerase Chain Reaction“, PCR) су описани у потпоглављима „Метода за изолацију тоталне ДНК“ и „Умножавање ДНК фрагмената PCR методом“, редом. Визуелизација тоталне бактеријске ДНК и ДНК фрагмената добијених PCR методом је вршена хоризонталном гел електрофорезом описаном у потпоглављу „Електрофореза ДНК“. У потпоглављу „Култивација *A. baumannii* у условима стреса“ је наведен начин култивације клиничких izolata *A. baumannii* у присуству субинхибиторне концентрације карбапенема кроз фазе раста и при сниженој концентрацији кисеоника. Потпоглавље „Инфекција еукариотских ћелија са *A. baumannii*“ је посвећено поступку инфекције кератиноцита човека и имунских ћелија пацова са *A. baumannii*. Одређивање нивоа цитотоксичности који остварују *A. baumannii* на еукариотске ћелије есејом LDH („Lactate dehydrogenase“) је описано у потпоглављу „Тест цитотоксичности *A. baumannii*“. Потпоглавље „Методе рада са РНК из бактеријских ћелија“ је подељено на три одељка у којима су описане метода за изолацију РНК, метода за пречишћавање РНК од ДНК молекула и метода реверзне транскрипције РНК у комплементарну ДНК. Ниво транскрипције циљних gena је одређен методом транскрипционе анализе RT-qPCR („Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction“), која је описана у истоименом потпоглављу. Потпоглавље „Биоинформатичка анализа CarO и Omp33-36 порина“ је посвећено „in silico“ изучавању порина CarO и Omp33-36. Ово потпоглавље је подељено на шест одељака у којима је описана анализа нуклеотидних секвенци *carO* и *omp33-36* gena izolata *A. baumannii* пореклом из Србије, претрага аминокиселинских секвенци порина CarO и Omp33-36 из базе података NCBI („National Center for Biotechnology Information“), конструкција филогенетских стабала, као и

предикција топологије ових порина. Поред тога, у овом потпоглављу је наведена анализа полиморфности и варијабилности региона порина *CarO* и *Omp33-36*, као и утицај варијабилности појединачних аминокиселина на биолошку улогу ова два порина. У последњем потпоглављу „Статистичка обрада резултата“ су истакнути програми и тестови коришћени за обраду резултата добијених у овој тези.

У поглављу **Резултати** су приказани резултати истраживања добијени у овој тези. Ово поглавље се може груписати у три дела: молекуларна карактеризација колекције изолата *A. baumannii* резистентних на карбапенеме пореклом из Србије, утицај различитих сигнала (фаза раста, субинхибиторне концентрације карбапенема, хипоксије и контакта са еукариотским ћелијама) на транскрипцију *carO* и *omp33-36* гена клиничких изолата *A. baumannii* и биоинформатичка анализа *CarO* и *Omp33-36* порина.

Изолати који су коришћени у овој студији (n=29) су идентификовани VITEK 2 системом као комплекс *A. baumannii*, а умножавањем и секвенцирањем гена за 16S рибозомалну РНК као врста *A. baumannii* („Идентификација бактеријских изолата“). У потпоглављу „Генотипизација изолата *A. baumannii* резистентних на карбапенеме“ анализирани изолати *A. baumannii* резистентни на карбапенеме (n=28) су груписани на нивоу клоналних група и методом PFGE. Најзаступљенија клонална група је била Група 1 (n=19), па Група 3 (n=7), док је Групи 2 припадао само један изолат. Од двадесет и осам анализираних изолата, један изолат није припадао ниједној испитиваној клоналној групи. На основу методе PFGE анализирани изолати су груписани у два кластера (25% различитости), од којих је први даље подељен у три пулсотипа (А: n=5, Б: n=9 и Ц: n=5). Кластер II је обухватао пулсотип Д (n=9). Представници исте клоналне групе су били распоређени у исте или различите пулсотипове. Резистенција на бета-лактамске антибиотике (ампицилин, пиперацилин, цефокситин, цефтазидим, цефотаксим, цефепим, азтреонам, имипенем и меропенем) и бета-лактамске антибиотике у комбинацији са инхибиторима бета-лактамаза (амоксицилин/клавуланска киселина и пиперацилин/тазобактам) је установљена VITEK 2 системом код 28 изолата анализираних у овој тези. Поред тога, осетљивост датих изолата је изражена и кроз IC50 вредности, које су одређене микродилуционом методом за пиперацилин, пиперацилин/тазобактам, цефтазидим, азтреонам и имипенем. На овај начин је потврђена резистенција испитиваних изолата *A. baumannii* на тестиране антибиотике са изузетком азтреонама, који се показао најефикаснијим у елиминацији ових изолата. Такође, микродилуционом методом су одређене тачне вредности МИК-а (Минимална Инхибиторна Концентрација) имипенема (и меропенема) једног осетљивог и два резистентна соја *A. baumannii* на карбапенеме („Осетљивост на бета-лактамске антибиотике“). Поред гена за урођене бета-лактамазе (*AmpC* цефалоспориназу и *OXA-51* оксацилиназу), код изолата *A. baumannii* резистентних на карбапенеме је са највећом учесталашћу био присутан ген за оксацилиназу *OXA-24* (82,14%), а затим *OXA-23* (57,14%) и *OXA-58* (39,29%). Инцерциона секвенца *ISAbal1* је била присутна узводно од *bla_{AmpC}*, *bla_{OXA-23}* и *bla_{OXA-51}* гена код 13, 10 и 1 изолата *A. baumannii*, редом. Оксацилиназе *OXA-143* и *OXA-235*, као ни карбапенемазе класе А (KPC) ни Б (IMP, VIM и NDM-1) нису детектоване код анализираних изолата („Молекуларне детерминанте резистенције на бета-лактамске антибиотике“).

Стресни сигнали, као што су повећање густине бактеријских ћелија и присуство субинхибиторне концентрације карбапенема, значајно утичу на транскрипцију *carO* и

omp33-36 гена код сојева *A. baumannii* осетљивих и резистентних на карбапенеме („Утицај стреса на транскрипцију *carO* и *omp33-36* гена“). Када је реч о различитим фазама раста, не може се донети генералан закључак о ефекту који остварују на транскрипцију *carO* и *omp33-36* гена, будући да се утицаји разликују међу сојевима. Третман субинхибиторном концентрацијом имипенема кроз различите фазе раста доводи до смањења експресије *carO* и *omp33-36* гена код свих сојева, са најизраженијим ефектом на сој који је осетљив на овај антибиотик. Поред тога, присуство субинхибиторне концентрације меропенема утиче на транскрипцију *omp33-36* гена на сличан начин као имипенем, док након пада у ранијим фазама раста, води повећању транскрипције *carO* гена код сојева са различитом осетљивошћу на меропенем („Утицај фазе раста и субинхибиторне концентрације карбапенема на транскрипцију *carO* и *omp33-36* гена“). Сnižена концентрација кисеоника (хипоксија) остварује супримирајући ефекат на транскрипцију *omp33-36* гена код соја осетљивог на карбапенеме, док утицај на транскрипцију *carO* гена изостаје („Утицај хипоксије на транскрипцију *carO* и *omp33-36* гена“). Контакт ћелија *A. baumannii* са кератиноцима човека стимулише експресију *carO* и *omp33-36* гена код сојева осетљивих и резистентних на карбапенеме, са најизраженијим утицајем на сој који је осетљив на ову групу антибиотика („Утицај контакта *A. baumannii* са НаСаТ кератиноцима човека на транскрипцију *carO* и *omp33-36* гена“). Такође, контакт са имунским ћелијама пацова доводи до повећања експресије гена за *CarO* и *Omp33-36* код соја осетљивог на карбапенеме („Утицај контакта *A. baumannii* са имунским ћелијама пацова на транскрипцију *carO* и *omp33-36* гена“), али у мањој мери у односу на контакт са кератиноцима. Анализирани сојеви остварују цитотоксичан ефекат на кератиноците човека у различитој мери, док не доводе до смрти имунских ћелија пацова („Цитотоксични ефекат *A. baumannii* на НаСаТ и имунске ћелије“).

Биоинформатичком анализом нуклеотидних секвенци *carO* гена изолата *A. baumannii* пореклом из Србије установљено је постојање пет различитих типова алела овог гена. Три од пет типова алела су подразумевала интактан ген, док су два поседовала уграђене инсерционе секвенце које су уводиле превремене стоп кодоне у сам ген. У случају *omp33-36* гена уочена су два типа интактних алела („Нуклеотидне секвенце *carO* и *omp33-36* гена изолата *A. baumannii* пореклом из Србије“). Филогенетском анализом порина *CarO* род *Acinetobacter* је подељен у три групе (I-III), које су даље класификоване у шест варијанти (варијанте I-IV припадају групи I, варијанта V групи II, а варијанта VI групи III). У групи I се углавном налазе клинички изолати *A. baumannii*, као и изолати *A. baumannii* пореклом из Србије (варијанте I и III). Као и *CarO*, филогенетска анализа *Omp33-36* је род *Acinetobacter* класификовала у три групе (I-III), а врсту *A. baumannii* у четири варијанте (1-4; варијанте 1 и 2 припадају групи III, варијанта 3 припада групи II, а варијанта 4 групи I). Изолати *A. baumannii* пореклом из Србије су били груписани у варијанте 1 и 2 групе III („Филогенетски профили *CarO* и *Omp33-36* порина“). Предикцијом трансмембранске топологије порина *CarO* установљено је присуство десет трансмембранских региона састављених од бета-ланаца и пет петљи усмерених ка ванћелијској средини код свих шест анализираних варијанти. Када је реч о порину *Omp33-36*, варијанте 2 и 3 поседују исти тополошки профил који се састоји од четрнаест трансмембранских региона састављених од бета-ланаца и седам петљи усмерених ка ванћелијској средини, док варијанту 1 и 4 чине дванаест и једанаест трансмембранских

региона састављених од бета-ланаца, као и шест и пет петљи усмерених ка ванћелијској средини, редом („Транс мембрански тополошки профили *CarO* и *Omp33-36* порина“). Вишеструким поређењем *CarO* установљено је да је 64% аминокиселина овог порина полиморфно, док проценат полиморфних аминокиселина *Omp33-36* износи 86. Анализа конзервисаности/варијабилности одређених региона порина *CarO* је указала на постојање четири конзервисана, два варијабилна и два хиперваријабилна региона у оквиру овог порина код све три групе. За разлику од униморфних *CarO* група, *Omp33-36* групе I и II поседују пет конзервисаних и четири варијабилна региона, док је група III организована у по шест конзервисаних и варијабилних региона. N-терминално позиционирани мотиви који су били конзервисани међу различитим групама *CarO* и *Omp33-36* су AEVGTGGYG и PLAEAAFL, редом („Полиморфност *CarO* и *Omp33-36* порина и варијабилност њихових региона“). Предикцијом утицаја варијабилности аминокиселина на биолошку улогу порина *CarO* детектовано је да четрнаест замена, четири делеције и једна инсерција у оквиру овог порина остварују негативан ефекат на његову функцију. Поред тога, на функцију *Omp33-36* негативан утицај остварују 84 замене, 17 делеција и 5 инсерција („Предикција утицаја варијабилности аминокиселина *CarO* и *Omp33-36* порина на њихову биолошку улогу“).

Поглавље **Дискусија** је посвећено упоредној анализи резултата добијених у овој тези и података пореклом из досадашње научне литературе. У овом поглављу је истакнут значај и допринос добијених резултата како у области примењене клиничке микробиологије, тако и у области фундаменталне молекуларне микробиологије.

Први део поглавља Дискусија се односи на анализу колекције изолата *A. baumannii* резистентних на карбапенеме који су узорковани у терцијарној педијатријској болници из Београда (Институт за здравствену заштиту мајке и детета Србије „Др Вукан Чупић“). Врло је значајно истаћи да је ово прва анализирана колекција *A. baumannii* резистентних на карбапенеме пореклом из Србије. На основу података добијених двома методама (идентификација клоналних група и PFGE) установљено је да анализирани изолати нису били клонално распрострањени унутар наведене болничке установе. Такође, потврђена је очекивана припадност, као и учесталост клоналних група карактеристичних за европски континент (са изузетком једног изолата). Молекуларни механизми одговорни за резистенцију на бета-лактамске антибиотике код ових изолата су детаљно описани и продискутовани у односу на податке из литературе.

У другом делу поглавља Дискусија је истакнут утицај различитих сигнала на појаву реверзибилне резистенције на антибиотике код патогених бактерија. Порини, као саставни делови спољашње мембране Грам-негативних бактерија, представљају једну од мета ових сигнала, чиме долази до промене њихове експресије и резистенције на антибиотике. У складу са тим, у овој тези је испитан ефекат који одређени сигнали остварују на експресију порина *A. baumannii* укључених у резистенцију на карбапенеме, *CarO* и *Omp33-36*. Као што је и претходно установљено, транскрипција *carO* гена зависи од фазе раста у којој се ћелије *A. baumannii* налазе. Такође, у овој тези је утврђено да је и транскрипција *omp33-36* гена зависна од фазе раста. За разлику од претходних студија у којима су анализирани појединачни сојеви, резултати добијени у овој тези наводе на закључак да ефекат који оставрују различите фазе раста на експресију гена за *CarO* и *Omp33-36* зависи од карактеристика сојева. Субинхибиторне концентрације имипенема и

меропенема значајно утичу на промена експресије *carO* и *omp33-36* гена код сојева са различитом осетљивошћу на карбапенеме. Као што је и очекивано, смањење експресије ових гена је у најизраженијој мери уочено код соја осетљивог на карбапенеме. Такође, интересантно је запажање да имипенем доводи до значајног смањења транскрипције *carO* гена у свим фазама раста, док овај ефекат меропенема изостаје у каснијим фазама раста. Овај феномен се може објаснити постојањем места за везивање имипенема, а изостанком места специфичног за меропенем у оквиру CarO порина. Резултати добијени у овој тези указују да субинхибиторне концентрације карбапенема могу утицати на појаву резистенције код осетљивих сојева или повећање МИК вредности код сојева *A. baumannii* резистентних на карбапенеме кроз смањење молекула порина у мембрани. Наведено, као и претходно описан утицај субинхибиторне концентрације антибиотика на резистенцију на антибиотике и вируленцију *A. baumannii* указује на опасност од неадекватне употребе антибиотске терапије. Будући да патогене бактерију бивају изложене хипоксичној средини у домаћину током инфламације и да подаци о одговору *A. baumannii* на овај тип стреса изостају, његов утицај на транскрипцију *carO* и *omp33-36* гена је испитиван у овој тези. Као што је претходно установљено за друге бактеријске врсте, допринос хипоксије резистенцији на антибиотике је уочен и у овој тези, с обзиром да је довела до смањења експресије гена за Omp33-36. Порин Omp33-36 је додатно описан као значајан фактор вируленције *A. baumannii*, док за порин CarO постоје извесне индикације да би могао остваривати овакву улогу. Резултати добијени у овој тези потврђују претходно наведено, будући да се транскрипција гена за ове порине значајно повећава након контакта са кератиноцима човека и имунским ћелијама пацова. Чињеница да овај пораст у транскрипцији гена за порине не корелише са цитотоксичним ефектом самих сојева је објашњен тиме да су поређени сојеви који нису изогени, као и да постоји могућност регулације експресије ових гена на посттранскрипционом нивоу, као и секреције самих порина у оквиру везикула спољашње мемbrane. Све наведено указује да је експресија CarO и Omp33-36 порина регулисана на прецизан начин у зависности од сигнала које ћелије примају из спољашње средине. Са једне стране ту су сигнали који угрожавају опстанак саме ћелије (субинхибиторна концентрација карбапенема и хипоксија) и усмеравају улогу CarO и Omp33-36 у правцу резистенције на антибиотике, а са друге, сигнали који информишу да је бактерија присутна у домаћина (ћелије домаћина) воде ка вирулетној природи порина. Такође, не може се искључити могућност истовремене двоструке улоге CarO и Omp33-36, која се остварује кроз снижену транскрипцију и повећану секрецију ових порина у оквиру везикула спољашње мемbrane.

Трећи део поглавља Дискусија се бави класификацијом, организацијом и антигенским потенцијалом порина CarO и Omp33-36 рода *Acinetobacter*. Претходно установљена класификација CarO порина представника врсте *A. baumannii* је у овој тези проширена на цео род, будући да све већи број врста овог рода поприма клинички значај. Већина клинички значајних *A. baumannii* је била смештена у једну групу, док су преостале две обухватале само неколико представника ове врсте. Тополошка предикција трансмембранске организације овог порина је била униформна код различитих група и одговарала је оној која је претходно описана за CarO порин. Када је реч о распореду конзервисаних и варијабилних региона, у овој тези је описан један додатни варијабилни регион који је био усмерен ка периплазматском делу ћелије. Претходно описана

локализација осталих (хипер)варијабилних региона је у овој анализи потврђена. Конзервисани мотив AEVGTGXGYG (X је T или L; у овој тези је аминокиселина X била T), претходно описан као обележје CarO порина, није био позициониран у потпуности ка ванћелијској средини што је један од предуслова за покретање имунског одговора. Када је реч о порину Omp33-36, подаци о класификацији у претходним студијама потпуно изостају. Представници рода *Acinetobacter* су били груписани у три групе, док је врста *A. baumannii* била распоређена у свим групама. Овај порин се показао далеко варијабилнијим у односу на CarO када је реч о трансмембранској топологији, али и распореду конзервисаних и варијабилних региона. Конзервисани мотив PLAEEAFL је једино код групе II рода *Acinetobacter* локализован ка спољашњој средини што га чини потенцијалним антигеном. Иако су поједини претходно анализирани порини *A. baumannii* показали високу конзервисаност, CarO и Omp33-36 се могу сматрати полиморфним поринима. Претпостављено је да полиморфност површинских молекула представља стратегију патогена за избегавање имунског одговора. И поред изражене полиморфности, предикција указује да већина аминокиселинских разлика CarO и Omp33-36 порина не би требало да остварује ефекат на њихову биолошку улогу.

У поглављу **Закључци** су сажето изнети закључци који се могу извести из резултата добијених у овој тези. Појединачни закључци су тематски класификовани у четири групе.

Прва група закључака се односи на класификацију анализираних изолата *A. baumannii* двома методама и на изостанак клоналног ширења ових изолата унутар здравствене установе из које воде порекло, а који је утврђен наведеним методама. У другој групи закључака су истакнути молекуларни механизми резистенције на бета-лактамске антибиотике анализираних изолата *A. baumannii*. Трећа група закључака обухвата ефекте које остварују сигнали тестирани у овој студији на транскрипцију *carO* и *omp33-36* гена сојева *A. baumannii* са различитом осетљивошћу на карбапенеме. Четврта група закључака се односи на класификацију, као и предикцију организације, антигенског потенцијала и утицаја аминокиселинских разлика на биолошку улогу порина CarO и Omp33-36.

У поглављу **Литература** је дата листа 190 извора литературе. Цитирани литературни извори су актуелни и омогућили су развој идеје за извођење овог истраживања, као и објашњење добијених резултата и доношење закључака. Наведени извори покривају све појединачне области овог истраживања и адекватно су наведени у самом тексту.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **M21-Novovic, K.**, Mihajlovic, S., Vasiljevic, Z., Filipic, B., Begovic, J., Jovic, B. (2015). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Serbia: Revision of CarO classification. *PloS one*, 10(3), e0122793.
DOI: [10.1371/journal.pone.0122793](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122793)
2. **M21-Novović, K.**, Mihajlović, S., Dinić, M., Malešević, M., Miljković, M., Kojić, M., Jovčić, B. (2018). *Acinetobacter* spp. porin Omp33-36: Classification and transcriptional response to carbapenems and host cells. *PloS one*, 13(8), e0201608.
DOI: [10.1371/journal.pone.0201608](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201608)

Б2. Радови у часописима домаћег значаја

/

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Novovic, K.**, Vasiljevic, Z., Filipic, B., Begovic, J., Kojic, M., Jovic, B. (2014). Molecular basis of carbapenem resistance among *Acinetobacter baumannii* isolates from tertiary care pediatric hospital in Belgrade, Serbia. 5th Congress of Macedonian Microbiologists, Ohrid, Macedonia, May 28th-31st, poster, book of abstracts, A.43, p.115.
2. **Novovic, K.**, Mihajlovic, S., Dinic, M., Malesevic, M., Kojic, M., Jovic, B. (2017). New insights into diversity of CarO and Omp33-36 kDa porins from *Acinetobacter* spp. 1st Congress of Molecular Biologists of Serbia (CoMBoS 2017), Belgrade, Serbia, September 20th-22th, poster, book of abstracts, p.202.

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

/

Мишљење и предлог Комисије:

Анализа докторске дисертације Катарине Д. Нововић под насловом „**Регулација генске експресије и диверзитет CarO и Omp33-36 порина рода *Acinetobacter spp.***“ показује да је она у својој докторској тези успешно реализовала постављене циљеве истраживања кроз свеобухватан и добро конципиран експериментални рад. Докторска дисертација представља оригиналан научни рад у области молекуларне биологије који истражује микробиолошке и молекуларне карактеристике изолата врсте *A. baumannii* са територије Р. Србије и даје одговоре на недоумице о улози транскрипције гена од значаја током терапије антибиотицима и инфекције домаћина. Такође, анализа диверзитета порина CarO и Omp33-36 у овој докторској дисертацији омогућила је идентификацију потенцијалних антигених региона ових порина који би могли да буду од значаја за формулацију вакцине што је један од главних задатака које је Светска здравствена организација поставила када је у питању превенција инфекција изазваних представницима врсте *A. baumannii*.

Самосталност у планирању и експерименталном раду, као и у тумачењу и критичком разматрању резултата које је кандидаткиња показала у свом раду, говоре о добром познавању научне области којој обрађена проблематика припада. Као резултат, истраживања приказана у овој дисертацији су публикована у два научна рада. Кандидаткиња има укупно 12 радова из уже научне области, од чега 5 као први аутор што говори о њеном успешном научном раду. Комисија са задовољством констатује да је имала прилику да анализира вредан и оригиналан научни допринос докторске дисертације кандидата Катарине Д. Нововић „**Регулација генске експресије и диверзитет CarO и Omp33-36 порина рода *Acinetobacter spp.***“, и предлаже Наставно-научном Већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај реферат и одобри кандидаткињи јавну одбрану докторске дисертације.

КОМИСИЈА:

др Бранко Јовчић, ванредни професор,
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

др Милан Којић, научни саветник,
Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство,
Универзитет у Београду

др Јелена Лозо ванредни професор,
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

У Београду, 10.09.2018. године.