

Биолошки факултет  
Број захтева:50/130-1  
Датум: 14. 6. 2024.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

### ЗАХТЕВ

#### за давање сагласности на одлуку о прихватању теме докторске дисертације и о одређивању ментора

Молимо да, сходно чл. 48 ст. 5 тач. 3) Статута Универзитета у Београду („Гласник Универзитета“ бр. 201/2018, 207/2019, 213/2020, 214/2020, 217/2020, 230/21, 232/22, 233/22 и 236/22), дате сагласност на одлуку о прихватању теме докторске дисертације:

**„Функционална карактеризација  $YtnP$  лактоназе *Stenotrophomonas maltophilia* и испитивање антивирулентног потенцијала на модел систему *Pseudomonas aeruginosa*”**

НАУЧНА ОБЛАСТ: Биолошке науке.

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име, име једног родитеља и презиме кандидата:

**Јована М. Ђурчић**

2. Претходно образовање (назив и седиште факултета, студијски програм):

Универзитет у Београду - Биолошки факултет.

3. Година дипломирања: 2020.

4. Година уписа на докторске студије: 2021/2022.

Универзитет у Београду - Биолошки факултет

5. Назив студијског програма докторских студија: Молекуларна биологија, модул: Молекуларна микробиологија и биотехнологија.

6. Датум подношења пријаве теме докторске дисертације: 29. 4. 2024.

## ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

### А:

Име и презиме ментора: **др Милка Малешевић,**

Звање: научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство.

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. \***Malešević, M.**, Stanisavljevic, N., Matijasevic, D., Curcic, J., Tasic, V., Tasic, S., Kojic, M. (2023) Metagenomic Analysis of Bacterial Community and Isolation of Representative Strains from Vranjska Banja Hot Spring, Serbia. *Microbial Ecology* 86(4):2344-2356. doi: 10.1007/s00248-023-02242-6. Epub 2023 May 24. PMID: 37222803. (\*заједнички рад кандидата и ментора који неће бити коришћен као рад из предложене докторске дисертације)
2. Ivanov, M., Novović, K., **Malešević, M.**, Dinić, M., Stojković, D., Jovčić, B., & Soković, M. (2022). Polyphenols as Inhibitors of Antibiotic Resistant Bacteria- Mechanisms Underlying Rutin Interference with Bacterial Virulence. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 15(3), 385. <https://doi.org/10.3390/ph15030385>
3. **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. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104561>
4. **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. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52955-3>
5. **Malešević, M.**, Vasiljević, Z., Sovtić, A., Filipić, B., Novović, K., Kojić, M., & Jovčić, B. (2017). Virulence traits associated with *Burkholderia cenocepacia* ST856 epidemic strain isolated from cystic fibrosis patients. *Antimicrobial resistance and infection control*, 6, 57. <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0215-y>

### Б:

Име и презиме ментора: **др Бранко Јовчић,**

Звање: редовни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет.

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Novović K, Kuzmanović Nedeljković S, Poledica M, Nikolić G, Grujić B, **Jovčić B**, Kojić M, Filipić B. Virulence potential of multidrug-resistant *Acinetobacter*

*baumannii* isolates from COVID-19 patients on mechanical ventilation: The first report from Serbia. *Front Microbiol.* 2023 Feb 6;14:1094184. doi: 10.3389/fmicb.2023.1094184

2. Kabic, J., Novovic, K., Kekic, D., Trudic, A., Opavski, N., Dimkic, **I., Jovcic, B.**, Gajic, I. 2023. Comparative genomics and molecular epidemiology of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21: 574-585, <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.12.045>.
3. Novovic, K., Malesevic, M., Dinic, M., Gardijan, L., Kojic, M., **Jovcic, B.** 2022. RclS Sensor Kinase Modulates Virulence of *Pseudomonas cepferum*. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(15):8232. doi: 10.3390/ijms23158232
4. **Jovcic, B.**, Malesevic, M., Kojic, M., Galic, N., Todorovic, D., Vidanovic, D., Velhner, M. 2022. Genomic Analysis of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Kentucky Isolates from Humans, Turkey, and Food in the Republic of Serbia. *Foodborne Pathogens and Disease*. doi: 10.1089/fpd.2022.0029.
5. **Jovčić, B.**, Novović, K., Filipić, B., Velhner, M., Todorović, D., Matović, K., Rašić, Z., Nikolić, S., Kiškarolj, F., Kojić, M. 2020. Genomic characteristics of colistin-resistant *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *infantis* from poultry farms in the Republic of Serbia. *Antibiotics*, 9 (12), art. no. 886, pp. 1-13. DOI: 10.3390/antibiotics9120886

Обавештамо вас да је Наставно-научно веће Универзитета у Београду-Биолошког факултета, на седници одржаној 14. 6. 2024. год. размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације јер садржи оригиналну идеју и да је од значаја за развој науке, примену њених резултата, односно развој научне мисли уопште.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Љубиша Станисављевић

Прилог:

1. Предлог теме докторске дисертације са образложењем.
2. Акт надлежног тела факултета о подобности теме за израду докторске дисертације.
3. Електронска верзија



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 16  
11000 БЕОГРАД  
Република СРБИЈА  
Тел: +381 11 2186 635  
Факс: +381 11 2638 500  
Е-пошта: dekanat@bio.bg.ac.rs

50/130 - 14. 6. 2024.

На основу члана 96. Закона о високом образовању, члана 62. став 1. тачка 12. Статута Универзитета у Београду-Биолошког факултета и члана 29. Правилника о докторским студијама на Универзитету у Београду-Биолошком факултету, бр: 15/276 од 07.09.2018; 15/122 од 14.06.2019.; 15/132 од 11.09.2020. године., Наставно-научно веће Факултета, на VIII редовној седници одржаној 14. 6. 2024. године, донело је

### О Д Л У К У

#### о прихватању теме докторске дисертације и одређивању ментора

На основу Извештаја Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације прихвата се тема докторске дисертације и одређује ментор кандидату:

**Јовани М. Ћурчић**, мастер биолог, студијског програма докторских студија: Молекуларна биологија, модул: Молекуларна микробиологија и биотехнологија, под називом:

**„Функционална карактеризација  $\Upsilon$ tnP лактоназе *Stenotrophomonas maltophilia* и испитивање антивирулентног потенцијала на модел систему *Pseudomonas aeruginosa*”**

За менторе се одређују:

1. др Милка Малешевић, научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство,
2. др Бранко Јовчић, редовни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Љубиша Станисављевић

Доставити:

- Универзитету у Београду,
- докторанту,
- ментору;
- Стручној служби Факултета

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА  
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

На VII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду одржаној 13.05.2024. године, одређени смо у Комисију за оцену испуњености услова и научне заснованости предложене теме за израду докторске дисертације **Јоване, М. Ћурчић**, под насловом: „Функционална карактеризација *YtnP* лактоназе *Stenotrophomonas maltophilia* и испитивање антивирулентног потенцијала на модел систему *Pseudomonas aeruginosa*”.

На основу поднете документације и увида у досадашњи рад **Јоване, М. Ћурчић**, Комисија подноси Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду следећи:

**ИЗВЕШТАЈ**

**А. Биографија:**

**Општи подаци:**

Име, средње слово и презиме: Јована М. Ћурчић

Датум и место рођења: 18.07.1997., Крушевац, Република Србија

**Образовање:**

**2021.** – тренутно Докторске академске студије, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, Студијски програм: Молекуларна биологија, Модул: Молекуларна биологија, Подмодул: Молекуларна микробиологија и биотехнологија

**2020.** – **2021.** Мастер академске студије, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, Студијски програм: Молекуларна биологија и физиологија, Модул: Генетичко инжењерство и биотехнологија

**2016.** – **2020.** Основне академске студије, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, Модул: Молекуларна биологија и физиологија

**Запослење:**

**2022.** – тренутно Истраживач приправник, Група за молекуларну микробиологију, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду

**Курсеви:** /

**Пројекти:** /

**Чланство у научним друштвима:**

Српско друштво за молекуларну биологију

Удружење микробиолога Србије

## Страни језици:

енглески, француски

## Посебне активности и награде:

Награда Фондације „Горан Љубијанкић“ за најбољи мастер рад из области молекуларне биологије одбрањен у 2021. години

## **Б) Библиографија:**

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Curcic, J.**, Dinic, M., Novovic, K., Vasiljevic, Z., Kojic, M., Jovcic, B., & Malesevic, M. (2024). A novel thermostable YtnP lactonase from *Stenotrophomonas maltophilia* inhibits *Pseudomonas aeruginosa* virulence in vitro and in vivo. *International Journal of Biological Macromolecules*, 130421. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130421>
2. Malesevic, M., Stanisavljevic, N., Matijasevic, D., **Curcic, J.**, Tasic, V., Tasic, S., & Kojic, M. (2023). Metagenomic analysis of bacterial community and isolation of representative strains from Vranjska Banja hot spring, Serbia. *Microbial Ecology*, 86(4), 2344-2356. doi: <https://doi.org/10.1007/s00248-023-02242-6>

Б2. Радови у часописима домаћег значаја

/

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја штампана у целости

/

Б4. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја штампана у изводу

1. **Ćurčić, J.**, Malešević, M., & Jovčić, B. (2024). A novel thermostable YtnP lactonase inhibits biofilm formation and induces decomposition of preformed *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *HEMIJSKA INDUSTRIJA (Chemical Industry)*, 78(1S), pp 61-61.
2. **Ćurčić, J.**, Malešević, M., Dinić, M., Novović, K., Vasiljević, Z., Stanisavljević, N., Jovčić, B. (2024). YtnP lactonase improves the ability of *Caenorhabditis elegans* to survive *Pseudomonas aeruginosa* MMA83 infection." XIII Congress of Microbiologists of Serbia: From biotechnology to human and planetary health. Serbian Society for Microbiology, pp 121.
3. Stanisavljević, N., Malešević, M., **Ćurčić, J.**, Matijašević, D., Kostić, A., Milinčić, D., Gašić, U., Pešić, M. (2024). Chemical composition and quorum sensing inhibition activity of horseradish (*Armoracia rusticana*) root extracts. XIII Congress of

Microbiologists of Serbia: From biotechnology to human and planetary health. Serbian Society for Microbiology, pp 147-147.

4. Malešević, M., **Ćurčić, J.**, Gardijan, L., Obradović, M., Stanisavljević, N., Pantić, M., Matijašević, D. (2024). Medicinal mushroom extracts attenuate *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and virulence. XIII Congress of Microbiologists of Serbia: From biotechnology to human and planetary health. Serbian Society for Microbiology, pp 145-145.
5. **Ćurčić, J.**, Matijašević, D., Stanisavljević, N., Tasić, S., Kojić, M., & Malešević, M. (2023). Metagenomic Analysis of Bacterial Community and Isolation of Representative Strains from Vranjska Banja Hot Spring, Serbia. 4th Belgrade Bioinformatics Conference (Vol. 4, pp. 112-112). Belgrade: Institute of molecular genetics and genetic engineering.

Б5. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **Ćurčić, J.**, Jakovljević, S., Novović, K., Vasiljević, Z., Kojić, M., Jovčić, B., & Malešević, M. (2023). A novel YtnP lactonase reduces the expression of *P. aeruginosa* MMA83 quorum sensing and virulence factors gene expression. CoMBoS2—the Second Congress of Molecular Biologists of Serbia, Abstract Book—Trends in Molecular Biology, Special issue 06-08 October 2023, Belgrade, Serbia (pp 121-121).

## **В. Тема докторске дисертације:**

### **Наслов дисертације:**

**„Функционална карактеризација YtnP лактоназе *Stenotrophomonas maltophilia* и испитивање антивирулентног потенцијала на модел систему *Pseudomonas aeruginosa*”**

### **Полазне основе:**

Прекомерном употребом антибиотика извршен је снажан селективни притисак на бактерије, који је довео до развоја и ширења резистенције на клинички доступне антибиотике. Појава и ширење вишеструко резистентних бактеријских сојева и отежан третман бактеријских инфекција антибиотцима представља један од водећих проблема са којима се суочавају јавни здравствени системи. Предвиђа се да би резистенција бактерија на антибиотике до 2050. године могла узроковати смрт преко 10 милиона људи на годишњем нивоу, са значајним социо-економским последицама [1]. Стога је проналазак

алтернативних стратегија у борби против инфекција изазваних патогеним бактеријама један од приоритета савремених истраживања. Антивирулентна стратегија представља алтернативни приступ у третману бактеријских инфекција. Она се заснива на ометању међућелијске комуникације бактерија (енг. *quorum sensing* - QS) и смањењу експресије фактора вируленције патогених бактерија. Познато је да сигнални молекули међућелијске комуникације бактерија регулишу експресију фактора вируленције бактерија. Примена ензима утишивача међућелијске комуникације (енг. *quorum quenching* - QQ) који деградују сигналне молекуле међућелијске комуникације бактерија представља алтернативни приступ за контролу патогених бактерија који се заснива на смањењу њихове вирулентности и повећању осетљивости на антибиотике [2]. *Pseudomonas aeruginosa* је Грам-негативна бактеријска врста, припада групи „ESKAPE“ патогена и недавно је од стране Светске Здравствене Организације дефинисана као патоген од критичног приоритета за проналазак ефикасних алтернативних терапеутика [3]. Ова бактеријска врста је дефинисана као главни узрочник смањења функције плућа и одговорна за преко 85% смртних случајева пацијената оболелих од цистичне фиброзе [4]. *P. aeruginosa* MMA83 је клинички изолат вишеструко резистентан на антибиотике [5] и биће коришћен као модел систем за испитивање антивирулентног дејства селектованог QQ ензима лактоназе.

## **Предмет докторске дисертације**

Примена QQ ензима као антивирулентних агенаса представља једну од обећавајућих стратегија у борби против патогених бактерија резистентних на антибиотике. Лактоназе су група QQ ензима који врше хидролизу лактонског прстена и на тај начин инактивирају *N*-ацил-хомосерин лактоне, сигналне молекуле међућелијске комуникације Грам-негативних бактерија [6]. *Pseudomonas aeruginosa* је Грам-негативна бактеријска врста која може изазвати акутне и хроничне инфекције код имунокомпромитованих пацијената, оболелих од цистичне фиброзе, канцера, пацијената након трансплантације органа, као и пацијената са болестима плућа. Бројни фактори вируленције и висок степен резистенције на антибиотике изолата *P. aeruginosa* допринео је да ова бактеријска врста буде дефинисана као патоген од критичног приоритета за проналазак алтернативних терапијских приступа. Врста *P. aeruginosa* је изабрана као модел за испитивање антивирулентног дејства



селектоване лактоназе, јер поседује једну од најкомплекснијих и најбоље проучених сигналних мрежа међућелијске комуникације. Сигналну мрежу међућелијске комуникације *P. aeruginosa* чине четири међусобно повезана система las, rhl, pqs, као и још увек недовољно истражен iqs QS систем. Las систем је један од најзначајнијих QS система *P. aeruginosa*. Сигнални молекул овог система је *N*-3-оксо-додеканонил-хомосерин лактон (3-оксо-С12-ХСЛ) који синтетише LasI синтаза. Када концентрација овог сигналног молекула достигне одређени праг везује се за рецепторски протеин LasR формирајући комплекс који иницира експресију циљних гена. Други QS систем *P. aeruginosa* је rhl и он припада LuxR-фамилији рецептора. Сигнални молекул rhl система је *N*-бутирил-хомосерин лактон (С4-ХСЛ), који синтетише RhII синтаза. Овај сигнални молекул се везује за одговарајући рецептор, након чега овај комплекс активира експресију циљних гена, као што су гени одговорни за синтезу рамнолипида, цијановодоника и пиоцијанина. Трећи QS систем *P. aeruginosa* је pqs, и он се заснива на 2-хептил-3-хидрокси-4-хинолону (PQS) као сигналном молекулу. Биосинтеза овог сигналног молекула регулисана је PqsR (MvfR) рецептором и pqsABCDE опероном. PqsR игра кључну улогу у регулацији rhl система, продукцији пиоцијанина, покретљивости бактерија, као и формирању биофилма [7].

Присуство QQ ензима је потврђено код великог броја бактеријских врста. Међутим код бактеријске врсте *Stenotrophomonas maltophilia*, до сада није идентификован ниједан ген укључен у QQ феномен [8]. Имајући у виду потврђен QQ фенотип соја *S. maltophilia* 6960, као и чињеницу да *S. maltophilia* често коегзистира са *P. aeruginosa* у плућима пацијената оболелих од цистичне фиброзе, основна хипотеза је да је QQ ензим YtnP лактоназа *S. maltophilia* смањује патогеност *P. aeruginosa* у сврху компетитивне предности. Стога је *P. aeruginosa* ММА83, вишеструко резистентан на антибиотике, одабран као модел систем за испитивање антивирулентног потенцијала YtnP лактоназе у оквиру предложене докторске дисертације.

### **Научни циљ истраживања**

У оквиру предложене докторске дисертације дефинисано је пет основних циљева:

**1. *In silico* анализа аминокиселинске и нуклеотидне секвенце YtnP лактоназе пореклом из бактеријске врсте *Stenotrophomonas maltophilia***

Употребом биоинформатичких предикционих алата и програма биће урађена анализа секундарне и терцијарне структуре YtnP лактоназе на основу аминокиселинске секвенце.

**2. Клонирање, експресија, пречишћавање YtnP лактоназе и њена биохемијска карактеризација**

Рекомбинантна YtnP лактоназа биће добијена употребом pQE30 експресионог система. Овако добијен ензим биће коришћен за потоње тестове. У циљу биохемијске карактеризације биће испитани температурни, рН оптимум и стабилност, као и каталитичка активност YtnP лактоназе.

**3. Испитивање антивирулентног потенцијала рекомбинантне YtnP лактоназе на модел систему вишеструко резистентног изолата *P. aeruginosa* MMA83**

Анализом антивирулентног потенцијала YtnP лактоназе добиће се увид у потенцијал YtnP лактоназе као антивирулентног агенса. Анализом ефекта различитих концентрација YtnP лактоназе у комбинацији са клинички релевантним антибиотцима биће утврђен потенцијал YtnP лактоназе као адитивног агенса за повећање ефикасности антибиотика.

**4. Испитивање токсичности и антивирулентних својстава рекомбинантне YtnP лактоназе *in vivo* на модел систему *Caenorhabditis elegans***

Токсичност рекомбинантне YtnP лактоназе биће испитана *in vivo* на модел систему *Caenorhabditis elegans*. Осим тога, увид у потенцијал YtnP лактоназе као терапијског агенса за смањење вирулентности *P. aeruginosa* MMA83 биће такође испитана *in vivo*.

**5. Конструкција "knock-out" *ytnP* мутанта соја *S. maltophilia* и анализа диференцијалне експресије гена дивљег соја и мутанта**

Конструисање *YtnP* мутанта омогућиће увид у молекуларне основе ефекта гена за *YtnP* лактоназу на транскриптом *S. maltophilia* 6960 у присуству егзогених молекула међућелијске комуникације (*N*-ацил-хомосерин лактона). Поред тога биће испитан утицај *YtnP* гена на одговор *S. maltophilia* у присуству других патогених бактерија, и обратно; утицај *YtnP* гена на вирулентност патогених бактерија.

## Материјал и методе који се користе

Сој који ће бити коришћен, *Stenotrophomonas maltophilia* 6960, припада колекцији изолата Лабораторије за молекуларну микробиологију Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду (ЈММ, ИМГГИ) и клиничког је порекла (Изолат је пореклом из Института за здравствену заштиту мајке и детета "др Вукан Чупић" изолован 2014. године током рутинског клиничког надзора над резистенцијом на антибиотике. Информације о пацијенту су анонимизирание те стога писана или усмена сагласност пацијента није била неопходна. Кандидат није имао контакт нити интеракцију са пацијентом). Овај сој је иницијалном претрагом показао QQ активност и његова QQ активност биће предмет проучавања овог рада. Изолација укупне ДНК овог соја, као и њено секвенцирање и анотација генома је претходно урађена. С обзиром да је у геному овог соја идентификовано присуство гена за лактоназу, приступиће се *in silico* анализи нуклеотидне и аминокиселинске секвенце овог гена применом одговарајућих биоинформатичких алата (Phyre2, SWISS MODEL алгоритама, AlphaFold2 и I-TASSER програма). Након детаљне биоинформатичке анализе секвенце гена као и протеинског продукта, *YtnP* лактоназе, овај ген ће бити клониран у експресиони pQE30 вектор. Експресија рекомбинантног *YtnP* гена за лактоназу биће индукована у *Escherichia coli* M15 (pREP4) ћелијама употребом IPTG (енг. *isopropyl β- d-1-thiogalactopyranoside*). Ni-NTA агароза ће се користити за пречишћавање хистидином обележене *YtnP* лактоназе. Применом есеја заснованог на биосензорном соју *Chromobacterium subtsugae* CV026 биће проверена активност рекомбинантне пречишћене лактоназе. Потом ће се приступити биохемијској карактеризацији *YtnP* ензима, укључујући утврђивање кинетике ензима, температурне и рН стабилности, као и ефекта различитих јона на активност *YtnP* лактоназе. Супстратна специфичност *YtnP* лактоназе биће испитана применом HPLC (енг.

*high-performance liquid chromatography*) и LC-MS/MS (енг. *liquid chromatography tandem mass spectrometry*) методом, коришћењем *N*-ацил-хомосерин лактона различите дужине ацилних ланаца (C4-C14 ХСЛ). Утицај YtnP лактоназе на формирање и декомпозицију биофилма биће праћен применом флуоресцентне микроскопије, употребом флуоресцентних боја за бојење живих (SYTO9) и лизираних ћелија (пропидијум јодид). Квантитативна ланчана реакција полимеразе у реалном времену (енг. *Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*, RT-qPCR) биће коришћена за анализу утицаја YtnP лактоназе на експресију гена укључених у QS (*lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR*, *pqsA*, *mvfR*) и вируленцију (*lasB*, *phzM*, *rhlC*, *pvdS*, *algK*) *P. aeruginosa* MMA83. Метод шаховске табле (енг. *checkerboard*) биће примењен за испитивање ефекта комбиноване примене YtnP лактоназе и клинички значајних антибиотика (меропенема и гентамицина) на раст MMA83. Есеји преживљавања, као и есеји за испитивање утицаја рекомбинантне YtnP лактоназе на развиће и репродукцију *C. elegans* биће примењени. Потом ће се моделом инфекције *C. elegans* испитати ефекат предтретмана *P. aeruginosa* MMA83 са YtnP лактоназом на повећање стопе преживљавања *C. elegans* инфицираног са MMA83. Мутант *S. maltophilia* 6960, дефицијентан за *utnP* ген за лактоназу биће конструисан применом претходно установљеног протокола [9] уз мање измене. Најпре ће бити конструисани прајмери са одговарајућим рестрикционим местима за фрагменте који су позиционирани узводно и низводно од *utnP* гена. Региони узводно и низводно од *utnP* гена биће умножени применом методе ланчане реакције полимеразе (PCR). Тако добијени и пречишћени ампликони биће клонирани у рJET вектор. Потом ће добијени конструкти бити трансформисани у компетентне *E. coli* DH5α ћелије. Позитивни трансформанти биће селектовани на одговарајућим подлогама са ампицилином и потврђени секвенцирањем. У наредном кораку изоловани конструкти из одговарајућих клонова биће подвргнути рестрикционој дигестији одговарајућим рестрикционим ензимима. Пречишћени фрагменти биће даље клонирани у рEMGT плазмид, а потом и селектовани на подлогама са канамицином и телуритом. Након потврде секвенцирањем, одговарајући конструкти ће бити уведени у циљни изолат *S. maltophilia* процесом трипаренталне коњугације уз коришћење *Escherichia coli* DH5α (рRK2013) као помоћног соја. Потврда формирања меродиплоида биће урађена гајењем у селективном медијуму са ампицилином и телуритом, а потом и PCR методом. Потом ће се у селектоване кандидате коњугацијом

увести pSW-Arg плазмид који носи ген за *SceI* ендонуклеазу. Успешност коњугације биће потврђена на селективном медијуму са апрамицином. Индукција експресије *SceI* ендонуклеазе, која уводи дволанчане прекиде на специфична места унутар pEMGT плаزمиде стимулишући други корак рекомбинације, биће извршена додавањем 3-метилбензоата у селективни медијум. Мутанти ће бити селектовани изостанком раста на телуриту, а потом потврђени PCR методом. Потом ће мутанти бити очишћени од pSW-Arg гајењем у неселективном медијуму. Селектовани кандидати за мутанта бити секвенцирани коришћењем Illumina HiSeq 2500 платформе (MicrobesNG, Универзитет у Бирмингему, Велика Британија). За склапање генома биће коришћен Де Брујин Граф метод. Контигови краћи од 200 базних парова биће уклоњени. Добијене секвенце биће мапирание употребом Burrows-Wheeler Aligner-BWA. RAST (енг. *Rapid Annotations using Subsystems Technology*, <http://rast.nmpdr.org>) сервер биће коришћен за анотацију гена и предикцију отворених оквира читања у целокупној геномској секвенци. Упоредна анализа аотираних геномских секвенци селектованих кандидата за *ytnP* мутанте применом алата Bowtie даће коначну потврду делеције одговарајућих гена. Потом ће дивљи сој *S. maltophilia* 6960 и *ytnP* мутант бити гајени са најпроблематичнијим бактеријским сојевима цистичне фиброзе који ће бити физички раздвојени мембраном, која омогућава дифузију молекула, али не и директан контакт дивљег соја/*ytnP* мутанта са бактеријским сојевима других врста. Такође, дивљи сој и *ytnP* мутант ће бити инкубирани са С4-ХСЛ и 3-оксо-С12-ХСЛ појединачно. Након тога биће урађено секвенцирање целокупне РНК и анализа транскриптома у циљу утврђивања разлика на нивоу експресије гена код дивљег соја и *ytnP* мутанта као одговор на присуство одабраних патогена карактеристичних за цистичну фиброзу, као и одговор на *N*-ацил-хомосерин лактоне специфичне за *P. aeruginosa*.

### **Очекивани резултати и научни допринос**

У оквиру ове докторске дисертације применом биоинформатичких алата биће добијене информације о предикцији секундарне и терцијарне структуре YtnP лактоназе. Биохемијском карактеризацијом рекомбинантне YtnP лактоназе биће утврђена кинетика ензима, термостабилност, рН стабилност, као и супстратна специфичност. Функционална карактеризација YtnP лактоназе даће увид о антивирулентном и антибиофилм потенцијалу

YtnP лактоназе на модел систему *P. aeruginosa* MMA83. Метода шаховске табле даће информацију о ефекту комбиноване примене YtnP лактоназе и одговарајућих антибиотика на минималну инхибиторну концентрацију патогена *P. aeruginosa* MMA83. Додатно, подаци добијени на *in vivo* модел систему *C. elegans* пружиће информацију о токсичности рекомбинантне YtnP лактоназе, као и њеном антивирулентном потенцијалу на патогену *P. aeruginosa* MMA83. У оквиру ове докторске дисертације биће конструисан *ytnP* "knock-out" мутантни сој *S. maltophilia* 6960, који ће омогућити анализу диференцијалне експресије гена код дивљег соја и *ytnP* мутанта, чиме ће се расветлити биолошка улога и клинички значај *ytnP* гена соја *S. maltophilia* 6960. Добијени резултати ће пружити информације које ће омогућити процену потенцијалног коришћења YtnP лактоназе као терапијског агенса у третману инфекција изазваних вишеструко резистентним сојевима врсте *P. aeruginosa*.

#### **Најважнији литературни подаци који подржавају тему (до 10 референци)**

1. Salam, M. A., Al-Amin, M. Y., Salam, M. T., Pawar, J. S., Akhter, N., Rabaan, A. A., & Alqumber, M. A. (2023). Antimicrobial resistance: a growing serious threat for global public health. *Healthcare* 11(13):1946. doi: 10.3390/healthcare11131946.
2. Zhu, X., Chen, W. J., Bhatt, K., Zhou, Z., Huang, Y., Zhang, L. H., ... & Wang, J. (2023). Innovative microbial disease biocontrol strategies mediated by quorum quenching and their multifaceted applications: A review. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1063393. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1063393>
3. Reig, S., Le Gouellec, A., & Bleves, S. (2022). What Is New in the Anti-Pseudomonas aeruginosa Clinical Development Pipeline Since the 2017 WHO Alert? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 909731. doi: 10.3389/fcimb.2022.909731.
4. Martin, C., Hamard, C., Kanaan, R., Boussaud, V., Grenet, D., Abély, M., ... & Burgel, P. R. (2016). Causes of death in French cystic fibrosis patients: the need for improvement in transplantation referral strategies! *Journal of Cystic Fibrosis*, 15(2), 204-212. doi: 10.1016/j.jcf.2015.09.002.
5. Jovicic, B., Lepsanovic, Z., Suljagic, V., Rackov, G., Begovic, J., Topisirovic, L., & Kojic, M. (2011). Emergence of NDM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(8), 3929-3931. <https://doi.org/10.1128/AAC.00226-11>

6. Rémy, B., Plener, L., Decloquement, P., Armstrong, N., Elias, M., Daudé, D., & Chabrière, É. (2020). Lactonase specificity is key to quorum quenching in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 525048. doi: 10.3389/fmicb.2020.00762.
7. Li, Q., Mao, S., Wang, H., & Ye, X. (2022). The molecular architecture of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors. *Marine Drugs*, 20(8), 488. doi: 10.3390/md20080488.
8. Huedo, P., Coves, X., Daura, X., Gibert, I., & Yero, D. (2018). Quorum sensing signaling and quenching in the multidrug-resistant pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 122. doi: 10.3389/fcimb.2018.00122.
9. De Dios, R., Gadar, K., & McCarthy, R. R. (2022). A high-efficiency scar-free genome-editing toolkit for *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77(12), 3390-3398. doi: 10.1093/jac/dkac328.

### Г. Закључак и предлог:

На основу пријаве теме докторске дисертације коју је поднела студент Јована М. Ђурчић, као и анализе литературе која подржава тему, Комисија закључује да је предмет истраживања предложене теме докторске дисертације Јоване М. Ђурчић научно оправдан, актуелан и подржан адекватном методологијом. Предложена докторска дисертација подразумева свеобухватан приступ заснован на примени микробиолошких, молекуларно-биолошких, биохемијских и биоинформатичких метода којима ће бити урађена структурна предикција, клонирање и експресија, а потом и биохемијска и функционална карактеризација YtnP лактоназе пореклом из клиничког изолата *S. maltophilia* 6960. Упоредо ће бити конструисан *utnP* мутант како би се утврдио утицај YtnP лактоназе на транскриптом *S. maltophilia* 6960 у одговору на присуство одабраних патогена и *N*-ацил-хомосерин лактона. На основу изложеног, Комисија закључује да је образложена тема докторске дисертације Јоване М. Ђурчић у потпуности научно оправдана и да кандидат задовољава све услове за успешну реализацију предложеног истраживања. Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета да одобри тему под насловом **„Функционална карактеризација YtnP лактоназе *Stenotrophomonas maltophilia* и испитивање антивирулентног потенцијала на модел систему *Pseudomonas aeruginosa*”** и израду предложене докторске дисертације. За менторе се предлажу др Милка Малешевић, научни сарадник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, и др Бранко Јовчић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Београд, 24.05.2024.

Комисија:

---

др Милка Малешевић, научни сарадник,  
Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство,  
Универзитет у Београду

---

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

---

др Наталија Половић, редовни професор,  
Хемијски факултет, Универзитет у Београду