

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На II редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 13.11.2020. године, на основу молбе ментора др Бранка Јовчића, редовног професора Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације докторанда **Милке Ј. Малешевић**, истраживача сарадника Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, под насловом: „**Идентификација и карактеризација биогених утишивача међућелијске комуникације врсте *Pseudomonas aeruginosa***“, у саставу:

1. др Бранко Јовчић, редовни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет, ментор;
2. др Јелена Лозо, ванредни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет, члан;
3. др Наталија Половић, ванредни професор, Универзитет у Београду - Хемијски факултет, члан;
4. др Немања Станисављевић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, члан.

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

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Милке Ј. Малешевић под насловом „Идентификација и карактеризација биогених утишивача међућелијске комуникације врсте *Pseudomonas aeruginosa*“ представља оригинално истраживање које за тему има потрагу за биогеним утишивачима међућелијске комуникације бактерија, њихову идентификацију као и функционалну карактеризацију на модел систему бактерије *Pseudomonas aeruginosa*.

Ова докторска дисертација реализована је у Лабораторији за молекуларну микробиологију Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, у оквиру пројекта „Изражавање гена и молекуларних механизма у основи пробиотичке активности бактерија млечне киселине изолованих са подручја Западног Балкана (ОИ 173019)“. Један део експеримената урађен је на Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Napoli Federico II, Напуљ, Италија.

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, Списак скраћеница, Текст по поглављима и Списак литературе. Докторска дисертација написана је на 134 странице (проред 1), садржи 29 слика и 9 табела. Дисертација је подељена на 8 поглавља: **Увод** (2-20 страна); **Циљеви истраживања** (22 страна); **Материјал и методе** (24-47 страна); **Резултати** (49-77 страна); **Дискусија** (79-90 страна); **Закључци** (91-93 страна); **Литература** (95-123 страна); **Прилози** (125-134 страна). Поред наведеног, приложени су: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације, Изјава о коришћењу, као и научни радови објављени у научним часописима са ISI листе, који су директно проистекли из дисертације.

Анализа докторске дисертације

Поглавље **Увод** докторске дисертације садржи осам потпоглавља. У њему су сажето приказани подаци из литературе који су непосредно повезани са темом докторске дисертације.

У потпоглављу „*Pseudomonas aeruginosa* - идентификација и етимологија“ представљени су први историјски подаци о бактеријској врсти *Pseudomonas aeruginosa*, о њеном називу и класификацији.

У потпоглављу „Општа својства *P. aeruginosa*“ описане су основне морфолошке, физиолошке, биохемијске и генетичке карактеристике врсте *P. aeruginosa*. Истакнуто је да способност коришћења великог броја нутријената овом микроорганизму омогућава колонизацију веома различитих еколошких ниша као и широку распрострањеност у окружењу. Поред тога, наведено је да најновији подаци добијени мета-анализом указују да су представници врсте *P. aeruginosa* најраспрострањенији на стаништима уско повезаним са људском активношћу.

У потпоглављу „*P. aeruginosa* као узрочник инфекција“ истакнуто је да ова врста заузима водеће место међу Грам-негативним патогенима као узрочник бројних акутних и хроничних болничких инфекција. Поред тога, *P. aeruginosa* је узрочник инфекција и ван болничких установа, али у знатно мањој мери. За изузетну патогеност *P. aeruginosa* заслужни су бројни механизми резистенције на антибиотике као и поседовање читавог арсенала фактора вируленције. Истакнуто је да је врста *P. aeruginosa* позиционирана на листу патогена, који представљају највећу опасност по јавно здравље (ESKAPE патогени).

Потпоглавље „Механизми резистенције на антибиотике врсте *P. aeruginosa*“ односи се на опис три типа резистенције на антибиотике врсте *P. aeruginosa*, механизме резистенције и класе антибиотика на које овај микроорганизам показује резистенцију.

У оквиру потпоглавља „Фактори вируленције врсте *P. aeruginosa*“ истакнут је значај фактора вируленције као важне стратегије преживљавања патогена, која им омогућава одбрану од имунског система домаћина и за резултат има напредовање патогенезе. Затим је детаљно објашњена улога међућелијске комуникације бактерија као универзалне појаве која је од

суштинске важности за интеракцију бактерија у ниши коју насељавају, у сврху међусобне конкуренције као и интеракције са вишећелијским организмима. Наведени су принципи који се налазе у основи свих до сада описаних *quorum sensing* (QS) система, сигнални молекули карактеристични за протеобактерије као и механизам њиховог транспорта кроз бактеријску ћелију. Ово потпоглавље садржи документоване податке о четири хијерархијски уређена QS система која овом патогену омогућавају флексибилност у регулацији експресије гена укључених у вируленцију, формирање биофилма, продукцију секундарних метаболита и фактора који имају улогу у заштити од имунског система домаћина. Затим, детаљно су описане компоненте QS система врсте *P. aeruginosa*, главни чиниоци, улога сваког од система у патогенези ове бактеријске врсте као и њихова хијерархијска организација. Наведени су и основни подаци о најзначајнијим факторима вируленције *P. aeruginosa* - еластаза, рамнолипида и пиоцијанина као и њихова улога у биолошким системима. Осим тога детаљно су представљена знања о биофилму, његовој просторној и временској организацији као и о догађајима који се налазе у основи формирања биофилма. Наглашен је значај формирања биофилма врсте *P. aeruginosa* у успостављању хроничних инфекција, прогресији болести и дуготрајној перзистенцији.

Потпоглавље „Терапија заснована на инхибицији патогености бактерија - антивирулентна терапија“ даје осврт на изузетан значај антибиотика у области медицине, као и последице њихове погрешне употребе, претеране употребе и злоупотребе, наглашавајући неопходност развоја нових стратегија које би обезбедиле одрживу и дугорочну ефикасност у борби против инфекција изазваних патогеним бактеријама резистентним на антибиотике. Истакнут је значај антивирулентне терапије као обећавајуће стратегије која за циљ свог деловања има ћелијске процесе бактерија одговорне за вируленцију и патогеност. Наведена је предност ове терапије у односу на традиционалну, антибиотску терапију. Затим су детаљно литературно поткрепљени подаци о инхибиторима QS система и о ензимској деградацији QS сигналних молекула, о њиховој природи, механизму деловања као и о њиховој потенцијалној примени у антивирулентној терапији. Напоследку су представљени конкретни примери употребе QQ (енг. *quorum quenching*) утишивачких молекула и њихов значај, нарочито као део комбиноване терапије.

Потпоглавље „*Delftia tsuruhatensis*“ садржи основне карактеристике ове бактеријске врсте, као и њен нарастајући значај као патогена одговорног за повећано изазивање инфекција код људи, нарочито у болничким условима. Осим тога, наведен је пример остваривања антивирулентног потенцијала *D. tsuruhatensis* на модел систему *P. aeruginosa*.

У оквиру „*Burkholderia cephacia*“ потпоглавља дати су подаци о значају ове бактеријске врсте како у биотехнологији тако и као значајног патогена биљака, животиња и људи. Истакнуто је да *B. cephacia* остварује веома комплексне односе са *P. aeruginosa* указујући да је исход ових односа веома сложен и зависан од мноштва фактора. Додатно, у овом потпоглављу појашњена је улога QS система у патогенези врста припадника *Burkholderia cephacia* комплекса као и податак о истовременом поседовању QS и QQ система код *B. cephacia*, али и акценат на

недостатку детаљних података о QQ потенцијалу *B. ceracia* у контексту улоге QQ молекула у чишћењу и рециклирању сопствених QS сигнала, као и у смањењу вирулентног потенцијала других клиничких патогена.

У поглављу **Циљеви истраживања** јасно су дефинисани главни научни циљеви докторске дисертације. Кроз шест постављених циљева планирана је селекција Грам-негативних клиничких изолата из колекције микроорганизама Лабораторије за молекуларну микробиологију који испољавају QQ фенотип; затим секвенцирање и *in silico* анализа целокупних генома одабраних сојева носиоца QQ фенотипа. Следећи циљ био је да уколико се утврди да је биоактивни молекул непротеинске природе, неопходно је приступити његовој екстракцији и биохемијској карактеризацији; уколико се установи да је QQ молекул протеинске природе циљ је клонирање и експресија гена који кодирају QQ ензим(е). Следећи постављени циљ био је функционална карактеризација QQ молекула и испитивање њиховог антивирулентног потенцијала на модел систему клиничког изолата *P. aeruginosa* MMA83 и, коначно, испитивање нивоа цитотоксичности који остварују QQ молекули на ћелијској линији хуманих кератиноцита.

У поглављу **Материјал и методе** описане су савремене методе микробиологије, молекуларне генетике, биохемије и биоинформатике коришћене у реализацији постављених циљева. Ово поглавље чини 20 потпоглавља у којима су описани бактеријски изолати, плазмиди и конструкти као и детаљни методолошки поступци коришћени у овој тези. У првом потпоглављу наведена је листа бактеријских сојева и деривата као и коришћених и конструисаних плазида. Потом су наведени медијуми коришћени за култивацију бактерија (у присуству или одсуству одговарајућих антибиотика), као и услови раста (температура, аерација). Потом су описане методе „Селекција изолата са *quorum quenching* (QQ) активношћу“ и „Селекција изолата са *quorum sensing* (QS) фенотипом“. Након описане припреме непречишћеног екстракта QQ молекула течно-течном екстракцијом и накндним концентровањем под сниженим притиском, следи преглед метода рада са ДНК молекулима бактерија које укључују изолацију укупне и изолацију плазмидне ДНК, затим сечење ДНК рестрикционим ензимима, лигацију и умножавање ДНК фрагмената методом ланчане полимеризације (PCR), секвенцирање ДНК фрагмената и целокупних генома. У потпоглављу „Генетичке манипулације“ описане су методе клонирања гена који кодирају QQ ензиме и конструкција промоторских фузија. Потом су описане методе припреме и трансформације *E. coli* компетентних ћелија, трипарентална коњугација и β -галактозидазни есеј. У следећа два потпоглавља описане су методе рада са протеинима (експресија и пречишћавање рекомбинантних протеина у денатуришућим условима, мерење концентрације протеина, електрофореза протеина на полиакриламидном гелу) и РНК молекулима бактерија (изолација и пречишћавање бактеријске РНК, реверзна транскрипција и квантитативни PCR у реалном времену). У потпоглављу „Функционална карактеризација *D. tsuruhatensis* 11304 QSI екстракта и *B. ceracia* BCC4135 QQ ензима на модел систему *P. aeruginosa* MMA83“ описане су методе за испитивање утицаја биоактивних молекула на формирање биофилма (кристал виолет бојење, флуоресцентна микроскопија), на продукцију еластазе, пиоцијанина и рамнолипида као и

ефекат комбинације *D. tsuruhatensis* 11304 QSI екстракта и антибиотика на раст *P. aeruginosa* MMA83. Потпоглавље „Биохемијске методе“ садржи описане биохемијске методе коришћене за пречишћавање и композициону анализу *D. tsuruhatensis* 11304 QSI екстракта (танкослојна хроматографија, матрицом потпомогнута ласерска десорпција/јонизација) као и супстратну специфичност *B. ceracia* ВСС4135 QQ ензима за различите *N*-ацил хомосерин лактоне (течна хроматографија високих перформанси). Потпоглавље „Испитивање цитотоксичног ефекта *B. ceracia* ВСС4135 лактоназа на ћелијској линији хуманих кератиноцита“ посвећено је поступку третмана хуманих НаСаТ кератиноцита са *B. ceracia* ВСС4135 лактоназама и утврђивању нивоа цитотоксичности употребом есеја којим се мери активност лактат дехидрогеназе. Потпоглавље „Биоинформатичке анализе“ чини опис биоинформатичких алата и софтверских пакета коришћених за анализу нуклеотидних секвенци, анализу целокупних генома, филогенетску анализу QQ ензима и анализу присуства сигналне секвенце пептида. У последњем потпоглављу „Статистичка обрада података“ наведени су програми и тестови коришћени за обраду резултата добијених у овој тези.

У поглављу **Резултати** представљени су резултати добијени у овом истраживању. У првом делу претражена је лабораторијска колекција коју чине 633 Грам-негативна клиничка изолата од којих је селектовано 19 сојева носиоца QQ фенотипа. На основу иницијалне претраге употребом *Chromobacterium violaceum* CV026 биосензора, издвојена су два изолата *Delftia* sp. 11304 и *Burkholderia* sp. ВСС4135 за детаљну карактеризацију. Установљена је зависност испољавања QQ фенотипа од фаза раста бактеријске културе код оба анализирана изолата, при чему је максимум активности забележен у касној логаритамској (*Burkholderia* sp. ВСС4135), односно стационарној фази раста (*Delftia* sp. 11304). Поред детектовања присуства QQ феномена, установљено је да сој *Burkholderia* sp. ВСС4135 поседује и QS фенотип, чије је испољавање такође условљено фазом раста бактеријске културе. Утврђено је да *Delftia* sp. 11304 сој припада *Delftia tsuruhatensis* врсти док *Burkholderia* sp. ВСС4135 припада *Burkholderia ceracia* врсти са новим секвенцим типом ST1485. *In silico* анализом геномских секвенци установљено је да оба соја поседују изузетан потенцијал вируленције и резистенције на антимикробна једињења. Такође, *in silico* анализом аотираног генома ВСС4135 утврђено је присуство гена који кодирају две *N*-ацил хомосерин (АХЛ) лактоназе означене као YtnP и Y2-aiiA. Осим тога, претрагом геномске секвенце детектован је QS кластер гена који садржи *anoI* ген који кодира АХЛ синтазу, *anoR* ген који кодира транскрипциони активатор и неколико гена који кодирају протеине за избацавање хомосерин лактона (хомосерин лактон ефлуks протеини). Филогенетском анализом установљено је да оба ензима припадају суперфамилији метало- β -лактамаза и деле око 40% идентичности аминокиселинске секвенце са филогенетски најсроднијим до сада описаним АХЛ лактоназама, док међусобно деле идентичност од 37%. Предикционом анализом установљено је да Y2-aiiA лактоназа поседује сигналну секвенцу за експорт на *N*-терминусу, те је стога претпостављено да је у питању екстрацелуларни ензим. Експресија и пречишћавање *B. ceracia* ВСС4135 лактоназа извршена је у денатуришућим/ренатуришућим условима у градијенту урее 8 М - 0 М на Ni-NTA агарозној афинитетној хроматографији.

У оквиру потпоглавља „Својства биоактивних молекула“ изнети су резултати испитивања природе биоактивних молекула; установљено је да 11304 продукује мале молекуле непротеинске природе (QS инхибиторе, QSI), док ВСС4135 продукује QQ ензиме. Такође, уочена је значајна термостабилност QSI молекула након излагања 11304 соја температури од 100°C. Од коришћених органских растварача једино је етил-ацетатни екстракт супернатанта соја *D. tsuruhatensis* 11304 показао QSI активност. Испитивањем термостабилности ВСС4135 лактоназа установљено је да YtnP и Y2-aiiA задржавају релативно висок ниво активности након третмана на температурама у опсегу од 30 до 60°C за YtnP и од 30 до 50°C за Y2-aiiA лактоназу. Оптимална активност достигнута је на 40°C за обе лактоназе. Есејем биолуминисценције и течном хроматографијом високих перформанси установљено је да YtnP и Y2-aiiA рекомбинантни ензими поседују широку супстратну специфичност у погледу дужине бочних ацилних ланаца АХЛ. YtnP ензим показао је већи афинитет за АХЛ кратких и средње дугих ацилних ланаца, док је Y2-aiiA остварио значајну ефикасност у деградацији АХЛ како кратких тако и дугих ацилних ланаца, испољивши већу специфичност за АХЛ дугог ланца.

Затим је урађена функционална карактеризација биоактивних молекула на модел систему клиничког изолата *P. aeruginosa* ММА83. Установљено је да QSI екстракт соја 11304 спречава формирање али не и декомпозицију формираног биофилма, док обе рекомбинантне ВСС4135 лактоназе остварују негативан утицај на формирање биофилма, уз израженији ефекат екстрацелуларне лактоназе Y2-aiiA. Утврђен је дозно-зависан ефекат QSI екстракта на продукцију екстрацелуларних фактора вируленције еластаза, пиоцијанина и рамнолипида, а инхибиторни ефекат на формирање екстрацелуларних фактора вируленције показале су и рекомбинантне ВСС4135 лактоназе. Такође, уочено је да је осетљивост вишеструко резистентног клиничког изолата на *P. aeruginosa* ММА83 на меропенем и гентамицин повећана кроз синергистичко деловање са примењеним антибиотцима. Антивирулентни потенцијал 11304 QSI екстракта и ВСС4135 рекомбинантних лактоназа потврђен је и на транскрипционом нивоу, при чему је забележен њихов утицај на смањење експресије гена који чине део *las*, *rhl* и *pqs* QS мреже врсте *P. aeruginosa*. Анализом активности промотора *ytnP* и *y2-aiiA* гена који кодирају ВСС4135 лактоназе, кандидаткиња је установила зависност активности промоторских фузија од фазе раста бактеријске културе, а констатовано је такође да је експресија гена који кодирају *B. ceratonia* ВСС4135 QQ лактоназе регулисана на исти начин као и активност њихових промотора - зависно од фазе раста бактеријске културе. Резултати су показали да ниједна од рекомбинантних лактоназа соја ВСС4135 не остварује цитотоксичан ефекат на ћелијску линију НаСаТ хуманих кератиноцита.

На основу анализе састава QSI екстракта установљен је висок садржај *N*-ацил хомосерин лактона дугог бочног ацилног ланца од C12 до C18 атома. Најзаступљенији је био *N*-октадеканоил хомосерин лактон (C18-ХСЛ), а осим тога, први пут је у биолошком узорцима детектовано присуство дихидрокси-*N*-октадеканоил хомосерин лактона (дихидрокси-C18-ХСЛ). Третман *P. aeruginosa* ММА83 комерцијалним C18-ХСЛ резултирао је смањењем продукције пиоцијанина и експресије *lasI* (QS) гена.

Поглавље **Дискусија** посвећено је упоредној анализи резултата добијених у овој дисертацији и података документованих у досадашњој научној литератури. У овом поглављу истакнут је значај и допринос постигнутих резултата како у области фундаменталне молекуларне микробиологије, тако и у области истраживања биолошких и биохемијских карактеристика молекула кандидата за антивирулентну терапију инфективних болести.

У првом делу дискусије кандидаткиња је дала осврт на забрињавајуће стање услед све учесталије појаве вишеструко резистентних бактеријских изолата међу клинички значајним бактеријским врстама настало као последица прекомерне употребе и злоупотребе антибиотика. Истакнуто је да је све учесталија појава вишеструко резистентних и екстремно резистентних клиничких изолата *P. aeruginosa* усмерила актуелна истраживања ка алтернативним терапеутским приступима и примени молекула који за циљ имају утишавање међућелијске комуникације. Такође, наглашено је да је полазна основа овог истраживања била да нове, потенцијално ефикасне QQ молекуле могуће тражити међу микроорганизмима који током инфекције домаћина деле исту еколошку нишу са *P. aeruginosa*, имајући у виду да овај патоген користи различите стратегије (кооперативне, компетитивне) у сврху освајања различитих ниша. У складу са тиме, у оквиру ове тезе анализирано је присуство QQ фенотипа код клиничких изолата из лабораторијске колекције. Приликом селекције, од 19 сојева носиоца QQ фенотипа, издвојила су се два изолата *Delftia* sp. 11304 и *Burkholderia* sp. BCC4135 која су на основу иницијалне анализе показала најбоље резултате. За разлику од претходних студија у којима су као модел системи за испитивање антивирулентног потенцијала QSI и QQ молекула коришћени лабораторијски сојеви *P. aeruginosa* PAO1 и PA14, антивирулентни потенцијал QSI/QQ молекула у овој студији испитан је на клиничком изолату *P. aeruginosa* MMA83, соју од великог клиничког значаја, чији је фенотип у корелацији са тешким исходом инфекције.

У потпоглављу „*Delftia tsuruhatensis* 11304 је извор QSI молекула“ истакнут је нарастајући значај *Delftia tsuruhatensis* врсте као хуманог патогена као и чињенице да су геномски подаци о овој бактеријској врсти веома оскудни. Стога је немогуће са сигурношћу говорити о пореклу *D. tsuruhatensis* 11304 анализираним у овој студији, било да је он пореклом из болничке средине или је у питању средински изолат који је у болничку средину унет посредством пацијента. Оно што указује на могући вирулентни фенотип и сам клинички значај овог изолата јесте присуство генетичких детерминанти вируленције и резистенције на антибиотике, што би могло допринети свеукупном патогеном потенцијалу овог соја и пружити увид у генетичку основу патогености *D. tsuruhatensis* уопште. Истакнуто је да, иако у литератури постоји податак о QQ потенцијалу *D. tsuruhatensis* врсте, окарактерисано једињење (диизооктил естар 1,2 бензендикарбоксилне киселине) познато је као врло проблематичан контаминант лабораторијских узорака. Након испитивања комерцијално доступних једињења у широком опсегу концентрација, установљено је да не остварују QSI активност, што је дало основу за даље истраживање. Укупни етил-ацетатни екстракт (QSI екстракт) *D. tsuruhatensis* 11304 показао је изванредну способност утишавања QS система клиничког изолата *P. aeruginosa* MMA83, редукујући његов вирулентни фенотип кроз смањење способности формирања биофилма и продукције екстрацелуларних фактора вируленције еластаза,

пиоцијанина и рамнолипида на дозно-зависан начин и у складу је са претходно документованим истраживањима о антивирулентном ефекту различитих QSI екстраката. Међутим, резултати овог истраживања показали су да нарушавање структуре већ формираног биофилма није постигнуто применом QSI екстракта, што би могло указивати на непропустљивост матрикса биофилма за активне компоненте екстракта као и на другачији механизам деловања *D. tsuruhatensis* 11304 QSI екстракта на QS систем *P. aeruginosa* MMA83. Антивирулентни ефекат 11304 QSI екстракта потврђен је и кроз значајно смањење експресије аутоиндуцер синтазе и транскрипционог активатора сва три анализирани QS система *P. aeruginosa* - *las*, *rhl* и *pqs*. Будући да 11304 QSI екстракт доводи до промена на нивоу транскрипције, кандидаткиња је образложила да би један од претпостављених механизма деловања биоактивних молекула из QSI екстракта могао бити посредством њихове антагонистичке активности. Имајући у виду да добијени резултати показују да је осетљивост клиничког изолата *P. aeruginosa* MMA83 на меропенем и гентамицин знатно повећана кроз синергистичко деловање 11304 QSI екстракта са примењеним антибиотцима, указује да би активне компоненте из екстракта могле имати примену у комбинованој терапији. Узевши у обзир да су у саставу 11304 QSI екстракта присутни АХЛ дугог ланца, са доминантном заступљеношћу C18-ХСЛ и по први пут идентификованог дихидрокси-C18-ХСЛ из узорка биолошког порекла, могла би се направити аналогија са претходно описаним *C. violaceum* CV026 QS системом, будући да *P. aeruginosa* не продукује АХЛ чији су бочни ланци дужи од C12 атома. Додатно, ограничени ефекат комерцијалног C18-ХСЛ у односу на антивирулентну активност укупног QSI екстракта, указује да би анти-QS деловање могло бити последица здружене активности већег броја компонената пореклом из 11304 QSI екстракта.

Трећи део Дискусије посвећен је анализи антивирулентног потенцијала QQ лактоназа пореклом из клиничког изолата *Burkholderia cepacia* BCC4135. Истакнута је прилагодљивост ове бактеријске врсте на различите еколошке нише захваљујући њеном генетичком потенцијалу, нутритивној разноликости и хетерогеним физиолошким својствима. *In silico* анализом геномске секвенце BCC4135 установљено је да овај клинички изолат поседује значајан број гена који припадају резистому и вирулентности, што указује на могућа адаптабилна својства овог соја на болничку средину и домаћина. Имајући у виду да *B. cepacia* BCC4135 припада новом секвенцном типу ST1485, кандидаткиња је образложила да би ово могао бити нови сој у болничком окружењу и да је доспео из спољашње средине, или да претходно није детектован услед одсуства патогених својстава и немогућности да узрокује клинички значајне инфекције. Потом је дат осврт на улогу мултиспецијских социјалних интеракција у обликовању патогеног потенцијала *P. aeruginosa* и однос ове бактеријске врсте са *B. cepacia* кроз већи број наведених примера из литературе. То је уједно била и полазна хипотеза да током инфекције *B. cepacia* успева да се избори за исту нишу са *P. aeruginosa* посредством утишавања QS система свог противника. Ова претпоставка потврђена је идентификацијом две QQ лактоназе пореклом из клиничког изолата *B. cepacia* BCC4135 које су показале обећавајући антивирулентни потенцијал. Филогенетском анализом установљено је да YtnP и Y2-aiiA деле око 40% са филогенетски најсроднијим АХЛ лактоназама, што потврђује велики диверзитет ове групе

ензима. Битно је истаћи такође да, иако у јавно доступним базама података постоје депоноване секвенце претпостављених QQ лактоназа пореклом из *Burkholderia* врста, оне су по први пут експримиране и експериментално валидиране у оквиру ове студије. Пречишћавање YtnP и Y2-aiiA рекомбинантних протеина применом денатуришућих/ренатуришућих услова у градијенту урее, познато је као веома успешна стратегија, која је често предлагана у методолошким студијама. У погледу отпорности на више температуре, оба QQ ензима показала су умерену термостабилност, која је ипак значајна, имајући у виду да је већина до сада идентификованих термостабилних АХЛ лактоназа изолована из термофилних бактеријских врста. Различитост у супстратној специфичности и ефикасности деградације АХЛ указује на последицу различите локализације и функције ВСС4135 лактоназа. Претпостављено је да би интрацелуларна YtnP лактоназа могла бити укључена у контролу сопствених АХЛ сигнала, док би екстрацелуларна Y2-aiiA услед шире супстратне специфичности могла бити укључена у одговор на QS сигнале других бактерија из окружења. Уочена зависност новог експресије гена и промоторске активности *B. ceracia* ВСС4135 гена који кодирају лактоназе од фаза раста бактеријске културе може указивати на различите метаболичке активности и регулацију ових лактоназа у QQ/QS мрежи *B. ceracia*. Ова сазнања у складу су са до сада објављеним литературним подацима који указују да експресија АХЛ лактоназа може бити строго регулисана. Сумирањем резултата функционалне карактеризације QQ ензима анализираних у оквиру ове тезе, може се закључити да обе лактоназе имају значајан терапеутски потенцијал остварен кроз смањење патогености *P. aeruginosa*. Установивши да *B. ceracia* ВСС4135 рекомбинантне лактоназе поседују најзначајније својство у медицинској примени - одсуство цитотоксичности на ћелије човека, селекује ове ензиме као добре кандидате за потенцијалну примену у клиничкој пракси. Најзад, у оквиру ове тезе установљено је да *B. ceracia* ВСС4135 користи глобалну регулаторну QS мрежу SerI/R (ApoI/R) високо конзервисану међу Бцк врстама за управљање сопственим вирулентним потенцијалом уз претпоставку да врши ауторегулацију QQ/QS мреже кроз различиту експресију и активност YtnP и/или Y2-aiiA лактоназа.

У последњем делу Дискусије сумирано су изнети подаци добијени у овој тези, још једном је појашњена биолошка улога и терапеутски потенцијал биоактивних QSI и QQ молекула пореклом из *D. tsuruhatensis* 11304 и *B. ceracia* ВСС4135 клиничких изолата. Такође, наглашен је значај ове студије у сагледавању комплексних односа унутар полимикробне заједнице патогених бактерија кроз конкуритивну стратегију утишавања међућелијске комуникације и потенцијалну искористивост ове стратегије у терапеутске сврхе.

У поглављу **Закључци** сажето и јасно су изнети најважнији закључци који су проистекли из анализе добијених експерименталних резултата на основу којих је потврђено да су остварени постављени циљеви и потврђене хипотезе докторске дисертације. На основу добијених резултата донето је 13 закључака који потврђују актуелност истраживања, значај добијених резултата, као и полазну основу за будућа истраживања. Појединачни закључци могу се поделити у три тематске целине. Првој групи закључака припадају они који се односе на претрагу колекције Грам-негативних клиничких патогена Лабораторије за молекуларну микробиологију за присуством утишивачког фенотипа као и одабир два клиничка изолата за

детаљнију карактеризацију, секвенцирање њихових генома и утврђивање вирулентног потенцијала селектованих изолата. Другој групи закључака припадају они који се односе на карактеризацију QSI екстракта *Delftia tsuruhatensis* 11304 на модел систему клиничког изолата *P. aeruginosa* MMA83 као и утврђивање састава QSI екстракта. Закључено је да се у саставу QSI екстракта поред N-ацил хомосерин лактона дугог ланца од C12-C18 атома, налази дихидрокси-N-октадеканойл хомосерин лактон који је по први пут идентификован из узорка биолошког порекла. У трећој групи закључака истакнут је утишивачки потенцијал клиничког изолата *Burkholderia cepacia* BCC4135, наведена је генетичка основа QQ система као и антивирулентна својства на модел систему *P. aeruginosa* MMA83. Поред тога, претпостављена је различита биолошка улога YtnP и Y2-aiiA лактоназа.

У поглављу **Литература** представљена је листа коју чине 322 библиографске јединице. Цитирани литературни подаци су актуелни и омогућили су развој идеје са циљем извођења овог истраживања, као и објашњење добијених резултата и доношење закључака. Наведени извори су адекватни и покривају све појединачне области овог истраживања. Навођења литературе у самом тексту дисертације су јасна и примерена, како по садржају тако и по месту.

У поглављу **Прилози** представљено је седам прилога у оквиру којих су детаљно наведени табеларни прикази одговарајућих резултата добијених у оквиру овог истраживања.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Из ове дисертације проистекла су два рада у часописима међународног значаја, као и три саопштења на скуповима међународног и домаћег значаја.

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Malešević, M.**, Di Lorenzo, F., Filipić, B., Stanisavljević, N., Novović, K., Senerovic, L., Polović, N., Molinaro, A., Kojić, M., & Jovčić, B. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing inhibition by clinical isolate *Delftia tsuruhatensis* 11304: involvement of N-octadecanoylhomoserine lactones. *Scientific Reports*, 9, 16465. (M21)
<https://www.nature.com/articles/s41598-019-52955-3>
2. **Malešević, M.**, Stanisavljević, N., Novović, K., Polović, N., Vasiljević, Z., Kojić, M., & Jovčić, B. (2020). *Burkholderia cepacia* YtnP and Y2-aiiA lactonases inhibit virulence of *Pseudomonas aeruginosa* via quorum quenching activity, *Microbial Pathogenesis*, 149, 104561. (M22)
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S088240102030927X>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Malešević, M.**, Filipic, B., Vukotic, G., Novovic, K., Stanisavljevic, N., Mirkovic, N., Polovic, N., Kojic, M., & Jovcic, B. (2017). Novel quorum sensing inhibitors from *Achromobacter* spp. clinical isolates. 1st Congress of Molecular Biologists of Serbia (CoMBoS 2017), Beograd, Srbija, Septembar 20-22, poster, Knjiga apstrakata, p. 200. (M34)
2. **Malešević, M.**, Di Lorenzo, F., Stanisavljević, N., Novović, K., Filipić, B., Senerovic, L., Polović, N., Molinaro, A., Kojić, M., & Jovčić, B. (2020). Potential of *Delftia tsuruhatensis* clinical isolate in silencing of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and virulence. FEMS Online Conference on Microbiology 2020, Beograd, Srbija, Oktobar 28-31, poster, p. 115. (M34)

БЗ. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **Malešević, M.**, Stanisavljević, N., Polović, N., Milivojević, D., Novović, K., Filipić, B., Kojić, M., & Jovčić, B. (2018). Identifikacija novih molekula utišivača međucelijske komunikacije vrste *Pseudomonas aeruginosa*. Drugi kongres biologa Srbije, Kladovo, Srbija, Septembar 25-30. knjiga sažetaka p261. (M64)

Провера оригиналности докторске дисертације

На основу правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Идентификација и карактеризација биогених утишивача међућелијске комуникације врсте *Pseudomonas aeruginosa*“, аутора Милке Ј. Малешевић, констатовано је да утврђено подударање текста износи 27%. Овај степен подударности последица је употребе општих појмова, претходно публикованих резултата докторандових истраживања који су проистекли из његове дисертације, личних имена и назива институција, а уочена је и подударност назива бактеријских родова и врста, назива протеина и малих молекула, али и скраћеница. Све поменуто је у складу са чланом 9. Правилника и сматра се да докторска дисертација кандидаткиње Милке Ј. Малешевић представља оригинално научно дело.

Мишљење и предлог Комисије

Увидом у докторску дисертацију Милке Ј. Малешевић закључујемо да је написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме. Дисертација је урађена у складу са принципима научно-истраживачког рада и садржи све неопходне елементе научног рада. Циљеви истраживања наведени у пријави теме успешно су реализовани. Добијени резултати истраживања су прегледно и јасно приказани. Критичка дискусија резултата истраживања и литературних података дала је концизне и јасне закључке. Комисија сматра да су резултати приказани у овој дисертацији оригинално научно дело и да представљају значајан допринос области откривања нових утишивача међућелијске комуникације значајних клиничких патогена, као што је врста *Pseudomonas aeruginosa*. Недвосмислено је показан потенцијал С18-ХСЛ и АХЛ лактоназа YtnP и Y2-aiiA у смањењу транскрипције гена који кодирају факторе вируленције као и у снижавању целокупног вирулентног фенотипа на моделу клиничког изолата *P. aeruginosa* MMA83. Јединствен приступ у откривању нових утишивача, између осталог резултовао је и првим описом дихидрокси-С18-ХСЛ у биолошким узорцима, као и првим доказима о разликама у супстратној специфичности и биолошкој функцији YtnP и Y2-aiiA лактоназа.

На основу укупне оцене дисертације, увида у истраживачки рад кандидата и сагласно свим претходно изнетим чињеницама у овом Извештају, Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном Већу Биолошког факултета Универзитета у Београду прихвати позитивну оцену докторске дисертације Милке Ј. Малешевић под насловом: „Идентификација и карактеризација биогених утишивача међућелијске комуникације врсте *Pseudomonas aeruginosa*“ и одобри њену јавну одбрану.

У Београду, 13.11.2020. године

КОМИСИЈА:

др Бранко Јовчић, редовни професор,
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

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

др Наталија Половић, ванредни професор,
Универзитет у Београду - Хемијски факултет

др Немања Станисављевић, виши научни сарадник,
Универзитет у Београду -
Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство