

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ
REPORT ON THE ASSESSMENT OF THE DOCTORAL DISSERTATION

I	ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ												
I	INFORMATION ABOUT THE COMMISSION												
1.	Датум и орган који је именовео комисију: 14.9.2023. године, Наставно-научно веће Природно-математичког факултета у Новом Саду												
1.	Date and authority that appointed the commission: September 14, 2023, Academic Council of the Faculty of Science and Mathematics in Novi Sad												
2.	Састав комисије у складу са <i>Правилима докторских студија Универзитета у Новом Саду</i> :												
2.	The committee members in accordance with <i>the Rules of Doctoral Studies of the University of Novi Sad</i> :												
1.	<table border="1"><tr><td>др Верица Алексић Сабо Dr. Verica Aleksić Sabo</td><td>Доцент Assistant Professor</td><td>Микробиологија 26.5.2022. Microbiology May, 26th 2022</td></tr><tr><td>презиме и име surname and name</td><td>звање title</td><td>ужа научна област и датум избора narrow scientific field and date of election to the title</td></tr><tr><td colspan="2">Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду Faculty of Science, University of Novi Sad</td><td>Председник President</td></tr><tr><td colspan="2">установа у којој је запослен-а institution where he/she is employed</td><td>функција у комисији function in the commission</td></tr></table>	др Верица Алексић Сабо Dr. Verica Aleksić Sabo	Доцент Assistant Professor	Микробиологија 26.5.2022. Microbiology May, 26 th 2022	презиме и име surname and name	звање title	ужа научна област и датум избора narrow scientific field and date of election to the title	Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду Faculty of Science, University of Novi Sad		Председник President	установа у којој је запослен-а institution where he/she is employed		функција у комисији function in the commission
др Верица Алексић Сабо Dr. Verica Aleksić Sabo	Доцент Assistant Professor	Микробиологија 26.5.2022. Microbiology May, 26 th 2022											
презиме и име surname and name	звање title	ужа научна област и датум избора narrow scientific field and date of election to the title											
Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду Faculty of Science, University of Novi Sad		Председник President											
установа у којој је запослен-а institution where he/she is employed		функција у комисији function in the commission											
2.	<table border="1"><tr><td>др Кнежевић Петар Dr. Petar Knežević</td><td>Редовни професор Full Professor</td><td>Микробиологија 28.5.2020. Microbiology May, 28th 2020</td></tr><tr><td>презиме и име surname and name</td><td>звање title</td><td>ужа научна област и датум избора narrow scientific field and date of election to the title</td></tr><tr><td colspan="2">Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду Faculty of Science, University of Novi Sad</td><td>Ментор Mentor</td></tr></table>	др Кнежевић Петар Dr. Petar Knežević	Редовни професор Full Professor	Микробиологија 28.5.2020. Microbiology May, 28 th 2020	презиме и име surname and name	звање title	ужа научна област и датум избора narrow scientific field and date of election to the title	Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду Faculty of Science, University of Novi Sad		Ментор Mentor			
др Кнежевић Петар Dr. Petar Knežević	Редовни професор Full Professor	Микробиологија 28.5.2020. Microbiology May, 28 th 2020											
презиме и име surname and name	звање title	ужа научна област и датум избора narrow scientific field and date of election to the title											
Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду Faculty of Science, University of Novi Sad		Ментор Mentor											

установа у којој је запослен-а institution where he/she is employed		функција у комисији function in the commission	
3. др Малгоржата Лобоцка Dr. Małgorzata Łobocka	Редовни професор Full Professor	Микробиологија 15. 2. 2021. Microbiology	
презиме и име surname and name		звање title	ужа научна област и датум избора narrow scientific field and date of election to the title
Институт за биохемију и биофизику Пољске академије наука, Варшава Institute of Biochemistry and Biophysics of the Polish Academy of Sciences, Warsaw		Члан Member	
установа у којој је запослен-а institution where he/she is employed		функција у комисији function in the commission	
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ			
II INFORMATION ABOUT THE CANDIDATE			
1. Име, име једног родитеља, презиме: Дамир (Божо) Гаврић 1. First name, first name of one parent, last name: Damir (Božo) Gavrić 2. Датум рођења, општина, држава: 16.5.1994., Сарајево, Босна и Херцеговина 2. Date of birth, municipality, country: May 16 th , 1994, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina 3. Назив факултета, назив претходно завршеног нивоа студија и стечени стручни/академски назив: Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, мастер академске студије, мастер биолог 3. Name of the faculty, name of previously completed level of study and acquired professional/academic title: Faculty of Science, University of Novi Sad, master of academic studies, Master in Biology 4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија: 2018. година, Доктор наука – биолошке науке 4. Year of enrollment in doctoral studies and name of doctoral study program: 2018, Doctor of Science - Biological Sciences			
III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:			
III TITLE OF DOCTORAL DISSERTATION:			
„Филаментозни бактериофаги врсте <i>Pseudomonas aeruginosa</i> “ "Filamentous bacteriophages of species <i>Pseudomonas aeruginosa</i> "			
IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:			
IV OVERVIEW OF THE DOCTORAL DISSERTATION:			
Докторска дисертација кандидата Дамира Гаврића „Филаментозни бактериофаги врсте <i>Pseudomonas aeruginosa</i> “ припада научној области Биологија, ужа научна област Микробиологија (Бактериологија и Вирусологија). Написана је на енглеском језику, а сажетак је дат на енглеском језику у кључној документацијској информацији.			
Испред основног текста дисертације налазе се насловна страна, кључна документацијска информација, захвалница и садржај. Дисертација је написана на 192 странице А4 формата и подељена је на 9 поглавља: 1. Увод, 2. Преглед литературе, 3. Циљ и радне хипотезе, 4. Материјал и методе рада, 5. Резултати, 6. Дискусија, 7. Закључци, 8. Литература и 9. Прилози Главни текст дисертације садржи 13 табела и 40 слика и фотографија, док прилог обухвата 2 табеле. Укупно су цитиране 373 публикације. На крају основног текста дисертације налази се кратка биографија аутора.			

Candidate Damir Gavrić's doctoral dissertation "Filamentous bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*" belongs to the scientific field of Biology, narrower scientific field of Microbiology (Bacteriology and Virology). It is written in English, and the summary is given in English in the key documentation information.

The main text of the dissertation is preceded by the title page, key documentation information, acknowledgments and table of contents. The dissertation is written on 192 pages of A4 format and is divided into 9 chapters: 1. Introduction, 2. Literature review, 3. Objective and working hypotheses, 4. Material and work methods, 5. Results, 6. Discussion, 7. Conclusions, 8. Literature and 9. Supplementary. The main text of the dissertation contains 13 tables and 40 pictures and photographs, while the supplementary includes 2 tables. A total of 373 publications were cited. At the end of the main text of the dissertation there is a short biography of the author.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

V EVALUATION OF INDIVIDUAL PARTS OF THE DOCTORAL DISSERTATION:

У поглављу **Увод** кандидат представља детаљан опис бактеријске врсте *Pseudomonas aeruginosa* са посебним освртом на њену патогеност и медицински значај. Описује се интеракција ове бактерије са бактериофагима. Образлаже се широка распрострањеност бактериофага и њихов велики значај у променама фенотипа бактеријских домаћина посредством лизогене конверзије. Указује се на постојање засебне групе бактериофага, из фамилије *Inoviridae*. Ови бактериофаги, често названи и филаментозни бактериофаги, поседују јединствену морфологију као и животни циклус. Највећа пажња је посвећена филаментозним бактериофагима бактерије *P. aeruginosa* као и њихова улога у вирулентности ове бактеријске врсте.

Поглавље **Преглед литературе** подељено је на 13 потпоглавља и детаљно и свестрано анализира досадашња научна сазнања о утицају филаментозних бактериофага на фенотип *P. aeruginosa*. Детаљно су, пре свега, описане карактеристике бактерије *P. aeruginosa*, њена осетљивост на антимикробне агенсе и значај ове бактеријске врсте. Посебно је посвећена пажња факторима вируленције *P. aeruginosa* као и процесу лизогене конверзије од стране бактериофага који доприносе вирулентности ове бактерије. Детаљно су описане морфологија и физичкохемијске особине филаментозних бактериофага и организација генома. Објашњен је начин успостављања инфекција од стране ове групе фага, као и два различита животна циклуса који су заступљени код филаментозних бактериофага. Детаљно су описани филаментозни бактериофаги *P. aeruginosa*, означени као Pf. Нарочито је посвећена пажња признатим врстама Pf1 и Pf3, али и другим мање познатим фагима као што су Pf4, Pf5 и PfLES58, који немају статус врсте.

Комисија сматра да су Увод и Преглед литературе систематично и свеобухватно написани и да је дат комплетан увид у проблематику којом се дисертација бави. Имајући у виду досадашње, малобројне резултате истраживања филаментозних бактериофага и њихове улоге у вирулентности бактерија, Комисија сматра да је у овим поглављима јасно указано на оправданост и значај даљих истраживања у овој области. Анализом ових поглавља Комисија констатује да је кандидат темељно изложио досадашње најважније научне резултате, неопходне за постављање јасно дефинисаних Циљева истраживања.

Циљеви истраживања докторске дисертације: Дефиниција морфолошких карактеристика Pf4, Pf5 и PfLES58 фага, карактеристика генома и таксономске позиције унутар фамилије *Inoviridae*. Оптимизација методе за умножавање филаментозних бактериофага, одређивање њиховог литичког спектра и инфективности алтернативних домаћина. Утврђивање индукцибилности филаментозних фага антибиотицима. Дефинисање улоге филаментозних бактериофага у променама вирулентности бактеријског домаћина као што су: промене у осетљивости на антибиотике, формирање биофилма, покретљивост, брзина раста, производња пигмента, као и улога фага у аутоагрегацији и хидрофобности ћелија).

Комисија сматра да су циљеви ове дисертације правилно конципирани и да су у складу са пријавом теме и садржајем дисертације

Поглавље **Материјал и методе рада** садржи 26 потпоглавља који дају детаљан опис материјала и метода коришћених у раду за остваривање постављених циљева. Описане су бактеријске врсте, бактериофаги и антимикуробни агенси који су искоришћени у овој студији. Наведени су сви софтвери и биоинформатички алати искоришћени за анализу секвенци филаментозних бактериофага и дизајнирање PCR прајмера специфичних за ову групу фага. Такође су објашњене методе одређивања заступљености Pf бактериофага у различитим сојевима бактерије *P. aeruginosa*. Упоредене су две различите методе умножавања *P. aeruginosa* филаментозних фага. Објашњен је начин утврђивања њихове продукције и литичког спектра на различитим сојевима бактерије *P. aeruginosa*. Детаљно су описани кораци за добијање трансмисионе електронске микрографије ових бактериофага, као и утврђивања ДНК и протеинског профила. Описан је начин суперинфекције бактерије *P. aeruginosa* од стране Pf бактериофага, као и њихова индукција различитим антимикуробним агенсима и облигатно литичким фагима. На крају су потпоглавља која описују различите методе за проверу фенотипских особина бактерије домаћина након инфекције са Pf бактериофагима. Сви добијени резултати су статистички обрађени употребом Student T теста и Wilcoxon теста рангирања.

Комисија сматра да је коришћени материјал адекватан и употребљен на одговарајући начин за све споменуте анализе у дисертацији. Методе за реализацију наведених циљева истраживања су савремене, детаљно описане, прецизне и примерене за добијање валидних резултата. Изабране методе статистичке обраде података у потпуности су одговарајуће планираном истраживању.

Резултати дисертације су изложени у петом поглављу, а текстуални приказ је илустрован сликама и фотографијама (30) и табелама (10). У потпоглављима су систематично и детаљно приказани резултати анализе секвенци Pf бактериофага као филогенетске анализе ових фага са осталим признатим врстама фамилије *Inoviridae*. Утврђена је продукција PfLES58 бактериофага и његова заступљеност у различитим сојевима бактерије *P. aeruginosa*. Приказане су разлике између две методе за умножавања *P. aeruginosa* филаментозних бактериофага. Успешно је показана продукција вириона PfLES58 бактериофага за које до сада није било познато да формирају комплетне вирионе. Приказана је и продукција плака од стране сва три анализираних Pf фага. Специфична морфологија ових бактериофага је приказана сликама добијених трансмисионим електронским микроскопом. Потврђено је присуство једноланчане ДНК и присуство главног протеина капсида код сва три бактериофага. Утврђен је њихов литички спектар на 267 различитих сојева бактерије *P. aeruginosa*. Резултати индукције Pf бактериофага у присуству антимикуробних агенаса или облигатно литичких бактериофага су такође представљени. Различитим PCR методама и секвенцирањем успешно је утврђена суперинфекција Pf бактериофага различитих сојева бактерије *P. aeruginosa*. qRT-PCR методом је проверена експресија и продукција вириона Pf бактериофага у новим инфицираним сојевима. На крају, графички и табеларно су приказане све забележене промене у фенотипу инфицираних сојева као што су промена у аутоагрегативност и хидрофобности ћелија, у њиховој покретљивости, продукцији биофилма и пигмената (пиоцијанин и пиовердин), заступљености малих варијанти колонија (eng. *small colony variants – SCVs*) и осетљивости на антибиотике из различитих класа. На основу добијених резултата детаљно је описана улога у вирулентности ове бактеријске врсте.

Комисија сматра да је кандидат прегледно, аналитично и систематично представио резултате, да су они јасни за тумачење и остварују постављене циљеве дисертације.

У делу **Дискусија** кандидат је указао на изражену сличност појединих Pf бактериофага у погледу нуклеотидних секвенци генома, али и филогенетску удаљеност PfLES58 бактериофага од осталих анализираних бактериофага. Предложен је нови род *Secondolicivirus* у оквиру ове фамилије са PfLES58 фагом као представником. Објашњен је значај продукције вириона и ширине литичког спектра Pf бактериофага. Посебно су прокоментарисани резултати индукције ових бактериофага у присуству антимикуробних агенаса и облигатно литичких фага са освртом на антибиотску терапију или терапију са фагима.

У овом поглављу дато је свеобухватно тумачење и поређење добијених резултата са резултатима

радова других аутора који су се бавили променама фенотипа различитих бактеријских врста након инфекције са филаментозним бактериофагима. Закључено је да филаментозни фаги бактерије *P. aeruginosa* значајно снижавају вирулентност ове бактерије, смањују њену токсичност и повећавају осетљивост на антибиотике из различитих класа. Такође, због детаљно истражене биологије ових бактериофага, омогућена су даља истраживања у примени филаментозних фага у различитим молекуларним техникама и медицини.

Комисија сматра да Дискусија промишљено прати тему, циљеве и добијене резултате, написана је концизно, систематично и научно утемељено.

Изведено је укупно девет закључака, који су наведени у поглављу 7 овог Извештаја.

Комисија сматра да су Закључци правилно изведени на основу добијених резултата и дискусије, а формулисани су јасно и у складу са постављеним циљевима и хипотезама докторске дисертације.

Укупно 373 **литературне јединице**, првенствено из међународних часописа и научних књига, цитиране су на одговарајући начин, а избор референци је примерен тематици ове дисертације.

На основу одабраних литературних извора Комисија закључује да кандидат поседује добро познавање области и предмета истраживања дисертације.

Прилог садржи две табеле. Једна је са списком искориштених бактеријских сојева, а друга је приказ резултата.

Комисија констатује да су сва поглавља написана на адекватан начин и позитивно оцењује све делове докторске дисертације.

In the **Introduction** chapter, the candidate presents a detailed description of the bacterial species *Pseudomonas aeruginosa* with special reference to its pathogenicity and medical significance. The interaction of this bacterium with bacteriophages is described. The wide distribution of bacteriophages and their importance in changing the phenotype of bacterial hosts through lysogenic conversion is explained. The existence of a separate group of bacteriophages from the *Inoviridae* family is explained. These bacteriophages, often called filamentous bacteriophages, have a unique morphology and life cycle. The greatest attention is paid to the filamentous bacteriophages of the bacterium *P. aeruginosa*, as well as their role in the virulence of this bacterial species.

The **literature review** chapter is divided into 13 subchapters and analyzes in detail and comprehensively the current scientific knowledge about the influence of filamentous bacteriophages on the phenotype of *P. aeruginosa*. First of all, the characteristics of *P. aeruginosa* bacteria, its sensitivity to antimicrobial agents and the importance of this bacterial species are described in detail. Special attention was paid to the virulence factors of *P. aeruginosa* as well as the process of lysogenic conversion by bacteriophages that contribute to the virulence of this bacterium. The morphology and physicochemical properties of filamentous bacteriophages and genome organization are described in detail. Their genome organization is explained. The method of establishing infections by this group of phages is explained, as well as the two different life cycles used by filamentous phages. The filamentous bacteriophages of *P. aeruginosa*, named Pf, are described in detail. Particular attention was paid to the recognized species Pf1 and Pf3, but also to other lesser-known phages such as Pf4, Pf5 and PfLES58, which do not have species status.

The Commission believes that the Introduction and the Literature Review are systematically and comprehensively written and that a complete insight into the issues dealt with in the dissertation is provided. Bearing in mind the few results of research on filamentous bacteriophages and their role in the virulence of bacteria, the Commission believes that the justification and importance of further research in this area is clearly indicated in these chapters. By analyzing these chapters, the Commission concludes

that the candidate has thoroughly presented the most important scientific results so far, which are necessary for setting clearly defined research objectives.

Research objectives of the doctoral dissertation: Definition of morphological characteristics of Pf4, Pf5 and PfLES58 phages, genome characteristics and taxonomic position within the *Inoviridae* family. Optimization of the method for multiplication of filamentous bacteriophages, determination of their lytic spectrum and infectivity of alternative hosts. Determining the inducibility of filamentous phages with antibiotics. Defining the role of filamentous bacteriophages in changes in the virulence of the bacterial host, such as: changes in sensitivity to antibiotics, biofilm formation, mobility, growth rate, pigment production, as well as the role of phages in autoaggregation and cell hydrophobicity).

The committee believes that the objectives of this dissertation are properly conceived and that they are in accordance with the application of the topic and the content of the dissertation.

The chapter **Material and methods** contains 26 subchapters that provide a detailed description of the materials and methods used in the work to achieve the set goals. The bacterial species, bacteriophages and antimicrobial agents used in this study are described. All the software and bioinformatics tools used to analyze the sequences of filamentous bacteriophages and design PCR primers specific for this group of phages are listed. Methods of determining the presence of Pf bacteriophage in different strains of *P. aeruginosa* bacteria are also explained. Methods of determining the presence of Pf bacteriophage in different strains of *P. aeruginosa* bacteria are also explained. Two different methods of multiplication of *P. aeruginosa* filamentous phages were compared. The method of determining their production and lytic spectrum on different strains of the bacterium *P. aeruginosa* is explained. The steps for obtaining a transmission electron micrograph of these bacteriophages, as well as determining the DNA and protein profile, are described in detail. The method of superinfection of *P. aeruginosa* by Pf bacteriophages is described, as well as their induction by various antimicrobial agents and obligate lytic phages. At the end are subsections describing different methods for checking the phenotypic properties of the host bacteria after infection with Pf bacteriophages. All obtained results were statistically processed using the Student T test and the Wilcoxon signed rank test.

The committee believes that the material used is adequate and used in an appropriate way for all the analyzes mentioned in the dissertation. The methods for the realization of the mentioned research objectives are modern, described in detail, precise and suitable for obtaining reliable results. The chosen methods of statistical data processing are fully appropriate to the planned research.

The **results** of the dissertation are presented in the fifth chapter, and the text presentation is illustrated with pictures and photos (30) and tables (10). In the subchapters, the results of the sequence analysis of Pf bacteriophages as well as the phylogenetic analysis of these phages with other recognized species of the *Inoviridae* family are presented systematically and in detail. The production of PfLES58 bacteriophage and its presence in different strains of *P. aeruginosa* was determined. The differences between two methods for multiplying *P. aeruginosa* filamentous bacteriophages are presented. The production of PfLES58 bacteriophage virions, which until now were not known to form complete virions, was successfully demonstrated. Plaque production by all three analyzed Pf phages is also shown. The specific morphology of these bacteriophages is shown by images obtained with a transmission electron microscope. The presence of single-stranded DNA and the presence of the main capsid protein in all three bacteriophages were confirmed. Their lytic spectrum was determined on 267 different strains of the bacterium *P. aeruginosa*. Results of Pf bacteriophage induction in the presence of antimicrobial agents or obligate lytic bacteriophages are also presented. Different PCR methods and sequencing successfully determined the superinfection of Pf bacteriophage of different strains of *P. aeruginosa* bacteria. The expression and production of Pf bacteriophage virions in new infected strains was checked using the qRT-PCR method. At the end, all recorded changes in the phenotype of the infected strains are presented graphically and tabularly, such as changes in autoaggregativity and hydrophobicity of cells, in their mobility, production of biofilms and pigments (pyocyanin and pyoverdine), representation of small

colony variants (SCVs) and sensitivity to antibiotics from different classes. Based on the obtained results, the role in the virulence of this bacterial species is described in detail.

The committee believes that the candidate presented the results in a clear, analytical and systematic manner, that they are clear for interpretation and achieve the set goals of the dissertation.

In the **Discussion** section, the candidate indicated the pronounced similarity of certain Pf bacteriophages in terms of genome nucleotide sequences, but also the phylogenetic distance of the PfLES58 bacteriophage from the other analyzed bacteriophages. A new genus *Secondolicivirus* was proposed within the *Inoviridae* family with the PfLES58 phage as a representative. The importance of virion production and the width of the lytic spectrum of the Pf bacteriophage is explained. The results of the induction of these bacteriophages in the presence of antimicrobial agents and obligatorily lytic phages with reference to antibiotic therapy or therapy with phages are specially commented.

In this chapter, a comprehensive interpretation and comparison of the obtained results with the results of the works of other authors who dealt with changes in the phenotype of different bacterial species after infection with filamentous bacteriophages is given.

The Commission believes that the Discussion carefully follows the topic, goals and results obtained, it is written concisely, systematically and scientifically based.

A total of nine conclusions were drawn, which are listed in chapter 7 of this Report.

The Commission considers that the Conclusions were correctly drawn based on the obtained results and discussion, and were formulated clearly and in accordance with the set goals and hypotheses of the doctoral dissertation.

A total of 373 **literature units**, primarily from international journals and scientific books, are cited in an appropriate manner, and the selection of references is appropriate to the topic of this dissertation.

Based on the selected literary sources, the Commission concludes that the candidate has a good knowledge of the field and subject of the dissertation research.

The **supplementary** contains two tables. One is with a list of used bacterial strains, and the other is a presentation of the results.

The commission notes that all chapters are written in an adequate manner and positively evaluates all parts of the doctoral dissertation.

VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ:

VI LIST OF SCIENTIFIC AND PROFESSIONAL PAPERS THAT HAVE BEEN PUBLISHED OR ACCEPTED FOR PUBLICATION ON THE BASIS OF THE RESEARCH RESULTS IN THE FRAMEWORK OF WORK ON THE DOCTORAL DISSERTATION:

M21 – Рад у врхунском међународном часопису

M21 – Paper in a superb international journal

1. **Gavric, D., Knezevic, P.** 2022. Optimized Method for *Pseudomonas aeruginosa* Integrative Filamentous Bacteriophage Propagation. *Frontiers in Microbiology*, 12 - 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.707815> (IF 6.064)

2. **Gavric, D., Knezevic, P. 2022. Filamentous Pseudomonas Phage Pf4 in the Context of Therapy-Inducibility, Infectivity, Lysogenic Conversion, and Potential Application. Viruses. 14 (6), 1261; <https://doi.org/10.3390/v14061261> (IF 5.818)**

M34 – Саопштење са међународног скупа штампано у изводу

M34 – Presentation from the international meeting printed in the extract

1. **Gavric, D., Cvetanovic, J., Grcic, J., Aleksic Sabo, V., Kostanjsek, R., Knezevic, P. 2022. "Pseudomonas virus PfLES" - candidate for a new species and genus of the family Inoviridae. FEMS Conference on Microbiology (2; Beograd; 2022)**
2. **Gavric, D., Vukovic, D., Nikolic, I., Gostimirovic, S., Pejic, J., Knezevic, P. 2022. Filamentous phage Pf4 resensitize Pseudomonas aeruginosa to antibiotics. FEMS Conference on Microbiology (2; Beograd; 2022)**
3. **Gavric, D., Vukovic, D., Gostimirovic, S., Nikolic, I., Pejic, J., Grcic, J., Cvetanovic, J., Aleksic Sabo, V., Knezevic, P. 2022. Pseudomonas aeruginosa filamentous phage PfLES58 is inducible by subinhibitory concentrations of different antimicrobial agents. International Congress on Cell Science and Molecular Biology (1; Reykjavik; 2022)**

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА:

VII CONCLUSIONS AND RESEARCH RESULTS:

У овој дисертацији детаљно су окарактерисани фаги бактерије *Pseudomonas aeruginosa* који припадају фамилији *Inoviridae* – Pf4, Pf5 и PfLES58, пореклом из сојева PAO1, UCBPP-PA14 и LESB58, а њихова биологија је разјашњена.

На основу добијених резултата и у складу са циљевима студије, може се закључити:

- Фаги PfLES58, Pf4 и Pf5 припадају фамилији *Inoviridae*, пошто деле морфолошка, геномска и протеинска својства са другим фагима из фамилије. Анализа је показала да су ова три фага различите врсте и да фаги Pf4 и Pf5 припадају истом роду, заједно са Pf1 и Pf8 (*Primolicivirus*).
- Профаг PfLES58 се активно реплицира у *P. aeruginosa*, што је показано присуством репликативне форме у бактеријским ћелијама, а затим и производњом вириона. На основу својстава кључних гена/протеина, PfLES58 припада другом роду (предложено име *Secondolicivirus*). Његови генетски елементи имају високу заступљеност у сојевима *P. aeruginosa* (41,2%) из колекције PK Lab.
- Принос фага је много већи, за отприлике 4 – 8 логаритма, када се користи мања запремина културе и кад инкубација траје дуже него када се користи велика запремина културе са краћом инкубацијом. Могућа је даља модификација методе, тако да се може прилагодити за филаментозне фаге који инфицирају друге бактерије осим *P. aeruginosa*.
- Поред Pf4 фага, за којег је познато да производи плаке, ово својство је потврђено за PfLES58 и Pf5 фаге. Плаки су мали (око 1 мм) и непрозирни и могу се лакше открити када се примени једнослојни агар метод (СПОТ метода).
- Pf фаги могу бити индуковани субинхибиторним концентрацијама флуорохинолона и митомицина Ц, што је скоро удвостручило експресију гена фага, или инфекцијом облигатно литичким репатим фагима из рода *Pbunavirus*, који појачавају експресију Pf гена до 5 пута. Ово је посебно важно са аспекта терапије фагима или комбинованог третмана фагима и антибиотикима.
- Pf фаги могу успоставити хроничне продуктивне инфекције у различитим сојевима *P. aeruginosa*, а њихова експресија може у неким случајевима премашити експресију других филаментозних профага (скоро 2 пута више), који се већ налазе у домаћинима. Искључивање суперинфекције није примећено, тако да вишеструке суперинфекције могу да обезбеде нови генетски материјал за мутације, дрифт или природну селекцију, односно еволуцију *P. aeruginosa*. Ово је посебно важно у контексту умереног до широког литичког спектра фага: Pf4 може инфицирати 46,1% сојева, Pf5 62,5% и PfLES58 инфицирати 90,6% сојева када је коришћена PK Lab колекција бактеријских култура.
- Pf фаги могу утицати на фенотипска својства у вези са вируленцијом новоинфицираних сојева *P. aeruginosa*:
 - Неки фаги благо смањују раст бактерија након инфекције;

- Смањити аутоагрегацију, мењајући сојеве квалитативно од умерено агрегативних у неагрегативне у неким случајевима; ово је повезано са смањеном вирулентношћу сојева;
 - Повећати хидрофобност површине ћелије, мењајући сојеве квалитативно од хидрофилних до умерено хидрофобних у неким случајевима; ово доприноси бољој адхезији бактерија на хидрофобне површине;
 - Смањити покретљивост помоћу пила (eng. *twitching motility*), смањити или повећати покретљивост ројења (eng. *swarming motility*) и повећати покретљивост пливања (eng. *swimming motility*), у зависности од специфичне комбинације фага и соја бактерије.
 - Pf фаги скоро потпуно инхибирају производњу токсичног пиоцијанина (отприлике 10 до 130 пута), што чини ове инфициране сојеве мање токсичним.
 - Pf фаги такође смањују производњу пиовердина, ометајући везивање гвожђа. Како пиовердин активира производњу токсина, Pf фаги смањују општу токсичност соја.
- Инфекција бактериофагима ове групе значајно је повећала производњу биофилма код бактерија, са 1,6 на 2,4 пута. Овакви ефекти доводе до појаве сојева *P. aeruginosa* који су склонији успостављању хроничних инфекција. Додатни доказ за то је чешћа појава малих варијанти колонија (eng. *small colony variants – SCVs*) након инфекције Pf фагима, али и смањена вируленција која може учинити бактеријске инфекције мање озбиљним.
 - Филаментазни фаги имају потенцијал да учине новоинфициране сојеве поново осетљивим на антибиотике, као што су тетрациклин, цефтазидим и стрептомицин, нудећи обећавајућу терапијску опцију. Такође, ови фаги, пошто су овде детаљно окарактерисани, могу се узети у обзир за друге технике засноване на бактериофагима (детекција *P. aeruginosa*, типизација фагима, приказ фага (eng. *phage display*) итд.).

Резултати јасно указују да испитивани Pf фаги доприносе вируленцији и еволуцији бактерија, имају многа јединствена својства и велики потенцијал за вишеструку примену. Самим тим, ова група бактериофага заслужује даља истраживања.

In the present study, *Pseudomonas aeruginosa* specific phages belonging to family *Inoviridae* – Pf4, Pf5 and PfLES58, originating from strains PAO1, PA14 and LESB58, have been characterized in detail and their biology has been elucidated.

Based on the obtained results and in line with the study objectives, the following can be concluded:

- The phages PfLES58, Pf4, and Pf5 belong to the family *Inoviridae*, since they share morphological, genome and protein properties with other phages from the family. The analysis showed that these three phages are different species and that phages Pf4 and Pf5 belong to the same genus, together with Pf1 and Pf8 (*Primolicivirus*).
- The prophage PfLES58 actively replicates in *P. aeruginosa*, as demonstrated by the presence of replicative form in bacterial cells, and subsequently by virion production. Based on properties of key genes/proteins, PfLES58 belongs to a different genus (proposed name *Secondolicivirus*). Its genetic elements have high prevalence among *P. aeruginosa* strains (41.2%) of PK Lab culture collection.
- The phage yield is much higher, for approx. 4 – 8 logs, when a smaller culture volume is used and the incubation lasts longer than when a large culture volume is used with a shorter incubation. Further modification of the method is possible, so it can be adapted for filamentous phages that infect bacteria other than *P. aeruginosa*.
- Beside Pf4 phage, which is known to produce plaques, this property was confirmed for PfLES58 and Pf5 phages. The plaques are small (approx. 1mm) and opaque and can be easier detected when single-layer agar method is applied.
- Pf phages can be induced by subinhibitory concentrations of fluoroquinolones and mitomycin C, which almost doubled expression of phage genes, or by infection with obligatory lytic tailed phages from *Pbunavirus* genus, which elevate Pf gene expression up to 5 times. This is particularly important from the aspect of phage therapy or combined phage-antibiotic treatment.
- Pf phages can establish chronic productive infections in different *P. aeruginosa* strains, and their

expression can exceed in some instances the expression of indigenous filamentous prophages (almost 2 times more). The superinfection exclusion was not observed, so the multiple superinfections can provide new genetic material for mutations, drift or natural selection, i.e. evolution of *P. aeruginosa*. This is particularly important in the context of phage moderate to broad lytic spectra: Pf4 can infect 46.1% of strains, Pf5 62.5% and PfLES58 infect 90.6% strains when PK Lab culture collection was used.

- Pf phages can influence virulence related phenotypic properties of newly infected *P. aeruginosa* strains:
 - Some phages slightly decrease bacterial growth after infection;
 - Decrease autoaggregation, changing it qualitatively from moderately aggregative to non-aggregative in some instances; this is related with decreased virulence of strains;
 - Increase cell surface hydrophobicity, changing it qualitatively from hydrophilic to moderately hydrophobic in some instances; this contributes to better bacterial adhesion to hydrophobic surfaces;
 - Decrease twitching motility, decrease or increase swarming motility and increase swimming motility, depending on a specific phage-bacterial strain combination.
 - Pf phages almost completely inhibit the production of toxic pyocyanin (approx. from 10 to 130 times), which makes these infected strains less toxic.
 - Pf phages also decrease pyoverdine production, impairing iron chelation and reducing the bacterial fitness. As pyoverdine activates production of some toxin, Pf phages decrease general strain toxicity.
- Bacterial infection with bacteriophages of this group significantly increased biofilm production, from 1.6 to 2.4 times. Such effects lead to the emergence of *P. aeruginosa* strains that are more prone to establishing chronic infections. Additional proof of this is the more frequent appearance of SCV colonies after infection with Pf phage, but also decreased virulence that can make the infections less severe.
- Filamentous phages have the potential to re-sensitize newly infected strains to antibiotics, such as tetracycline, ceftazidime and streptomycin, offering a promising therapeutic option. Also, these phages, since here characterized in details, can be considered for other phage based techniques (detection of *P. aeruginosa*, phage typing, phage display etc).

The results clearly indicate that the examined Pf phages contribute to bacterial virulence and evolution, have many unique properties and possess great potential for various application, so they deserve further research.

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА: VIII ASSESSMENT OF THE METHOD OF PRESENTATION AND INTERPRETATION OF RESEARCH RESULTS:

Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.

Explicitly state a positive or negative assessment of the way research results are presented and interpreted.

Кандидат Дамир Гаврић је у тези је успешно обрадио и објединио у логичке целине велики број добијених резултата. Експерименти су стручно и темељно испланирани и јасно структурисани. Извршена је одговарајућа статистичка обрада добијених података. Резултати истраживања су логички и аналитички приказани и протумачени уз аргументовано и критичко упоређивање са актуелним литературним подацима и резултатима других аутора. На основу детаљне и научно утемељене дискусије изведени су закључци који дају одговоре на циљеве постављене у пријави ове докторске дисертације. Комисија позитивно оцењује начин приказа и тумачења резултата истраживања.

<p>In this thesis, candidate Damir Gavrić successfully processed and consolidated a large number of obtained results into logical units. Experiments are expertly and thoroughly planned and clearly structured. Appropriate statistical processing of the obtained data was performed. The research results are logically and analytically presented and interpreted with an argumentative and critical comparison with current literature data and the results of other authors. Based on a detailed and scientifically based discussion, conclusions were drawn that provide answers to the goals set in the application of this doctoral dissertation. The Commission positively evaluates the way the research results are presented and interpreted.</p>
<p>IX KOHACHNA OЦENA ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ: IX FINAL ASSESSMENT OF THE DOCTORAL DISSERTATION:</p> <p>Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање: Explicitly state whether or not the dissertation was written in accordance with the stated explanation, as well as whether it contains or does not contain all essential elements. Give clear, precise and concise answers to questions 3 and 4:</p>
<p>1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме? Комисија закључује да је ова дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме. 1. Is the dissertation written in accordance with the explanation given in the application of the topic? The committee concludes that this dissertation was written in accordance with the explanation stated in the application of the topic.</p>
<p>2. Да ли дисертација садржи све битне елементе? Комисија закључује да ова дисертација садржи све битне елементе: целовит увод и преглед досадашњих литературних података и постојећих истраживања, дефинисан проблем и циљеве истраживања, јасан и систематичан приказ приказа методологије рада, адекватан и студиозан приказ добијених резултата и научно засновану анализу и дискусију. На основу добијених резултата закључци су разумљиво, јасно и правилно изведени. У списку литературе налазе се све литературне јединице које су цитиране у тексту дисертације. 2. Does the dissertation contain all essential elements? The commission concludes that this dissertation contains all the essential elements: a complete introduction and review of previous literature data and existing research, a defined problem and research objectives, a clear and systematic presentation of the methodology of the work, an adequate and studious presentation of the obtained results and scientifically based analysis and discussion. Based on the obtained results, the conclusions were clearly, clearly and properly drawn. The list of references contains all literature units that are cited in the text of the dissertation.</p>
<p>3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци? Комисија сматра да добијени резултати, те научно образложени закључци дају оригиналан допринос научном истраживању у области Микробиологије (Вирусологије) из више разлога. Досадашња истраживања на филаментозним бактериофагима бактерије <i>P. aeruginosa</i> су била уско везана за Pf1 и Pf4 бактериофаге – Pf1 је коришћен као модел за утврђивање морфологије ових фага, док је Pf4 разматран у контексту формирања биофилма. Међутим, улога Pf фага специфичних за <i>P. aeruginosa</i>, који су заступљени у великом броју генома ове бактерије, нису разматрани са других аспеката, а неки фаги нису проучени уопште. Стога су добијени резултати изузетно значајни са аспекта потпунијих сазнања о биологији ове групе бактериофага као и њихове интеракције са <i>P. aeruginosa</i>. Развијена је метода за умножавање ових фага, што олакшава будућа истраживања у области. Резултати имају и таксономски значај јер је утврђено постојање још једног рода у оквиру фамилије <i>Inoviridae</i>. Резултати указују на изражену индубилност Pf бактериофага у присуству антимикробних агенаса и облигатно литичких фага што је значајно са аспекта примене антибиотске терапије или терапије фагима. На крају, резултати тезе указују на значајне промене у фенотипу <i>P. aeruginosa</i> након инфекција Pf филаментозних фага које доприносе настанку мање вирулентних сојева, који слабије продукују токсине и који су склони успостављању хроничних инфекција са израженом продукцијом биофилма.</p>
<p>Напомена: докторска дисертација је прошла проверу оригиналности применом софтвера за детекцију плагијаризма iThenticate, који је показао да “similarity index” износи 30%. Сличност са</p>

радовима у којима је кандидат први аутор или коаутор је 14,34%, а 7,01% су устаљене фразе које су препознате као плагиризам ("*P. aeruginosa*", "et al. година", "schematic representation", називи комплета за изолацију ДНК, РНК, РТ-ПЦР и њихових произвођача, састав хранљивих подлога и компоненте пуфера, СДС-ПАГЕ и сл, "statistically significant difference", димензије вириона и друге бројчане вредности које нису резултати итд.). Такође је важно нагласити да је значајан проценат ових сличности установљен са литературом која није релевантна за тему докторске дисертације. Остале сличности, које се односе на сличност са ауторским делом текста саме тезе и релевантне литературе, износе 8.65%, тако да је задовољен критеријум оригиналности докторске дисертације.

3. How is the dissertation an original contribution to science?

The commission believes that the obtained results and scientifically explained conclusions make an original contribution to scientific research in the field of Microbiology (Virusology) for several reasons. Previous research on filamentous bacteriophages of *P. aeruginosa* was closely related to Pf1 and Pf4 bacteriophages - Pf1 was used as a model to determine the morphology of these phages, while Pf4 was considered in the context of biofilm formation. However, the role of Pf phages specific to *P. aeruginosa*, which are represented in a large number of genomes of this bacterium, have not been considered from other aspects, and some phages have not been studied at all. Therefore, the obtained results are extremely significant from the aspect of more complete knowledge about the biology of this group of bacteriophages as well as their interaction with *P. aeruginosa*. A method for multiplying these phages has been developed, which facilitates future research in the field. The results also have taxonomic significance, as the existence of another genus within the *Inoviridae* family was established. The results indicate a pronounced inducibility of Pf bacteriophage in the presence of antimicrobial agents and obligate lytic phages, which is significant from the aspect of application of antibiotic therapy or phage therapy. Finally, the results of the thesis indicate significant changes in the phenotype of *P. aeruginosa* after infection with Pf filamentous phages, which contribute to the emergence of less virulent strains, which produce less toxins and are prone to establish chronic infections with pronounced biofilm production.

Note: the doctoral dissertation was checked for originality using iThenticate plagiarism detection software, which showed that the "similarity index" is 30%. The similarity with published articles in which the candidate is the first author or co-author is 14.34%, and 7.01% are established phrases that are recognized as plagiarism ("*P. aeruginosa*", "et al. year", "schematic representation", names of DNA and RNA isolation kits, RT-PCR kit and their manufacturers, composition of nutrient media and buffer components, SDS-PAGE, etc., "statistically significant difference", virion dimensions and other numerical values that are not results, etc.). It is also important to emphasize that a significant percentage of these similarities were established with literature that is not relevant to the topic of the doctoral dissertation. Other similarities, which refer to the similarity with the author's part of the text of the thesis itself and the relevant literature, amount to 8.65%, so that the criterion of originality of the doctoral dissertation is satisfied.

4. Који су недостаци дисертације и какав је њихов утицај на резултат истраживања?

4. What are the shortcomings of the dissertation and what is their impact on the research result?

Комисија сматра да дисертација нема недостатака, јер су испуњени задати циљеви истраживања и добијени су резултати који представљају оригиналан и значајан допринос у области Микробиологије.

The committee believes that the dissertation has no flaws, because the set research goals were met and results were obtained that represent an original and significant contribution in the field of Microbiology.

X ПРЕДЛОГ:

X PROPOSAL:

На основу наведеног, комисија предлаже:

Based on the above, the commission proposes:

а) да се докторска дисертација прихвати, а кандидату одобри одбрана;

На основу наведеног, Комисија предлаже да се прихвати позитивна оцена докторске дисертације под насловом „Филаментозни бактериофаги врсте *Pseudomonas aeruginosa*“ и да се кандидату Дамир Гаврић одобри одбрана.

a) that the doctoral dissertation is accepted, and the candidate is granted a defense;

On the basis of the above, the Commission proposes to accept a positive evaluation of the doctoral dissertation entitled "Filamentous bacteriophages of the species *Pseudomonas aeruginosa*" and to grant the defense to the candidate Damir Gavrić.

У Новом Саду (in Novi Sad)

1. _____

др Верица Алексић Сабо, доцент
Dr. Verica Aleksić Sabo, assistant professor
Природно-математички факултет,
Faculty of Sciences,
Универзитет у Новом Саду, председник
University of Novi Sad, president

2. _____

др Петар Кнежевић, редовни професор
Dr. Petar Knežević, full professor
Природно-математички факултет,
Faculty of Sciences,
Универзитет у Новом Саду, председник
University of Novi Sad, president

3. _____

др Малгоржата Лобоцка, редовни професор
Dr. Małgorzata Łobocka, full professor
Институт за биохемију и биофизику Пољске
академије наука у Варшави, члан
Institute of Biochemistry and Biophysics of the Polish
Academy of Sciences in Warsaw, member

НАПОМЕНА: Члан комисије који не жели да потпише извештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извештај образложење односно разлоге због којих не жели да потпише извештај и да исти потпише.

NOTE: A member of the commission who does not want to sign the report because he does not agree with the opinion of the majority of the commission members, is obliged to enter in the report the explanation or the reasons for which he does not want to sign the report and to sign it.